

Z badań nad pasożytnictwem *Colletotrichum atramentarium* występującego na pomidorach

I. Badania nad niektórymi właściwościami biologicznymi *C.* *atramentarium*

The investigation on the parasitism of *Colletotrichum atramentarium* on tomato
plants

Part I. Some biological properties of *C. atramentarium*

H. JAKUBCZYK

Colletotrichum atramentarium (B. et Br.) Taub. jest od dawna, bo od 1825 r. (H. R. Link), znanym patogenem ziemniaka wywołującym na tej roślinie objawy wędnięcia lub nawet zniekształcenia pędów i zgniliznę kłębów. Patogenicznością tego grzyba dla ziemniaków zajmowało się wielu autorów badając mniej lub bardziej obszernie to zagadnienie i opowiadając się bądź zdecydowanie przeciw jego patogeniczności (Shapovalov 1923; Pethybridge 1926; Schutt, 1953; Kovachewsky 1954), bądź uważając go za pasożyta słabości (Dickson 1922; Foëx 1933; Défago i Gasser 1943; Wenzl 1950; Bremer 1954), bądź dowodząc jego rzeczywistego pasożytnictwa (Ducomet 1908; Crépin 1922; Cavadas 1923; Aversa-Sacca 1923; Husz 1934, 1953; Olgyay 1951; Henniger 1953; Schmiedeknecht 1954; Miczyńska i Wnękowski 1957). *C. atramentarium* był notowany również na innych roślinach: lnie (Rost 1938), konopiach (Hoffmann 1959), na chwastach (Ibrahimow 1951), ale głównie na innych gatunkach z rodziny *Solanaceae*: na *Solanum melogena* (O'Gara 1917; Brundza 1937; Wickens 1937; Kendrick i Walker 1948) i *Capsicum annuum*, a przede wszystkim na pomidorze (Bewley 1916 i 1922; C. C. Brittlebank 1924; G. Samuel 1924 i 1931; D. B. Adam 1937; S. Fish 1939; T. T. Colquhoun 1941; T. Small 1936; Bowley i Shearn 1924; F. T. Bennett 1939; McKay 1942 i 1949; T. Walsh i E. J. Clarke 1945; Conners i Savile 1952; McNeill 1955 i 1957; J. Takanaka 1955; Kaarep 1957).

Zagadnienie patogeniczności *C. atramentarium* w stosunku do pomidorów było również od początku dyskusyjne i skomplikowane jeszcze bardziej tym, że poszczególni autorzy zajmowali się nim albo ze względu na objawy wędnięcia na całej roślinie, albo tylko ze względu na zgniliznę korzeni lub wreszcie tylko patogenicznością tego drobnoustroju w stosunku do owoców pomidora. Pierwszego aspektu badań dotyczyły prace wymienione wyżej. Zagadnieniem zgnilizny korzeni zajmowali się Williams, Ebben i współpracownicy (Williams, 1928; Williams i in., 1950 i 1951, 1953; Williams i Ebben, 1951; Hack, Williams, Ebben i in., 1952; Ebben i Williams, 1956; Ebben, 1959), badając sumiennie całą mikroflorę korzeni tej rośliny. W wyniku tych badań doszli oni do wniosku, że *C. atramentarium* jest grzybem najczęściej występującym w korzeniach pomidorów i prawdopodobnie najaktywniejszym, atakującym zdrowe korzenie i torującym drogę innym drobnoustrojom. Zdecydowanie zaprzeczali tym wnioskowi Hochapfel (1940) i Bremer (1954) uważając obecność *C. atramentarium* na chorych korzeniach za przypadkową. Antraknozę owoców pomidora wywołwaną m. in. przez *C. atramentarium* badali: Bondarcewa-Montewerde (1927), Kendrick i Walker (1948), Fulton (1948), Pantidou (1954), Pantidou i Schroeder (1955), Schoemaker i Creelman (1958), YOUNKIN i DIMOCK (1944), H. Jakubczyk (1961).

Zagadnienie patogeniczności tego grzyba dla pomidorów nie zostało jednak definitywnie rozstrzygnięte, a szczególnie zagadnienie, czy patogeniczność w stosunku do korzeni i całych roślin pomidora oraz do jego owoców jest jednakowa i czy można objawy na poszczególnych częściach rośliny włączyć w jeden proces chorobowy. Dotychczas patogeniczność tego grzyba próbowano określać w oparciu o objawy na roślinach i różnice w niej tłumaczono wpływem warunków zewnętrznych.

W podjętym opracowaniu tego zagadnienia ocenę patogeniczności postanowiono oprzeć na badaniach biologii grzyba zarówno przy jego wzroście w sztucznej kulturze, jak i przy rozwoju w roślinie w powiązaniu z całokształtem stosunków pomiędzy grzybem a rośliną.

Po porównaniu wielu izolatów otrzymanych z korzeni, łodyg i owoców pomidorów, na których obserwowano występowanie *C. atramentarium*, wybrano izolat z korzenia i przeprowadzono w sztucznej kulturze badania szeregu podstawowych właściwości biologicznych tego grzyba, a mianowicie: wpływu na wzrost wybranych związków węglowodanowych jako źródła węgla i azotowych jako źródła azotu, dalej — wpływu pH podłoża i temperatury na wzrost oraz wpływu temperatury na kiełkowanie zarodników. Dane te miały posłużyć do scharakteryzowania szczepu użytego do doświadczeń infekcyjnych przez porównanie

z podobnymi danymi z literatury dla szczepów z ziemniaka, konopi i owoców pomidorów oraz jako podstawa do scharakteryzowania jego zdolności pasożytniczych i patogeniczności w stosunku do pomidora.

Istnieją w literaturze badania laboratoryjne nad właściwościami biologicznymi *C. atramentarium* i wpływem warunków zewnętrznych na jego rozwój w sztucznej kulturze. Spośród czynników zewnętrznych najczęściej uwzględniano w tych badaniach wpływ temperatury na wzrost. Badali go już Défago i Gasser (1943) następnie prowadzili te badania dla izolatu z owocu pomidora Kendrick i Walker (1948) i wreszcie dla izolatów z ziemniaka i konopi Hoffmann (1959).

Następnie badano wpływ stężenia jonów wodorowych w podłożu na wzrost i zarodnikowanie grzyba (Kendrick i Walker, l.c. i Hoffmann l.c.).

Najslabiej reprezentowane w literaturze są badania nad zdolnościami *C. atramentarium* do wykorzystywania składników pokarmowych Schmiedeknecht (1956) badał w oparciu o izolat z ziemniaka zdolności enzymatyczne omawianego mikroorganizmu. Kendrick i Walker (l.c.) badali wykorzystywanie przez grzyb związków węglowodanowych. Nie stwierdzono w literaturze badań nad przyswajalnością związków azotowych. Poza omówionymi wyżej spotykano jeszcze w różnych pracach dane na temat wzrostu. *C. atramentarium* na różnych pożywkach na wpół naturalnych lub syntetycznych, głównie pod kątem uchwycenia różnic we wzroście na tych podłożach różnych szczepów grzyba.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Obserwacje nad występowaniem *C. atramentarium* prowadzono w latach 1956—58 na pomidorach gruntowych w okolicach Warszawy i Lublina, na pomidorach szklarniowych w okolicach Warszawy i Łodzi.

Z roślin chorych z widocznymi sklerocjami na korzeniach izolowano *C. atramentarium* z korzeni i łodyg. Z korzeni otrzymywano izolaty przez wyosabnianie sklerocjów bez odkażania i przez cięcie skrawków ze zbrązowiałych korzeni po wytarciu ich alkoholem. Z łodyg przy izolacji cięto poprzeczne skrawki na ogół na wysokości 10 cm od szyjki korzeniowej po wytarciu łodygi alkoholem i opaleniu nad płomieniem, niejednokrotnie zaś usuwając również skórkę. Do izolacji używano pożywki brzezkowej zakwaszonej 5% kwasem mlekowym do pH 4—4,5 dla otrzymania kultur wolnych od bakterii.

Patogena izolowano z pomidorów gruntowych z Warszawy w sierpniu i wrześniu 1956 r. oraz we wrześniu i październiku 1958 r., za każdym razem z kilku lub kilkunastu roślin. Porażenie roślin szklarniowych obserwowano i dokonano z zebranych roślin izolacji w maju, lipcu

i sierpniu 1957 r. Izolaty z owoców otrzymywano w październiku 1956 r. oraz od sierpnia do października 1957 r. Przy izolowaniu grzyba z owoców sporządzano zawieszinę zarodników tworzących się w złożach na plamach.

Kultury przetrzymywano na pożywce brzeczkowej, 2% -glukozowo-ziemniaczanej oraz na sterylizowanych kawałkach łądyg pomidora w temperaturze 25—28° w termostacie.

Colletotrichum atramentarium (B. et Br.) Taub. należy do *Melanconiales*, *Fungi Imperfecti*.

Grzyb ten tworzy zarodniki konidialne, jednokomórkowe, bezbarwne, cylindryczne, z obu końców zaokrąglone, czasem maczugowate, niekiedy owalne lub prawie kuliste, o wymiarach: 11—22 × 3—7,6 μ w złożach (acervulus) ciemnych, przeważnie bez grubej stromatycznej podkładki, o średnicy 180—200 μ, z trzonkami konidialnymi bezbarwnymi, walcowatymi, 10—30 μ długości, z przegrodami do 3 lub bez nich; złoża są przeważnie otoczone szczecinkami ciemnobrunatnymi, o rozszerzonej podstawie, zwężonymi ku wierzchołkowi, zaostrozonymi na końcu, z kilkoma przegrodami, długości 60—230 μ; najcharakterystyczniejszym i najczęściej spotykanym elementem morfologicznym są sklerocja czarne, na ogół błyszczące, mniej więcej kuliste, o średnicy 100—600 μ, zbudowane z plektenchymatycznej tkanki, opatrzone szczecinkami. Opisy morfologicznych cech grzyba zawierają następujące prace: Ducommet (1908), Cavadas (1923), Défago i Gasser (1943), Averna-Sacca (1923), Chaudhuri (1924), Dickson (1926), Schmiedeknecht (1956; 59), Arx (1957), Ettig (1958) oraz Hoffmann (1959).

Grzybnia w kulturze rozrasta się promieniście, jest gładka, zagłębiona w podłożu, jasnocielista lub różowa, potem pojawiają się na niej tak samo jasno zabarwione wypukłości, w których tworzą się obficie zarodniki i które przekształcają się następnie w powstające koncentrycznymi kręgami, czarne, błyszczące sklerocja. Wzrost w kulturze opisują: Dickson (1926), Défago i Gasser (1943) oraz Schmiedeknecht (1956).

Rozpoczynając badania w 1956 r. rozporządzano szeregiem izolatów z korzeni i łądyg pomidorów gruntowych oraz z owoców pomidora. Porównano te izolaty pod względem morfologii i wzrostu w sztucznej kulturze hodując je w tym celu na pożywkach 2% -glukozowo-ziemniaczanej, brzeczkowej i na sterylizowanych łądygach pomidora. Kultury otrzymane z poszczególnych części rośliny, jak i z różnych roślin i z różnych plantacji nie różniły się absolutnie wyglądem. Notowane w literaturze (Scott 1923—24; Dickson 1923 i 25; Défago i Gasser 1943) mutanty obserwowano we własnych hodowlach, ale zupełnie niezależnie od ich pochodzenia. Zmiany w wyglądzie grzybni i sklerocjów zależały głównie od podłoża a nie od pochodzenia izolatu. Porównywano również posiadane izolaty z rozwojem szczepu wyizolowanego z ziemniaka, nie stwierdzając różnic. Do badań laboratoryjnych wybrano więc tylko jeden izolat z korzenia pomidora z zamiarem porównania otrzymanych danych

z danymi z literatury. Dotyczyło to głównie wpływu temperatury, bo w tym okresie, w którym przystępowano do badań wpływu innych czynników, m. in. pH, i składników pokarmowych na wzrost, nie znano jeszcze wyników podobnych badań prowadzonych przez innych autorów, gdyż zawarte są one w pracy Hoffmanna z 1959 r. i pracy Kendricka i Walkera (1948) prowadzonej dla izolatów z owoców, o której w tym czasie nie wiedziano, że dotyczy *C. atramentarium*.

Pożywki syntetyczne, na których prowadzono badania, przygotowywano sterylizując je w aparacie Kocha przez 3 dni po 40 min. Rozlewano sterylnie do wyjałowionych szalek Petriego o średnicy 12 cm po 50 ml na każdą szalkę, przeznaczając 8 lub 10 szalek na każdą kombinację. Szalki szczepiono w szafce Hansena sklerocjami z kultury, biorąc mniej więcej jednakową ilość sklerocjów na koniec igły.

Przyrosty kultur mierzono wzdłuż 2 prostopadłych średnic co 2 dni w czasie trwania hodowli oraz notowano wygląd kolonii i stopień zarodnikowania. Po określonej ilości dni (najczęściej 11) kultury rozpuszczano przez ogrzanie w autoklawie i zbierano na zważone uprzednio sączi bibułowe wymywając resztki agaru gorącą wodą. W wypadku pożywek płynnych, po prostu sączono je przez wyważone sączi. Sączi z zawartością grzybni suszono przez 14 godzin w temp. 70°, po czym ważono. Zarówno przy pomiarach liniowych, jak i wagowych do porównywania poszczególnych kombinacji brano średnią ze wszystkich (przeważnie 10) powtórzeń, w pierwszym wypadku — średnią z średnic kolonii, w drugim — średni ciężar grzybni po wysuszeniu.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Wpływ na wzrost zawartości cukru w pożywce

Badano wzrost *C. atramentarium* na pożywkach o różnej wg procentu wagowego zawartości cukru (tab. 1).

Najlepszy wzrost grzyba zanotowano na pożywce zawierającej 50 g cukru i 10 g związku azotowego oraz inne składniki w odpowiedniej proporcji z dodatkiem wyciągu z drożdży (XII), a więc substancji wzrostowych i witamin. Zupełnie dobrze rozwijał się *C. atramentarium* na pożywce o tej samej zawartości składników pokarmowych bez dodania drożdży (VIII). Zawartość 50—80 g cukru w 1 l pożywki odpowiadająca 20—32 g węgla jest wystarczająca dla dobrego wzrostu grzyba przynajmniej przy zawartości 10 g KNO₃ odpowiadającej 1,6 g azotu.

W wypadku zaś pożywek VI i VII zwiększenie tylko zawartości azotu z pozostawieniem ilości innych składników bez zmian, nie przyczyniło się do wzmożenia wzrostu widocznie ze względu na niewystarczającą ilość innych pierwiastków, a głównie węgla. Na pożywce zawierającej tylko

TABELA 1 - TABLE 1

Wpływ różnej zawartości cukru w pożywce na rozwój *C. stramentarium* po 11 dniach
 The influence of different sugar content in the nutrient on the growth
 of *C. stramentarium* after 11 days

Pożywka ¹ Medium	Zawartość w g/l l wody - Concentration in grams/1000 ml of water					
	glukoza glucose	KNO ₃	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	średn. (z 8) ciężar grzybni w mg the average (from 8 samples) weight of mycelium in mg	średn. (z 10) średnica kultur w cm The average (from 10 samples) diameters of the colonies in cm
I	10	-	-	-	41,8	7,2
II	20	-	-	-	41,3	7,3
III	50	-	-	-	44,9	8,5
IV	100	-	-	-	33,3	7,4
V	10	2	1	0,5	111,9	7,2
VI	20	2	1	0,5	264,1	9,5
VII	20	10	1	0,5	264,8	9,8
VIII	50	10	5	2,5	411,35	8,5
IX	60	2	1	0,5	557,88	11,0
X	80	10	5	2,5	413,7	8,5
XI	100	10	5	2,5	357,1	7,98
XII ²	50	10	5	2,5	590,0	9,94
XIII	-	10	5	2,5	18,7	-
XIV ³	-	-	-	-	319,9	-
XV ⁴	20	-	-	-	413,1	-

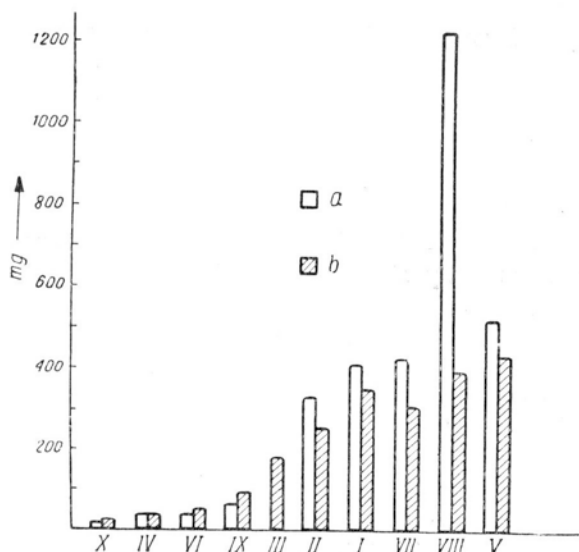
- 1 - We wszystkich pożywkach użyto 17 g ageru, proporcje podano na 1 000 ml wody
 In all of the nutrients the agar content was 17 grams/1000 ml of dest. water
- 2 - Zamiast wody do sporządzenia pożywki użyto wyciągu z drożdży przygotowanego następująco:
 100 g w 1 l wody gotowano przez 3-4 godz. w aparacie Kocha, po czym osadzono je przez
 tydzień i zlane przez dekantację
 Instead of water the yeast extract was used: 100 grams of bakers yeast in 1000 ml of
 water boiled from 3-4 hrs and decanted after 7 days
- 3 - Pożywka brzeczkowa (250 ml brzeczki ok. 10° Błg)
 Malt broth (250 ml malt broth 10° Brix)
- 4 - Do sporządzenia pożywki zamiast wody użyto wyciągu ziemniaczanego
 Instead of water the potato extract was used

10 g cukru i inne składniki w minimalnych ilościach wzrost grzyba był bardzo słaby. Równie niepomysłnie rozwijał się patogen na pożywkach sporządzonych z wody destylowanej jedynie z zawartością cukru niezależnie od dość dużych jego dawek.

W doświadczeniu tym porównywano także rozwój grzyba na najczęściej używanych pożywkach o nie określonym ściśle składzie, mianowicie ziemniaczanej i brzezkowej. Wzrost na pożywce ziemniaczanej nie odbiegał od wzrostu na pożywce VIII, na pożywce brzezkowej był nieco słabszy.

Zapotrzebowanie na różne źródła węgla

Przebadano wzrost *C. atramentarium* na pożywkach, w których źródło węgla stanowiły różne cukry. Jako podstawowej użyto pożywki zawierającej: źródło cukru — 50 g, KNO_3 — 10 g, K_2HPO_4 — 5 g, MgSO_4 — 2,5 g, agar — 17 g, wody 1 l. Kolejne pożywki zawierały następujące cukry jako źródła węgla: I — glukozę, II — fruktozę, III — skrobię, IV — laktozę, V — maltozę, VI — galaktozę, VII — mannozę, VIII — sacharozę, IX — ksylozę, X — bez cukru. Doświadczenie to wykonano w dwóch powtórzeniach. Wyniki doświadczenia obrazuje wykres 1.



Wykres 1. Wzrost *C. atramentarium* na pożywkach zawierających różne źródła węgla wyrażony ciężarem grzybni po 11 dniach;

a — powtórzenie 1, b — powtórzenie 2; cyfry rzymskie oznaczają kolejność pożywek

The growth of *C. atramentarium* on the mediums containing different sources of carbon expressed by the weight of mycelium after 11 days;

a — experiment 1, and b — experiment 2. The Roman numbers indicate the kind of mediums used

Powtórzenie zasadniczo potwierdziło wyniki otrzymane z pierwszego doświadczenia, wyeliminowało jedynie wysoki wynik dla pożywki z sacharozą. Trzeba podkreślić wystąpienie na tej pożywce bardzo obfitego zarodnikowania.

Grzyb ten ma dość szeroką zdolność wykorzystywania związków węglowodanowych. Najlepiej przyswajalnymi okazały się maltoza i sacharoza, trochę słabszy wzrost otrzymano na glukozie, mannozie, fruktozie i wreszcie słaby na ksylozie i bardzo słaby na pożywce bez cukru, laktozie i galaktozie.

Stopień wykorzystania poszczególnych cukrów w tym doświadczeniu kształtował się trochę odmiennie od wyników badań Kendricka i Walkera (1948), którzy nie badali maltozy i mannozy. Na zaistnienie tych rozbieżności mogły wpłynąć różnice w przygotowaniu pożywek. Pożywki były sterylizowane w aparacie Kocha, a nie autoklawowane. Jednakże mogły zajść w nich pewne zmiany, którym mogły ulec łatwiej pojedyncze cukry niż dwucukry. Poza tym możliwe jest zanieczyszczenie użytych związków np. witaminami. Takie zanieczyszczenie mogłoby wyjaśnić niespodziewanie silny wzrost *C. atramentarium* na sacharozie w pierwszym powtórzeniu.

Zły rozwój grzyba na ksylozie stwierdzono zarówno w omawianym doświadczeniu, jak i w badaniach Kendricka i Walkera (l.c.). Wynik ten jednak nie jest również całkowicie pewny, gdyż ksyloza łatwo ulega zmianom przy sterylizacji termicznej. Podważają go badania Schmiedeknehta (1956), który stwierdził bardzo dobry wzrost na hemicelulozie, które to związki po hydrolizie dają głównie d-ksylozę.

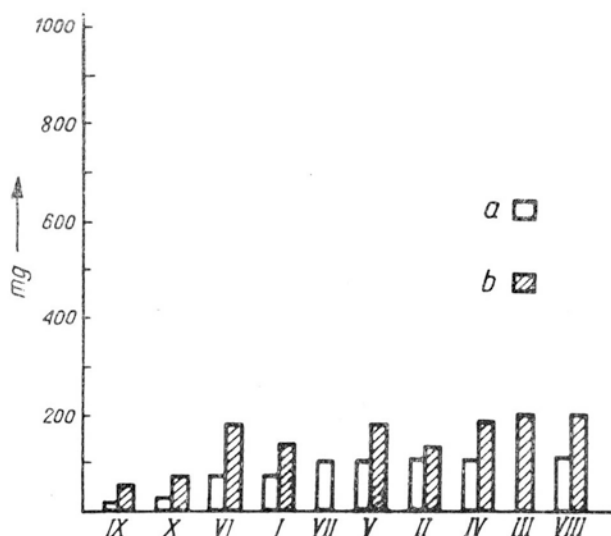
Badania własne potwierdziły również nieprzydatność galaktozy dla wzrostu *C. atramentarium* zanotowaną przez Kendricka i Walkera (l.c.). Za to autorzy ci podają zupełnie dobry wzrost na laktozie, na której w moim doświadczeniu nie zaobserwowano wzrostu grzyba. Możliwość rozbieżnych wyników pod tym względem jest zrozumiała w świetle nieprzydatności dla wzrostu tego grzyba galaktozy wchodzącej w skład cząsteczki laktozy.

Zapotrzebowanie na różne źródła azotu

W pożywce o składzie: glukoza — 10 g, źródło azotu — 20 g, K_2HPO_4 — 1 g, $MgSO_4$ — 0,5 g, agar — 17 g, wody — 1 l zastosowano kolejno następujące związki azotowe jako źródło azotu (przy nazwie związku podano w g ilość azotu zawartą w 20 g związku): I — szczawian amonu — 4,6 g, II — KNO_3 — 2,7 g; III — $NaNO_3$ — 3,2 g; IV — asparagina 4,2 g; V — pepton; VI — mocznik 9,3 g; VII — glicyna 3,7 g; VIII — kw. glutaminowy 1,2 g; IX — fenyloalanina 3,1 g; X — bez azotu.

Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach. Wyniki badań obrazuje wykres 2.

W tym wypadku różnice we wzroście na pożywkach zawierających poszczególne związki azotu nie wystąpiły tak wyraźnie, jak w doświadczeniu z cukrami, szczególnie poza krańcowymi wartościami. Ze względu



Wykres 2. Wzrost *C. atramentarium* na pożywkach zawierających różne źródła azotu wyrażony ciężarem grzybni po 11 dniach;

a — powtórzenie 1, b — powtórzenie 2, cyfry rzymskie oznaczają kolejność pożywek

The growth of *C. atramentarium* on the mediums containing different sources of nitrogen expressed by the weight of mycelium after 11 days;

a — experiment 1 and b — experiment 2. The Roman numbers indicate the kind of mediums used

na nieznaczne różnice między ciężarami grzybni na poszczególnych pożywkach przy powtórzeniu nie otrzymano dokładnie tej samej kolejności pożywek. W poszczególnych pożywkach zastosowano jednakową ilość związku azotowego, co nie pozwoliło na zrównoważenie rzeczywistej zawartości w nich azotu. Zawartości azotu w 20 g poszczególnych związków podano przy wyliczaniu kolejności pożywek. Jednakże nie wydaje się, aby różnice w ilości dostarczonego azotu istotnie wypaczyły otrzymane wyniki. Decydujący wpływ na rozwój grzyba wywiera, w świetle otrzymanych danych, przyswajalność poszczególnych związków azotowych.

Przy badaniu różnych źródeł azotu stwierdzono pobieranie przez *C. atramentarium* azotanów, przy czym wzrost na obu badanych związ-

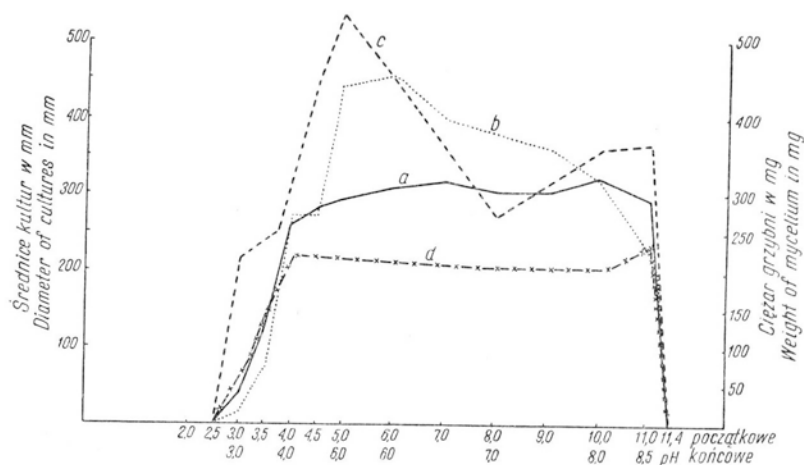
kach azotanowych (KNO_3 i NaNO_3) był zupełnie dobry. Jako źródło jonów amonowych wybrano nie najszcześliwiej szczawian amonu. Wzrost miał miejsce, więc grzyb korzystał z azotu w tej postaci.

Najlepiej rozwijał się grzyb na kwasie glutaminowym i asparaginie, a następnie na peptonie i moczniku, które poza aminokwasami stanowią również bardzo pożądane źródło azotu dla grzybów.

Spośród aminokwasów badane były jeszcze glicyna i fenyloalanina, gdyż innymi nie rozporządzano w laboratorium. Glicyna zapewniła zupełnie zadowalający wzrost grzyba, podczas gdy na fenyloalaninie nie było rozwoju.

Wpływ pH podłoża na wzrost *C. atramentarium*

Dla ustalenia zakresu pH podłoża, w jakim możliwy jest wzrost *C. atramentarium*, i wartości pH najbardziej sprzyjających rozwojowi tego grzyba założono hodowlę na pożywce brzezkowej doprowadzonej przy użyciu sterylizowanych 1 n HCl i 1 n NaOH do następujących pH: 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 i 11,4. Przeznaczono po 6 szalek Petriego na każde pH. Kultury hodowano w temperaturze 27 °C, mierzono co 2 dni przyrosty liniowe. Po 11 dniach grzybnie zważono. Wyniki pomiarów obrazuje wykres 3.



Wykres 3. Wzrost *C. atramentarium* na pożywkach o różnym pH po 11 dniach;

a — średnica kolonii na pożywce agarowo-brzezkowej, b — ciężar grzybni na pożywce agarowo-brzezkowej, c — ciężar grzybni na płynnej pożywce mineralnej I, d — ciężar grzybni na płynnej pożywce mineralnej II

The growth of *C. atramentarium* on the mediums of different pH after 11 days;

a — the diameter of colonies on malt agar, b — the weight of mycelium on malt agar, c — the weight of mycelium on the liquid mineral medium exper. I, d — the weight of mycelium on the liquid mineral medium exper. II

Stwierdzono, że wzrost grzyba rozpoczyna się powyżej pH 2,5, a ustaje powyżej pH 11,0. Przy pH 2,0 i 11,4 wzrostu nie było zupełnie. Przy pH 2,5 był słaby wzrost grzybni powietrznej, brak zaś rozrastania się grzybni na szerokość. W zakresie pH 3,0—4,0 wzrost był jeszcze nieznaczny. Zadowalający wzrost otrzymano w bardzo szerokich granicach pH, a mianowicie od 4,0 do 11,0. Pomiary liniowe wykazały prawie jednakowy wzrost w podanych granicach. Przy rozpatrzeniu ciężaru grzybni po 11 dniach występuje optimum wzrostu przy pH 6,0.

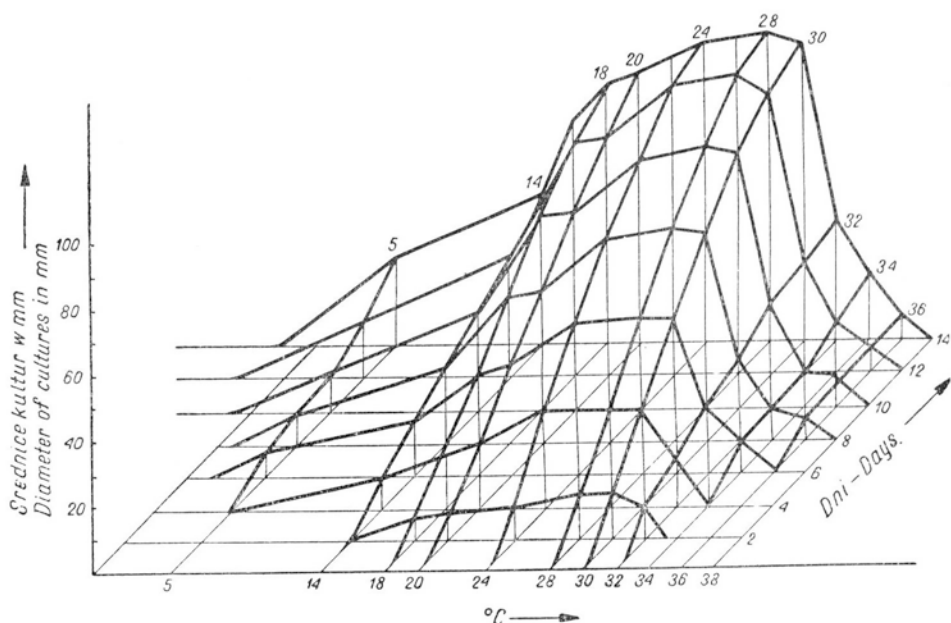
Ponieważ użycie pożywki stałej utrudniało uchwycenie zmian pH zachodzących w czasie wzrostu grzyba, dodatkowo i to dwukrotnie przeprowadzono badanie wzrostu *C. atramentarium* przy pH 3,0—11,0 w płynnej pożywce Richarda (o składzie: glukoza 50 g, KNO_3 10 g, KH_2PO_4 5 g i MgSO_4 2,5 g na 1000 ml wody).

Przy użyciu pehametru oznaczano przez cały okres trwania hodowli zmiany pH zachodzące w kulturach grzyba, jak i w tych samych pożywkach nie zaszczepionych, trzymanych w warunkach pokojowych. Po 11 dniach wzrostu oznaczano ciężary grzybni. Wyniki tych oznaczeń również umieszczono na wykresie 3.

Doświadczenia te wykazały, że pH zarówno kultur, jak i nie zaszczepionych pożywek kontrolnych zmieniało się stopniowo z biegiem czasu. Zmiany te szły w kierunku zniwelowania wysokich wartości pH i zbliżenia ich do środkowych, zawartych w przedziale pH 5,0—8,5. Ponieważ spadek ten miał miejsce niezależnie od rozwoju grzybni, prawdopodobnie był on wynikiem rozpuszczania się w pożywkach dwutlenku węgla z powietrza. Należy więc przyjąć, że wzrost odbywał się w węższych granicach pH, a mianowicie od 4,0 do 8,5.

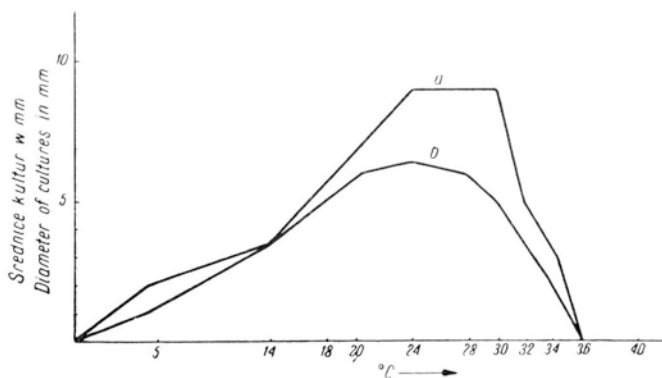
Wzrost w obu omawianych doświadczeniach wyrażony ciężarem grzybni po 11 dniach różnił się poważnie. W drugim doświadczeniu otrzymano wzrost mniej więcej równomierny w obrębie całego badanego zakresu pH. Za to w pierwszym doświadczeniu pomimo zdawałoby się identycznych warunków, zaznaczyły się wyraźne wahania we wzroście: silne maksimum przy pH końcowym 6,0 i drugie słabsze maksimum przy końcowym pH 8,0 do 8,5. Pomiędzy tymi wierzchołkami leży minimum wzrostu przy pH końcowym 7,0. Taki przebieg krzywej wzrostu przy różnych pH obserwowano dla wielu grzybów (Cochrane, 1958). Rozbieżność między wynikami dwóch identycznie założonych doświadczeń wskazuje, jak niepewne są dane takich oznaczeń wpływu pH. Wynika to z tego, że stężenie jonów wodorowych pożywki oddziałuje na wiele różnorodnych czynników określających wzrost grzyba.

Stężenie jonów wodorowych w pożywce może tak różnie wpływać na wzrost grzyba zależnie od takich czynników jak: skład i stężenie pożywki, temperatura, objętość hodowli, wreszcie okres wzrostu grzyba,



Wykres 4. Zależność wzrostu *C. atramentarium* na pożywce brzezkowej od temperatury i czasu

The growth of *C. atramentarium* on malt agar depending of temperature and time



Wykres 5. Przyrosty dobowe średnic kolonii *C. atramentarium* w różnych temperaturach:

a — po 6 dniach, b — po 12 dniach

The average daily increase of the diameters of the colonies of *C. atramentarium* in different temperatures:

a — after 6 days, b — after 12 days

że uzyskane doświadczalnie dane należy traktować jedynie jako orientacyjne, zwłaszcza gdy nie stosuje się pożywek zbuforowanych i pH pożywki zmienia się jeszcze w ciągu okresu inkubacji.

Dla temperatury 27 °C i pożywek stałej brzezkowej i płynnej Richarda stwierdzono dobry wzrost *C. atramentarium* w zakresie pH końcowego 5,0—8,5. Pewne optimum wzrostu zaznaczyło się przy pH 6,0. Dane te zgadzają się z istniejącymi na ten temat w literaturze.

Wpływ temperatury na wzrost

Celem doświadczeń było ustalenie zakresu temperatur, w których może odbywać się wzrost, i temperatur najlepszych dla wzrostu oraz dla zarodnikowania.

Kultury hodowano na pożywce brzezkowej w szalkach Petriego o średnicy 10 cm w różnych stałych temperaturach w termostatach i w lodówce. W obserwacjach wstępnych oceniono, że różnice temperatury wpływają głównie na tempo wzrostu, a rozwój grzybni na grubość i jej zagęszczenie są mniej więcej równomierne, więc porzeczano na pomiarach liniowych, które prowadzono co 2 dni do 14 dnia wzrostu. Badano wzrost w następujących temperaturach: 5, 14, 18, 20, 24, 28, 30, 32, 34, 36 i 40 °C. Zależność wzrostu *C. atramentarium* od temperatury i czasu przedstawiono na wykresie 4. Obliczono również przyrosty dobowe średnic kolonii w miarę upływu czasu, w różnych temperaturach, obrazujące zmiany tempa wzrostu (wykres 5).

Z analizy otrzymanych danych wynikają następujące wnioski. Wzrost jest możliwy w temperaturach od 0 do 37 °C. W temperaturach 5 i 34 °C wzrost rozpoczyna się późno dopiero po 4 dniach i do 10—12 dni przebiega wolno. W temperaturze 5 °C przyrosty dzienne w tym okresie wynoszą 1,0—2,0 mm, w temp. 14 °C zaś 3,5 mm, po 14 dniach tempo wzrostu w tych temperaturach gwałtownie wzrasta. W temperaturach 18—20 °C wzrost zaczyna się po 4 dniach, przyrosty wynoszą 6—7 mm dziennie. Dobry wzrost notujemy w temp. 18—30 °C, optymalny — w temp. 24—30 °C. Przyrosty dzienne w temp. 24—30 °C wynoszą 6—9 mm. Powyżej 30 °C tempo wzrostu spada, w temp. 32 °C przyrosty dzienne wahają się w granicach 1,5—3,4 mm. W temp. 34—36 °C przyrosty są już zupełnie nieznaczne.

Uwzględniając, że hodowle prowadzono w szalkach Petriego o średnicy 10 cm, co ograniczało zasób związków pokarmowych i możliwość dalszego rozrastania się, można zauważyć, że tempo wzrostu w temp. 15—30 °C osiąga maksymalną wartość po 6 dniach, utrzymuje się na mniej więcej jednakowym poziomie do 10 dni, po czym spada. W temperaturach niższych wzrost na tym poziomie odbywa się dopiero po

12 dniach. W temperaturach wyższych tempo wzrostu jest nieznaczne, a po 10 dniach jeszcze wolniejsze, pomimo że kolonie nie dorastają do brzegu szalki. Optymalny zakres temperatur wyróżnia się więc maksymalnym tempem wzrostu.

Nie stwierdzono wpływu temperatury na tworzenie się i wygląd sklerocjów. Gdy kultura rośnie w warunkach gwałtownych zmian temperatury, tj. temperatura wzrostu kolejno waha się od temperatur niższych od 20 °C do bliskich 30 °C, wtedy na zarysie kolonii widoczne są koliste wgłębienia w momentach, w których wzrost uległ gwałtownemu zahamowaniu w niskiej temperaturze. Nie polegają one jednak na różnicach w wielkości sklerocjów.

Poważny wpływ wywiera temperatura na obfitość zarodnikowania oraz żywotność strzępek rozwijających się w wyższych temperaturach i żywotność zarodników tworzących się w tych temperaturach, jak stwierdzono to doświadczalnie w badaniach nad kiełkowaniem zarodników.

W niskich temperaturach zarodnikowanie rozpoczyna się później (w temp. 18 °C dopiero po 14 dniach) i jest słabe. W temp. 23–28 °C zarodnikowanie rozpoczyna się po 5 dniach i jest bardzo obfite. W temp. 34 °C również tworzy się bardzo dużo konidiów. Jednakże stwierdzono, że zarówno ze względu na ich wygląd i zdolności kiełkowania, jak również wygląd i wzrost strzępek rostkowych rozwijających się z tych zarodników, trzeba je uznać za mniej żywotne.

W doświadczeniu na pożywce brzezkowo-agarowej w oparciu o pomiary przyrostów liniowych stwierdzono wzrost *C. atramentarium* w granicach temperatury: 0–37 °C, dobry wzrost w temp. 18–30 °C, optymalny 24–30 °C. Wyniki te zgadzają się w ogólnych zarysach z danymi uzyskanymi w pracach podanych na wstępie.

Wartości graniczne raczej są zbieżne, nieznaczne różnice pomiędzy trzema szczepami z ziemniaka, pomidora i konopi można stwierdzić dla temperatur optymalnych. Dla izolatu z konopi (Hoffmann, 1959) temperatury dobre i optymalne dla wzrostu są trochę niższe, dla ziemniaka trochę wyższe od tych danych uzyskanych dla izolatu z pomidora.

Wpływ temperatury na kiełkowanie zarodników

Wpływ temperatury na kiełkowanie zarodników konidialnych *C. atramentarium* badali Kendrick i Walker (1948) oraz Hoffmann (l. c.). Ten ostatni autor podaje również wpływ pH na kiełkowanie.

W doświadczeniach wstępnych przebadano wpływ środowiska na kiełkowanie zarodników konidialnych *C. atramentarium*, a następnie badano zależność tego procesu od temperatury.

Sposób i przebieg kiełkowania. Zarodniki konidialne *C. atramentarium* zarówno te, które tworzą się na zakażonym materiale po umieszczeniu go w wilgotnej komorze, jak i te, które powstają w sztucznej kulturze szczególnie obficie w pierwszych dniach jej rozwoju są natychmiast po wytworzeniu zdolne do kiełkowania. Kiełkują one łatwo, bardzo szybko i przeważnie w procencie bliskim 100. Kiełkowanie jest zupełnie zadowalające na stałych podłożach naturalnych, jak np. tkanki roślinne, bibuła filtracyjna i pożywki stałe, jak również w kroplach wody czy roztworów wodnych substancji odżywczych. Zasobność podłoża w składniki pokarmowe sprzyja szybkości kiełkowania, a zwłaszcza wzrostowi strzępek rostkowych. Koniecznym warunkiem kiełkowania, jak to już stwierdził Schmiedeknecht (1956) jest obecność kropli wody, a przynajmniej bardzo wysokiej wilgotności powietrza bliskiej 100% wilgotności względnej.

Przy kiełkowaniu zarodniki nabrzmiwiają, czasem uwidacznia się w nich pośrodku przegroda. Strzępki rostkowe wyrastają przeważnie z końców zarodników i to dość często z obu lub z boku zarodnika, ale na ogół nie daleko od jego końca. Kiełkowanie w optymalnych warunkach niejednokrotnie zaczyna się już po 2 godz. Po 12 godz strzępki zaczynają się rozgałęziać, a po 24 godz. często są już w poważnym stopniu splecione. W optymalnych temperaturach po upływie doby kolonie są już widoczne gołym okiem. Na strzępkach zaczynają tworzyć się nowe zarodniki o połowę mniejsze od kiełkujących. Po upływie nawet paru dni nie stwierdzono ich kiełkowania. Szczególnie obfite zarodnikowanie miało miejsce w wysokich temperaturach i przy kiełkowaniu na liściu.

Obserwowano również na końcach strzępek rostkowych powstawanie apresoriów. Tworzą się one głównie przy kiełkowaniu zarodników na liściach oraz w kropli wiszącej przy przyleganiu strzępek do szkła. Na szkiełku podstawkowym pokrytym pożywką brzeczkową są rzadko widoczne. Obserwowano poza tym w starszych kulturach — na końcach strzępek sterczących do góry w powietrze lub przylegających do szkła — szeregi ciemnych, grubościennych komórek o nieregularnych kształtach, przypominających chlamidospory.

Charakterystyczny jest rozwój strzępek w zbyt wysokich i niskich temperaturach. W tych pierwszych strzępki są grubsze i jakby zdeformowane, o minimalnych przyrostach na długość. W niskich temperaturach następuje jakby zagęszczenie treści komórkowej kiełkującego zarodnika powodujące silne załamywanie światła przy obserwacji mikroskopowej. Występuje wówczas wyraźna przegroda w środku zarodnika i tworzące się strzępki dzielą się również jakby na fragmenty ciemne, błyszczące, wypełnione łamiącą światło treścią i jasne, puste, tylko o zarysach zewnętrznych.

Eksperymentalnie badano następujące zagadnienia: 1 wpływ zasobności podłoża na kiełkowanie, 2 wpływ temperatury na kiełkowanie konidiów i wreszcie 3 wpływ temperatury na żywotność i zdolność kiełkowania zarodników.

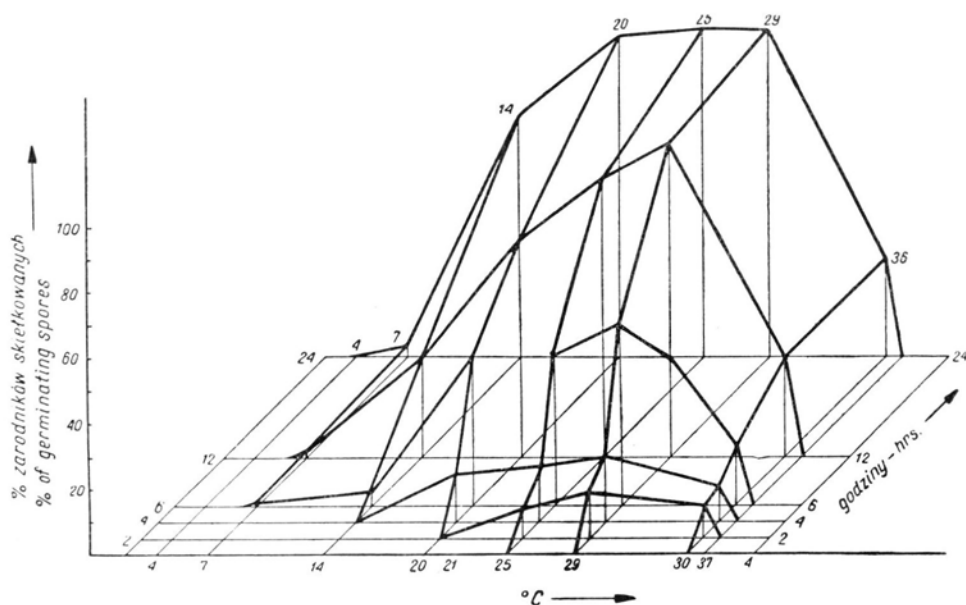
Dla wybrania metody kiełkowania przebadano kiełkowanie konidiów *C. atramentarium* w kropli wiszącej i w kropli kładzonej na szkiełkach przykrywkowych pokrytych pożywką agarową. W kropli wiszącej kiełkowanie miało prawidłowy przebieg, ale ponieważ ta druga metoda zapewniała zarówno lepszy rozwój kiełkujących strzępek, jak i łatwiejszą obserwację, pomiary i wykonywanie rysunków zdecydowano poprzestać na niej. Do badań używano zawiesiny zarodników w wodzie sterylizowanej. Badano kiełkowanie kładąc krople o mniej więcej równej objętości pobierane z zawiesiny o tym samym stężeniu po kilka (2—4) na szkiełku podstawkowym pokrytym sterylnie z jednej strony cienką warstwą pożywki agarowej. Szkiełka z kroplami umieszczano w szalkach Petriego wyłożonych wilgotną bibułą i wstawiano do określonej temperatury. Po upływie oznaczonej ilości godzin liczono ogólną ilość zarodników w poszczególnych kroplach i ilość zarodników skiełkowanych w danym czasie. Ogólną ilość zarodników w kropli kontrolowano przy kolejnych liczeniach. Poza tym dokonywano pomiarów strzępek rostkowych. Ponieważ kiełkowanie przebiegało bardzo szybko w każdym doświadczeniu zakładano dwie serie — rano i wieczorem — aby móc prowadzić obserwacje nawet co 2 godziny. Na każdą kombinację doświadczenia przeznaczano 4—12 kropeł. Dla porównywania wyników sumowano ogólną ilość zarodników we wszystkich kroplach z danej kombinacji, jak również ilość zarodników skiełkowanych oraz obliczano ich procent.

Ponieważ doświadczenia wstępne wykazały, że rozwój strzępek rostkowych jest znacznie silniejszy w roztworze (1 : 3) brzezki niż w wodzie destylowanej i na pożywce brzezkowej niż na 2% roztworze agaru w wodzie destylowanej, w dalszych badaniach używano do pokrywania szkiełek podstawkowych wyłącznie pożywki brzezkowo-agarowej.

Zakres badanych temperatur i czas prowadzenia obserwacji, jak również wyniki liczbowe uwidoczniono na wykresie 6.

Z danych tych wynika, że kiełkowanie może się odbywać w zakresie temperatur od 4 do 37 °C, poza tymi granicami kiełkowania nie stwierdzono. Dobrze przebiega kiełkowanie w temp. 20—30 °C, optymalnie w temp. 28—30 °. W temp. 20—36 °C kiełkowanie rozpoczyna się już po 2 godzinach, po 6 godzinach procent skiełkowanych zarodników jest bliski 50, a po 24 godzinach osiąga przeważnie 100.

Wyraźny jest wpływ temperatury na długość strzępek rostkowych, zwłaszcza po 12 i 24 godzinach. Po 6 godzinach długość strzępek wynosi kilkanaście mikronów i niezbyt się różni w poszczególnych temperatu-



Wykres 6. Kielkowanie zarodników *C. atramentarium* w zależności od temperatury i czasu

The germination of *C. atramentarium* spores depending of temperatures and time

rach powyżej 20 °C. Po 12 godzinach długość ta w temp. 20—25 °C wynosi 20—40 μ , podczas gdy w temp. 28 °C może dochodzić do 260 μ . Po 24 godzinach strzępki są już silnie rozgałęzione a długość ich dochodzi do 200 μ w niższych temperaturach, do 580 μ zaś w temperaturach optymalnych.

Obserwowano również tworzenie się wtórnych konidiów na kiełkujących strzępkach. Stawało się ono wyraźnie intensywniejsze wraz ze wzrostem temperatury. Dość obfite zarodnikowanie obserwowano już w temperaturach 24—28 °C, ale najobfitsze było w temp. 34°.

Pomimo dość dobrego a zwłaszcza szybkiego kiełkowania konidiów w temperaturach powyżej 30 °C i szybkiego wzrostu strzępek rostkowych, stwierdzono w tych temperaturach pewną degenerację wykiełkowanych strzępek. W temperaturze 35—36 °C zdarzały się serie doświadczalne, w których bardzo szybko wykiełkowały najżywoźniejsze zarodniki, a potem już procent skielkowanych zarodników nie wzrastał.

Dla uchwycenia wpływu wysokich temperatur na żywotność konidiów przeprowadzono doświadczenie z kiełkowaniem zarodników dwojako pochodzenia. W pierwszej serii doświadczenia zarodniki zebrano z kultury hodowanej w 20 °C, w drugiej serii — w temp. 34 °C. W temp.

20 °C, zarodnikowanie było słabsze, ale zarodniki były duże, bardzo regularne. W temp. 34 °C zarodnikowanie było bardzo obfite, ale wytworzone konidia były niewielkie i nieregularne. Kielkowanie prowadzono w temperaturach 20, 28, 34 i 37 °C. Wyniki doświadczenia obrazuje tabela 2.

Kielkowanie zarodników w drugiej serii przebiegało szybciej niż w pierwszej, ale po 24 godzinach procent skielkowanych zarodników w obu seriach wyrównał się, a nawet w temp. 34 °C procent skielkowanych konidiów w drugiej serii był niższy, gdyż nie dochodził do 50. W 37 °C wykiełkowała tylko nieznaczna ilość zarodników, która w miarę upływu czasu już nie wzrastała. Kielkowanie zaczęło się w pierwszej serii po 24 godzinach, a w drugiej już po 8 godzinach. Jak widać na przykładzie kiełkowania w temp. 34 °C uprzednia hodowla w tej temperaturze nie wpłynęła na przyzwyczajenie organizmu do tej temperatury. W mniej korzystnych warunkach temperatury wyraźnie wystąpiło osłabienie konidiów. Jeszcze wyraźniej odbiło się ono na wyglądzie i rozwoju strzępek rostkowych. Strzępki te w pierwszej serii we wszystkich temperaturach były dłuższe, silniejsze i bardziej rozgałęzione, podczas gdy w drugiej — krótsze, słabo rozgałęzione i zdeformowane.

DYSKUSJA

Uzyskane dane pozwalają na scharakteryzowanie szczepu *C. atramentarium* z pomidorów i dostarczają materiału do poznania biologii grzyba. Pod względem wymagań w stosunku do temperatury, pH podłoża i składników pokarmowych rozpatrywany szczep wyizolowany z korzeni pomidora nie różni się istotnie od innych opisywanych w literaturze izolatów z ziemniaka, konopi, czy owoców pomidora. Mutanty w kulturze wyróżniane przez niektórych autorów (Scott, 1923/24; Dickson, 1923 i 25; Défago i Gasser, 1943) na podstawie różnic w wielkości, gęstości i rozmieszczeniu sklerocjów zależą w dużym stopniu od zasobności w pokarm podłoża, ewentualnie mniej lub bardziej korzystnego układu takich warunków jak pH środowiska lub temperatury. W warunkach naturalnych podobne czynniki, ale w tych wypadkach zależne od rośliny żywicielskiej, mogą również wpływać na charakter sklerocjów. Na przykład Hoffmann (1959) opisał odmienne tworzenie sklerocjów na konopiach.

Przytoczone dane wskazują, że mogą istnieć w obrębie gatunku *C. atramentarium* typy różniące się pod względem morfologicznym zależnie od warunków wzrostu dostarczanych im przez poszczególnych żywicieli.

Charakteryzując biologiczne właściwości *C. atramentarium* na podstawie otrzymanych danych i istniejących w literaturze stwierdzamy, że pod względem wymaganych warunków ma on szerokie możliwości rozwojowe. Doskonale jest przystosowany do wykorzystywania bogatych w węgiel i azot resztek organicznych. Jednocześnie rozporządzając bogatym zasobem enzymów (Schmiedeknecht 1956) jest w stanie rozkładać bardziej złożone związki organiczne, np. rozwijać się na podłożach o przeważającej zawartości celulozy. Jego znaczna szybkość wzrostu grzybni, dość obfite zarodnikowanie, łatwość kiełkowania zarodników i sklerocjów w warunkach wysokiej wilgotności i przy sprzyjającej temperaturze umożliwiałyby mu szybkie opanowywanie bogatych w związki węglowodanowe podłoża, gdyż takimi właśnie cechami charakteryzuje Garrett (1956) tzw. przez niego „sugar fungi”. Jednakże *C. atramentarium* prawdopodobnie stracił zdolność do konkurencji z typowymi drobnoustrojami glebowymi. Niemożność wyizolowania go z roztworów glebowych świadczy o jego niezdolności do swobodnego wzrostu i rozmnażania się w glebie poza resztkami organicznymi. Istnieją również w literaturze dane o silnej wrażliwości tego grzyba na działanie antagonyistyczne innych drobnoustrojów (Ettig 1955 i 58).

Wszystko to przesądza, że *C. atramentarium* nie może być uważany, jak czynią to niektórzy autorzy, np. Bremer (1954), za grzyba glebowego (soil inhabiting fungus wg Garrettta), lecz za grzyba porażającego korzenie (root-infecting).

Grzyb ten nie ma zbyt wielkich możliwości w warunkach konkurencji opanowywania zjawiających się w glebie martwych substancji organicznych. Za to ma pełną zdolność atakowania żywych korzeni i łodyg roślin. Świadczą o tym badania mechanizmu infekcji prowadzone przez Schmiedeknechta (1946) w stosunku do ziemniaka, Hoffmanna (1959) w stosunku do konopi i własne dla pomidora. Wnika on przez nie uszkodzone tkanki do tych organów i jest w stanie przezwyciężyć reakcje obronne rośliny.

Zanim przejdziemy do przedyskutowania jego zdolności pasożytniczych, wydaje się wskazane rozpatrzyć omawiane wymagania rozwojowe *C. atramentarium* w powiązaniu z wymaganiami rozwojowymi pomidora. Porównując wymagania grzyba i pomidora jako żywiciela w stosunku do temperatury stwierdzamy dużą ich zbieżność. *C. atramentarium*, jak podaje Schmiedeknecht (1956), jest organizmem higrofilnym, jednakże wydaje się, że wysokie wymagania w stosunku do wilgotności odnoszą się głównie do kiełkowania zarodników i sklerocjów, ewentualnie do zarodnikowania w warunkach naturalnych. Konieczność obfitego zaopatrywania w wodę rośliny-żywiciela, zwłaszcza od momentu zawią-

zania owoców, stwarza grzybowi możliwość nagromadzenia w glebie inokulum i dokonania infekcji.

Charakterystyczne dla *C. atramentarium* krótkie okresy intensywnego zarodnikowania (Wasilewski i Karakulin 1950) oraz szybkość i łatwość przechodzenia w przetrwalnikową formę sklerocjalną wiążą się z zaistnieniem określonego układu warunków zewnętrznych wpływających na te procesy rozwojowe. Oczywiście, że decydujące znaczenie dla nich ma zaopatrzenie w pokarm. Przy wykorzystywaniu obfitego źródła pokarmu odbywa się szybki rozwój grzybni i zarodnikowanie. W momencie gdy pokarm jest wyczerpany, grzybnia zdąży zazwyczaj wykształcić już utwory przetrwalnikowe — sklerocja, które umożliwiają organizmowi doczekanie się nowego przyływu substancji pokarmowych, jak również i odpowiedniej wilgotności, koniecznej dla rozwoju sklerocjów, zarodnikowania i zainfekowania nowych źródeł pokarmu. Najnowsze badania (Ettig 1958; Schmiedeknecht 1959) wskazują, że również konidia w warunkach wyczerpania pokarmu i działania antagonistycznego są zdolne do przekształcania się w formy przetrwalnikowe — chlamidospory.

Nakreślona charakterystyka rozwoju *C. atramentarium* odpowiada jego przebiegowi w roślinie pomidora. Grzyb ten zasiedla najgęściej warstwę korową zarówno korzeni, jak i łodyg obfitującą w łatwo dostępny pokarm, po wykorzystaniu którego tworzą się w niej sklerocja. W dalszych partiach tkanek nie rozrasta się już tak szybko i obficie, przenikając głównie poprzez promienie rdzeniowe o komórkach żywych, zawierających plazmę i cienkościennych. Charakterystyczne jest rzadkie i krótkie zarodnikowanie w tkankach roślinnych w warunkach naturalnych. Szczególnie na łodygach pomidorów zdarza się tylko w wybitnie wilgotnej atmosferze.

W świetle rozpatrywanego wpływu warunków zewnętrznych na rozwój grzyba i żywiciela wydają się korzystne dla grzyba, a niepomyślne dla rośliny warunki wysokiej temperatury, pochmurnej pogody i wysokiej wilgotności powietrza.

WNIOSKI

1. Stwierdzono dość szeroki zakres warunków, w których grzyb ten może się rozwijać, zarówno jeżeli chodzi o wartości pH, granice temperatur dla wzrostu i kiełkowania, jak i wymagania pokarmowe.
2. W optymalnych warunkach, szczególnie temperatury, grzyb odznacza się dość szybkim wzrostem, przyrosty na dobę wynoszą 5—10 mm.
3. Pomimo że *C. atramentarium* może rosnąć na dość ubogich podłożach, jak bibuła filtracyjna czy plewy, to jednak podłoża zasobne

w związku węglowodanowe i azotowe wybitnie sprzyjają wzrostowi, przy czym obfitszy i dłuższy jest rozwój grzybni przed wytworzeniem się sklerocjów.

4. Zaobserwowano, że wygląd, wielkość i rozmieszczenie sklerocjów, jak i wygląd samej grzybni silnie zależą od zasobności w pokarm podłoża oraz innych warunków wzrostu, a nie są związane z pochodzeniem izolatu.

5. Zarodnikowanie w optymalnych warunkach przebiega szybko i intensywnie. Gdy zasoby pokarmowe zostaną wyczerpane lub niekorzystny stanie się inny czynnik wpływający na wzrost, następuje tworzenie sklerocjów. Okresy zarodnikowania przeważnie są krótkie.

6. Sklerocja nie wymagają ustalonego okresu spoczynku, w warunkach wysokiej wilgotności łatwo kiełkują i mogą tworzyć złoża zarodników.

7. Zarodniki kiełkują również łatwo i szybko, przy czym na strzępkach rostkowych tworzą się apresoria i nowe zarodniki.

8. Wysokie temperatury (powyżej 30 °) wpływają bardzo niekorzystnie na żywotność tworzących się wówczas zarodników.

Pracownia Fitopatologiczna

(Wpłynęło: 3.11.1961)

Zakładu Ekologii PAN

Kierownik prof. dr J. Kochman

SUMMARY

In the years 1956 to 1958 reduced growth, premature dying off, and the damaging of roots by sclerotia of fungi were reported in tomato crops from the regions of Warsaw and Lublin. At the same time greenhouse tomato crops in the regions of Warsaw and Łódź withered and died off as a result of severe damage in roots.

Investigations revealed that the destruction of crops was caused by *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. belonging to the *Melanconiales*, *Fungi Imperfecti*. Pure cultures of the fungus were isolated from the roots, stems, and fruit of the tomato plants. There were no significant differences between the particular isolated cultures in their morphological traits and developmental properties.

Some biological properties of the fungus grown on artificial culture media were examined. Experiments on the nutrition requirements of the fungus showed that, though it could develop on rather poor substrata, an abundant supply of hydrocarbons and nitrogen compounds very strongly favoured vegetative growth and sporing, and retarded the transition to the resting sclerotium form. The richness of the substratum

had a marked influence on the appearance of the mycelium and the sclerotia.

As to the utilization of carbon compounds the fungus could develop on mono- and disaccharides as well as on the more complex hydrocarbons. The growth was very vigorous on maltose and saccharose, vigorous on glucose, mannose and fructose, and weak on xylose; on lactose, galactose, and sugarless media there was no growth.

The next to be investigated were various nitrogen compounds. The best sources of nitrogen for this as well as for most other fungi were glutaminic acid, asparagine, glycine, peptone, and urea. It was found that the fungus assimilated nitrogen in the form of nitrates and of ammonium compounds (ammonium oxalate). There was no growth on phenylalanine.

The influence of the pH of the substrata on the growth of *C. atramentarium* were studied on unbuffered nutrient media; the results indicated that the pH of the nutrients tended to change from extreme towards medium values, which was specially true in the case of strongly alkaline media. The growth was vigorous for the pH range 5.0—8.5.

The growth of *C. atramentarium* took place in the temperature range 0—37°C and was vigorous in the range 18—30°C with the optimum at 24—30°C. Temperature did not affect the appearance of the mycelium and of the sclerotia, but in extreme temperatures the hyphae did not grow well and were misshaped. The optimum range of temperatures was marked by the highest rate of growth. Sporing also was very strongly influenced by temperature and was abundant within the range 23—28°C; at temperatures above 30°C spores were very abundantly formed, but their viability was low.

The germination of spores under conditions of high humidity was easy and rapid (after only 2 hours); the germination rate of the spores was nearly 100 per cent. The presence of nutrients favoured germination and the development of vegetative hyphae. Germination could take place in the temperature range 4—37°C and proceeded vigorously within the range 20—30°C with the optimum in the range 28—30°C.

The paper reviews from the assembled evidence on the biological properties of *C. atramentarium* the ability of this fungus to saprophytic development and to parasitism in tomato. The fungus is fully adapted to tomato as its host.

LITERATURA

1. Arx J. A., 1957, Die Arten der Gattung *Colletotrichum*, Phytopath. Zeitschrift. 29:4.
2. Bewley W. F., 1916, A new root disease of the tomato, Mycol. Rept. of the 8th Ann. Rept. Exp. and Res. Sta. Cheshunt Eng. 34.
3. Bremer H., 1954, Beobachtungen zur Wurzelfäule in Trockenklima. Z. PflKrankh. 61(11):575.
4. Cochrane V. W., 1958, Physiology of Fungi, J. Viley and Sons N. Y.
5. Défago G. et Gasser P., 1943, La dartrose de la pomme de terre, Ber. Schweiz. Bot. Gesellschaft. (53) A:480.
6. Dickson B. T., 1926, The „black dot” disease of Potato, Phytopathology 16, 23.
7. Eben M. H. & Williams P. H., 1956, Brown root of Tomatoes. I. The associated fungal flora, Ann. Appl. Biol. 44(3):425.
8. Garrett S. D., 1956, Biology of root infecting fungi.
9. Hoffmann G. M., 1959, Untersuchungen ueber die Anthraknose des Hanfes (*Cannabis sativa* L.), Phytopath. Zeitschrift 35(1):31.
10. Jakubczyk H., 1961, O występowaniu grzybów z rodzaju *Colletotrichum* Cda. na owocach pomidorów, Acta Agrobotanica 10, (1):29.
11. Kendrick J. B. & Walker J. C., 1948, Anthracnose of tomato, Phytopathology, 38:247.
12. McKay R., 1942, Tomato root rot — *Colletotrichum atramentarium* J. Dep. Agric. Irish. Free St. 39:272 (RAM 43:378).
13. McNeill B. H., 1955, *Colletotrichum* root rot of greenhouse Tomatoes, Plant Dis. Rept. 39(1):45 (RAM 32:543).
14. McNeill B. H., 1957, *Colletotrichum atramentarium* in field Tomatoes, Plant Dis. Rept. 41(12):1032.
15. Miczyńska Z. i Wnękowski St., 1957, *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. jako czynnik chorobotwórczy. Postępy Nauk Roln. 4(46):101.
16. Schmiedeknecht M., 1956, Untersuchungen des Parasitismus von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. an Kartoffelstauden (*Solanum tuberosum* L.) Phytopath. Zeitschrift 26.
17. Williams P. H., 1928, Fungi occurring in tomato roots, Rept. Exp. Res. Sta. Cheshunt, 14(42):84.
18. Williams P. H. & Ebben M. H., 1951, Brown root rot of the tomato. Rept. Exp. Res. Sta. Cheshunt. 37:22.