

Mikoflora fyllosfery

ELŻBIETA CHRUSCIAR

Instytut Gleboznawstwa i Chemii Rolnej Akademii Rolniczej
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

Chrusciak E.: (Institute of Soil Science and Soil Chemistry Warsaw Agricultural University, Rakowiecka 26/30, 02-528 Warsaw, Poland). *Mycoflora of phyllosphere*. Acta Mycol. 10(1): 173-180, 1974.

The qualitative content of the mycoflora of the phyllosphere of *Sambucus nigra*, *Taraxacum officinale*, *Secale cereale* and *Brassica napus* was examined. The dominance of yeast-like fungi from the genera *Trichosporon*, *Torulopsis* and *Rhodotorula* on the leaves of *Sambucus nigra* and of *Torulopsis* on the leaves of *Taraxacum officinale* was observed. In the phyllosphere of *Secale cereale* and *Brassica napus* the number of these fungi was more limited. An attempt was made to isolate strains capable of decomposition of proteins, lipids, pectin and cellulose from the obtained fungi was made.

WSTĘP

Termin fyllosfera zaproponowali niezależnie od siebie Ruinen (1956) i Last (1955), określając nim przez analogię z ryzosferą środowisko, jakim jest powierzchnia liścia. Na liściach bytuje wiele drobnoustrojów znajdujących warunki rozwoju dzięki wydzielinom tego organu. Według określenia Ruinen fyllosfera jest środowiskiem ekologicznym całkowicie „zaniedbanym”.

Z pracy przeglądowej Kermen (1968) poświęconej temu zagadnieniu wynika, że brak dotychczas badań obejmujących całokształt populacji drobnoustrojów jakiegokolwiek rośliny. Większość doniesień stanowią prace nad poszczególnymi grupami mikroorganizmów czy nawet pojedynczymi gatunkami badanymi na różnych obiektach (Bhurat, Sen 1968; Shende 1968). Pionierskie obserwacje Ruinen (1956, 1961, 1965, 1970) są reprezentatywne dla strefy tropikalnej. Cytowani autorzy podają, że bodaj najpospolitszymi mikroorganizmami rozwijającymi się na liściach różnych roślin są grzyby drożdżoidalne.

MATERIAL I METODY

Niniejsze doniesienie poświęcone jest badaniom jakościowym i ilościowym mikoflory epifilicznej czterech roślin: dwóch uprawnych — *Secale cereale* i *Brassica napus* oraz dwu dziko rosnących — *Sambucus nigra* i *Taraxacum officinale*. Pochodziły one z różnych siedlisk — dwie pierwsze ze zbiorowiska ruderalnego w Warszawie, pozostałe z poletek w Wilanowie. W obu zespołach starano się pobierać próbki liści roślin blisko ze sobą sąsiadujących, chodziło bowiem o ustalenie, czy skład gatunkowy mikoflory fyllosfery różnych roślin danego stanowiska jest zbliżony, czy też jest determinowany przez wydzieliny liści konkretnych gatunków roślin.

Do poszczególnych analiz pobierano po 20 zdrowych liści każdej rośliny (terminy pobrania próbek podano w tab. 2). Liście *Sambucus nigra* pochodziły z dolnych części rośliny (do kilku analiz dla porównania pobrano także z górnej partii), natomiast liście *Taraxacum*, *Secale* i *Brassica* wybierano losowo z różnych części roślin.

Bezpośrednio po przeniesieniu liści w jałowych woreczkach z folii do laboratorium wycinano z nich fragmenty o powierzchni 1 cm². Umieszczano je w kolbkach zawierających 10 ml jałowej wody i poddawano wytrząsaniu na wstrząsarce (uniwersalna typ WU-2, 90 wahań/min) w ciągu 10 minut.

Dla określenia ogólnej liczby występujących grzybów popłuczyny z powierzchni wycinków liści wysiewano po 0,2 ml do płytek Petriego z podłożem Martina, w pięciu równoległych powtórzeniach. Aby ustalić ogólną liczbę drobnoustrojów tę samą zawiesinę wysiewano na agar odżywczy (bulion mięsny zestalony 2% agarem). Wszystkie płytki inkubowano przez 3-5 dni w temperaturze 28°C. Po okresie inkubacji obliczano na podstawie ilości wyrosłych kolonii liczebność grzybów oraz tzw. ogólną liczbę drobnoustrojów. Szczepy grzybów izolowano i określano ich przynależność systematyczną.

Równolegle z opisanym wyżej wysiewem stosowano przyjętą w podobnych badaniach technikę odciskową — na agaryzowanym podłożu Martina odciskano górną lub dolną powierzchnię liścia. Tą drogą uzyskiwano niejednokrotnie szczepy grzybów, których nie izolowano metodą wyżej opisaną.

Wychodząc z założenia, że w rozwoju grzybów w fyllosferze pewną rolę odgrywają wytwarzane przez nie enzymy, ograniczono doświadczenia do ujawnienia poligalakturonazy, lipazy, celulazy i proteaz, ponieważ większość grzybów rozkłada cukry proste i dwucukry. Zdolność do rozkładu pektyny określano wg metody podanej przez W i e r b i n ą (1969).

Rozkład tłuszczów badano na podłożu o składzie — 1% agar wodny

z dodatkiem 10 g/l tłuszczu, błękit bromotymolowy jako wskaźnik. Wokół szczepów grzybów lipolitycznych obserwowano zmianę zabarwienia podłoża z niebieskiego na żółte pod wpływem wytworzonych wolnych kwasów tłuszczowych.

Tabela 1 — Table 1

Grzyby wyizolowane z fyllosfery w sezonie wegetacyjnym 1970 r.
Fungi isolated from the phyllosphere in the vegetative season 1970

<i>Sambucus nigra</i>	<i>Taraxacum officinale</i>
<i>Alternaria tenuis</i> Nees <i>Aspergillus candidus</i> Link <i>Cephalosporium acremonium</i> Corda <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link <i>Fusarium arenaceum</i> (Fr.) Link <i>Gelasinospora retispora</i> Cain <i>Mucor fragilis</i> Bain. <i>Oidium lactis</i> Fres. <i>Paecilomyces elegans</i> (Corda) Mason et Hughes <i>Penicillium rugulosum</i> Thom <i>Rhodotorula glutinis</i> (Fres.) Harrison <i>Torulopsis inconspicua</i> Lodder <i>Trichosporon capitatum</i> Diddens et Lodder <i>Trichothecium roseum</i> Link	<i>Alternaria tenuis</i> Nees <i>Aspergillus fumigatus</i> Fres. <i>A. nidulans</i> (Eidam) Winter <i>A. sydowi</i> (Bain. and Sart.) Thom <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link <i>Fusarium</i> sp <i>Hormiscium stilbosporum</i> (Corda) Sacc. <i>Heterosporium gracile</i> Klotzsch. <i>Mucor fragilis</i> Bain. <i>M. microsporus</i> Namyslewski <i>M. plumbeus</i> Bon. <i>Oidium lactis</i> Fres. <i>Paecilomyces elegans</i> (Corda) Mason et Hughes <i>Rhodotorula glutinis</i> (Fres.) Harrison <i>Torulopsis inconspicua</i> Lodder
<i>Secale cereale</i>	<i>Brassica napus</i>
<i>Alternaria tenuis</i> Nees <i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link <i>Coniothyrium fuckelii</i> Sacc. <i>Fusarium gramineum</i> Corda <i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg <i>Rhodotorula glutinis</i> (Fres.) Harrison <i>Trichoderma glaucum</i> Abbott	<i>Alternaria tenuis</i> Nees <i>Aspergillus fumigatus</i> Fres. <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link <i>Mucor fragilis</i> Bain. <i>Penicillium</i> spp <i>Rhodotorula glutinis</i> (Fres.) Harrison <i>Torulopsis inconspicua</i> Lodder

Rozkład białka badano na żelatynie odżywczej, przyjmując za szczepy proteolityczne wykazujące upłynnienie podłoża.

Jako grzyby celulolityczne traktowano te, które na pożywce Dubosa z paskami bibuły jako jedynym źródłem węgla powodowały w nich ubytki i przebarwienia.

WYNIKI

Na podstawie listy wyizolowanych gatunków grzybów łatwo przekonać się o znacznym podobieństwie składu mikoflory fyllosfery roślin pochodzących z tego samego stanowiska (tab. 1). Zwraca uwagę dominujący udział grzybów drożdżoidalnych z rodzajów *Trichosporon*, *Rhodotorula* i *Torulopsis* w fyllosferze *Sambucus* oraz *Rhodotorula* i *Torulopsis* w fyllosferze *Taraxacum* (tab. 2). Ich populacja stanowiła przeciętnie 50-60% ogólnej liczby grzybów w kolejnych analizach. Udział tych grzybów w fyllosferze żyta i rzepaku wynosił 5-15%. W o z n i a k o w s k a j a (1962) także podaje, że na liściach roślin dziko rosnących bytuje znacznie więcej grzybów drożdżoidalnych niż na roślinach zbożowych. Pozostałe z wyodrębnionych grzybów reprezentują pospolicie występujące rodzaje, spotykane m. in. w glebie, nanoszone przez wiatr, wodę, owady.

W ciągu sezonu wegetacyjnego obserwowano dość znaczne wahania w ilości izolowanych drobnoustrojów (tab. 2), wynikające przypuszczalnie ze zmieniających się czynników klimatycznych, różnic w stężeniu cukrów i innych substratów pokarmowych. Liczyć się także należy z pewnym błędem metody (płytkowej), którą posłużono się dla dokonania izolacji.

Mówiąc o ogólnej liczbie grzybów występujących na powierzchni analizowanych liści, należy pamiętać, że uzyskane wskaźniki występowania tej grupy organizmów limitowane były przez rodzaj zastosowanego podłoża — pożywka Martina jest zbyt uboga dla większości grzybów patogenicznych. Uzyskane dane są więc niepełne tak pod względem jakościowym, jak ilościowym.

Wyniki przedstawione w tabeli 2 dla *Sambucus nigra* charakteryzują liście dolnej partii wybranej do obserwacji rośliny. Nie objęto tabelą kilku analogicznych wyników uzyskanych dla górnego piętra. Dane te przykładowo przedstawione są poniżej:

Ogólna liczba	Na liściach	Data obserwacji				
		12.V	29.V	18.VI	22.VIII	21.IX
grzybów	górných	220	400	1600	4100	4220
	dolnych	1300	6300	3450	4240	8030
drobnoustrojów	górných	560	800	3550	8700	2770
	dolnych	2000	9000	3900	6200	10100

Tabela 2 — Table 2

Liczebność drobnoustrojów epiflicicznych w 1970 r. w przeliczeniu na 1 cm² liścia
 The number of epiphytic microorganisms in 1970 per cm square on of leaf

Termin pobrania próbek liści Date on which sample was collected	<i>Sambucus nigra</i>			<i>Taraxacum officinale</i>		
	ogólna liczba grzybów total number of fungi	% grzybów drożdżoidalnych % of yeast-like fungi	ogólna liczba drobnoustrojów total number of microorganisms	ogólna liczba grzybów total number of fungi	% grzybów drożdżoidalnych % of yeast-like fungi	ogólna liczba drobnoustrojów total number of microorganisms
22. IV	—	—	—	300	45	600
12. V	1300	46	2000	240	62	520
18. V	2160	52	2600	1000	60	1340
29. V	6300	70	9000	300	58	450
6. VI	3600	65	3150	150	50	700
18. VI	3450	62	3900	600	50	4450
7. VIII	4150	50	7770	5500	70	11800
22. VIII	4240	55	6200	6150	65	6150
31. VIII	5280	55	6740	1050	60	7700
8. IX	2930	60	3790	1400	62	10000
21. IX	3030	60	10100	1200	65	7100
28. IX	2970	52	10240	650	72	3240
5. X	5650	65	9960	900	52	8250
12. X	4830	53	5940	1800	55	9300
19. X	5980	62	7080	500	60	8400
29. X	6000	60	7080	900	62	6400
2. XI	7840	56	6570	1400	65	6050
		<i>Brasica napus</i>				
28. VI	180	—	1200	520	7	400
13. V	160	12	800	160	—	120
3. VI	100	—	1000	150	5	250
17. VI	200	9	5850	400	15	1100
		<i>Secale cereale</i>				

Enzymy wytwarzane przez grzyby wyizolowane w 1970 r. z fyłosfery bzu (B), mniszka (M), żyta (Z), i rzepaku (Rz)
 Enzymes formed by fungi isolated in 1970 from the phyllosphere of *Sambucus* (B), *Taraxacum* (M), *Secale* (Z) and *Brassica* (Rz)

Nazwa grzyba Species	Poligalakturonaza Polygalacturonidase			Lipaza Lipase			Proteazy Proteases			Celulaza Cellulase			
	B	M	Z	B	M	Z	B	M	Z	B	M	Z	Rz
<i>Alternaria tenuis</i>				+	+		±	±	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus candidus</i>		+		±			+	+					+
<i>Aspergillus fumigatus</i>		+											+
<i>Aspergillus nidulans</i>													
<i>Aspergillus sydowi</i>			+										
<i>Aspergillus versicolor</i>													
<i>Cephalosporium acremonium</i>	±												
<i>Cladosporium herbarum</i>													
<i>Gelasinospora retispora</i>	+			±									
<i>Heterosporium gracile</i>													
<i>Fusarium gramineum</i>													
<i>Hormiscium stilbosporum</i>													
<i>Macor fragilis</i>		+											
<i>M. microsporus</i>		+											
<i>M. plumbeus</i>		+											
<i>Oidium lactis</i>													
<i>Paecilomyces elegans</i>	+												
<i>Penicillium rugulosum</i>	+												
<i>Rhizopus nigricans</i>													
<i>Rhodotorula glutinis</i>			+										
<i>Torulopsis inconspicua</i>			+										
<i>Trichoderma glaucum</i>													
<i>Trichosporon capitatum</i>			+										
<i>Trichothecium roseum</i>													

Rożkład substratu — decomposition of substrate: ± nieznaczny — slight; + wyraźny — marked; ++ intensywny — intensive.

Wynika z nich, że na dolnych liściach *Sambucus nigra* populacja grzybów i ogólna liczba drobnoustrojów były liczniejsze. Fakt ten może być m. in. konsekwencją mechanicznego splukiwania drobnoustrojów z górnych partii w czasie deszczu (dżdżyste lato). Nie bez wpływu pozostawał przypuszczalnie także bliski kontakt gleby, jakkolwiek Stout (Kerme n 1968) podaje, że oba środowiska — gleba i fyllosfera zachowują swą integralność.

W tabeli 3 przedstawiono charakterystykę wybranych szczepów grzybów pod względem zdolności wytwarzania przez nie enzymów rozkładających pektynę, białka, tłuszcze i celulozę. Notowano dość znaczną liczbę szczepów lipolitycznych i proteolitycznych. Zdolność do rozkładu białek i lipidów pochodzących bądź z wydzielin liści, bądź z obumarłych innych mikroorganizmów ułatwiała rozwój grzybów w fyllosferze. Mniejszą rolę dla ich bytowania i zasiedlania badanego środowiska odgrywały dwa pozostałe enzymy, gdyż opisane grzyby były saprofitami. Niemniej w sytuacji, gdy liść ulega osłabieniu w warunkach nie sprzyjających, czy szkodliwych, w okresie starzenia pewne saprofity mogą stawać się okolicznościowymi patogenami (Dunleavy 1966) i wówczas enzymy te stają się czynne.

WNIOSKI

1. Na liściach *Sambucus nigra*, *Taraxacum officinale*, *Secale cereale* i *Brassica napus* występowało w sezonie wegetacyjnym 1970 r. wiele saprofitów. W mikoflorze fyllosfery roślin dziko rosnących dominowały grzyby drożdżoidalne z rodzajów *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*. W fyllosferze *Secale cereale* i *Brassica napus* stanowiły one o wiele mniej liczną populację.

2. Skład gatunkowy wyizolowanych z liści roślin tego samego stanowiska wykazywał znaczne podobieństwo.

3. W sezonie wegetacyjnym 1970 r. liczebność grzybów w fyllosferze (głównie bzu i mniszka) ulegała dość znacznym wahanom. Widoczna była tendencja wzrostu ilości grzybów (i ogólnej liczby drobnoustrojów) w miarę osiągnięcia dojrzałości liści. Obserwacja ta zgodna jest z danymi cytowanymi przez Kerme n (1968).

4. Wśród wyizolowanych grzybów wiele szczepów zdolnych było do rozkładu pektyny, celulozy, białka i lipidów.

LITERATURA

- Bhurat M. C., Sen A., 1968, Nitrogen fixing bacteria in the phyllosphere of wheat and pea, Ind. J. Agric. Sci. 38: 319-325.
Dunleavy J., Kunkel J. F., Hanway J. J., 1966, High population of Ba-

- cillus subtilis* associated with phosphorus toxicity in soybeans, *Phytopathology* 56: 83-87.
- Kermen J., 1968, Mikroflora fyllosfery, *Postępy Mikrobiologii*, VII, 1: 103-116.
- Last F. T., 1955, Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 38: 221-239.
- Ruinen J., 1956, Occurrence of *Beijerinckia* in the phyllosphere, *Nature*, 177: 220-221.
- Ruinen J., 1961, The phyllosphere I. An ecological neglected milieu, *Plant and Soil* 15: 81-109.
- Ruinen J., 1965, The phyllosphere. Nitrogen fixation, *Plant and Soil* 22: 375-394.
- Ruinen J., 1970, The phyllosphere V. The grass sheath, a habitat for nitrogen fixing microorganisms, *Plant and Soil* 33: 661-667.
- Shende S. T., 1968, Fixation of atmospheric nitrogen by phyllosphere bacteria, *Ind. J. Agric. Sci.* 38: 298-301.
- Wierbina N. M., Cycura O. I., 1969, A rapid method for selection of fungi producing pectolytic enzymes, *Mikrobiologia* 38: 372-375.
- Wozniakowskaja J. M., 1962, Epiphytic yeast organisms, *Mikrobiologia* 31: 616-622.