

Grzegorz Dubiel



OBSERWACJE GRZYBÓW Z RODZAJU *HARPOSPORIUM* – PASOŻYTÓW SAPROFAGICZNYCH NICIENI

Observations of *Harposporium* fungi – parasites of saprophagous nematodes

ABSTRAKT: Artykuł przedstawia obserwacje trzech gatunków grzybów z rodzaju *Harposporium* będących pasożytami wolnożyjących, saprofagicznych nicieni. Obserwacje przeprowadzono w populacjach nicieni rozwijających się w hodowlach bezkręgowców wymagających dużej wilgotności środowiska. Omówiono podstawowe informacje na temat biologii rodzaju *Harposporium* oraz przedstawiono prosty sposób prowadzenia obserwacji grzybów patogennych dla drobnych bezkręgowców stosowany przez autora.

SŁOWA KLUCZOWE: *Harposporium*, anamorfy *Clavicipitaceae*, grzyby patogenne dla nicieni, nicienie saprofagiczne

ABSTRACT: The article presents observations of three fungi species from the *Harposporium* genus which parasitize on free-living saprophagous nematodes. The observations were carried out on nematode populations in invertebrate cultures requiring highly humid environment. Basic information concerning the biology of the *Harposporium* genus is presented as well as a simple observation method of fungi pathogenic to small invertebrates which was applied by the author.

KEY WORDS: *Harposporium*, anamorphs *Clavicipitaceae*, fungi pathogenic to nematodes, saprophagous nematodes

Wstęp

Rodzaj *Harposporium* Lohde 1874 obejmuje niemal trzydzieści gatunków grzybów pasożytujących głównie w nicieniach i wrotkach. Zaliczany jest do rodziny *Clavicipitaceae* obejmującej także wiele innych rodzajów grzybów patogennych dla bezkręgowców. Jednostkę infekcyjną stanowią zarodniki (konidia) wytwarzane fialoblastycznie na krótkich i bardzo cienkich szyjkach kulistych lub owalnych fialid (komórek za-

rodnikotwórczych), które tworzą się bocznie pojedynczo lub w niewielkich skupieniach po 2-5, na strzępkach grzybni wyrastającej z ciała żywiciela. Struktury wytwarzane przez niektóre gatunki *Harposporium* przypominają te tworzone przez rodzaj *Hirsutella* (Hodge et al. 1997). Forma doskonała (teleomorfa) nosi nazwę *Podocrella* Seaver (Chaverri et al. 2005).

Grzyby związane z nicieniami można podzielić na cztery grupy: pasożyty wewnętrzne (nematopatogeny), grzyby nematofagicz-

ne, pasożyty jaj oraz grzyby produkujące toksyny (Wang et al. 2007). Rodzaj *Harposporium* reprezentuje pierwszą grupę. Grzyby nematopatogenne wzbudzają zainteresowanie w związku z potencjalną możliwością ich wykorzystania w biologicznej ochronie roślin. Ze względu na swoją biologię, rodzaj *Harposporium* do chwili obecnej nie spełnił tych oczekiwań, gdyż konidia zaliczanych do niego gatunków kielkują w przewodzie pokarmowym nicieni żywiących się mikroorganizmami, podczas gdy najważniejsze gospodarczo nicienie szkodliwe dla roślin zdobywają pokarm wysysając soki roślinne przy pomocy struktur przypominających sztylet. Dotychczas tylko w przypadku *Harposporium subuliforme* Drechsler wykazano możliwość infekcji poprzez adhezję i penetrację kutikuli gospodarza (Esser i El-Gholl 1992).

Celem pracy jest przedstawienie obserwacji trzech gatunków grzybów z rodzaju *Harposporium* oraz zaprezentowanie prostych metod obserwacji tych ciekawych organizmów.

Metody

W prowadzonych hodowlach bezkręgowców wymagających wysokiej wilgotności otoczenia częstym problemem jest nadmierny rozwój saprofagicznych nicieni, będący zwykle sygnałem do konieczności gruntownego czyszczenia pojemników. Przypadkowo to niepożądane zjawisko umożliwiło mi obserwację nematopatogennych grzybów, gdyż zauważyłem, że w kroplach wody skondensowanej na ściankach pojemników wykorzystywanych do hodowli niektóre z nicieni są nieruchome, a ich ciało przyjmuje mleczną barwę. Badanie mikroskopowe takich osobników wykazało porażenie ich przez grzyby z rodzaju *Harposporium*.

Przeniesienie materiału zawierającego duże ilości nicieni (np. zbutwiałych liści, fragmentów owocników grzybów) do szalki

wypełnionej wodą pozwala na prowadzenie obserwacji przez szereg kolejnych dni. Nicienie zachowują w takich warunkach żywotność i są ruchliwe. Szalki przeglądałem co 1-2 dni pod binokulem lub małym powiększeniem mikroskopu (10 x 5). Okazy porażone przez grzyby są łatwe do zauważenia, gdyż są nieruchome, mniej przejrzyste niż żywe nicienie, a na powierzchni ich ciała widoczne są wyrastające z wnętrza strzępki grzybni. Jednorazowo liczba obserwowanych martwych okazów z objawami porażenia nie przekraczała 2%, dało się jednak zaobserwować wyraźny spadek liczebności żywych nicieni w kolejnych dniach. Zwykle po około 2 tygodniach obserwacji w szalkach pojawiały się także strzępki grzybów wytwarzających swoiste pułapki w postaci pętli lub przyłg, należące do troficznej grupy grzybów określanej w literaturze jako „nematode trapping fungi” lub grzyby nematofagiczne. W polskim piśmiennictwie były one niekiedy określane jako grzyby „drapieżne” (Batko et al. 1962). Czasem licznie pojawiały się też inne organizmy jak orzęski, ameby czy wrotki. Każdorazowo obserwacje prowadziłem od kilku dni do około trzech tygodni.

Celem dokładniejszego zbadania budowy grzybów wybrane okazy przenosiłem za pomocą zagiętej szpilki entomologicznej do kropli barwnika (błękit metylenowy) na szkiełku mikroskopowym i po nałożeniu szkiełka nakrywkowego prowadziłem obserwacje w powiększeniu 10 x 20 – 10 x 100. Wykonane preparaty nie są trwałe – jako dodatkową dokumentację stosowałem zdjęcia i rysunki wraz z pomiarami struktur ważnych w identyfikacji gatunków.

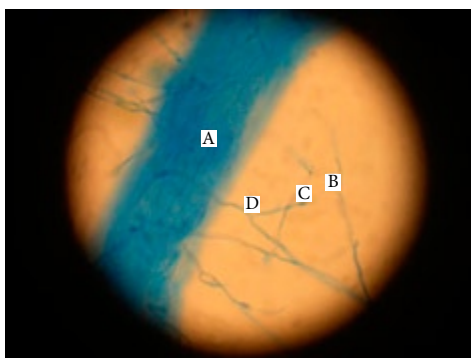
Próby uzyskania wzrostu obserwowanych grzybów na agarze Sabourauda nie powiodły się. Uzyskiwałem jedynie wzrost bakterii oraz jednorazowo wzrost *Fusarium aquaeductum* (Radlk. et Rabench.) Lagerh. Przyczyną niepowodzeń były prawdopodobnie trudności z usunięciem zanieczyszczeń z powierzchni tak drobnych obiektów – stosowałem metodę kilkukrotnego płukania oka-

zów w kropli jałowej soli fizjologicznej na odkażonym szkiełku podstawkowym.

Opis gatunków

Obserwowane pasożytnicze grzyby należały do trzech różnych gatunków z rodzaju *Harposporium*. Gatunki oznaczyłem na podstawie klucza i ikonografii (Esser i El-Gholl 1992, Wang et al. 2007).

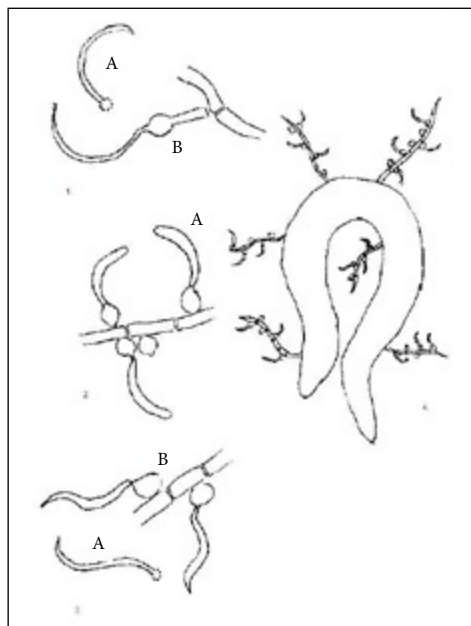
Harposporium oxyracum Drechsler



Fot. *Harposporium oxyracum* Drechsler; barwienie błękitem metylenowym, powiększenie 10 x 100. A - strzępki wypełniające wnętrze nicienia; B - konidium; C - fialida; D - konidiofor

Photo. *Harposporium oxyracum* Drechsler; cotton blue staining, magnitude 10 x 100. A - hyphae inside host (nematode); B - conidium; C - phialide; D - conidiophore

Ciało nicieni wypełnia grzybnia złożona z septowanych strzępek o grubości 1-2 μm ; strzępki wyrastające z nicieni na zewnątrz są nieznacznie grubsze – 1,5-2,5 μm , septowane, słabo rozgałęzione. Fialidy o wymiarach 3 x 2-2,5 μm tworzone są na bardzo cienkich odgałęzieniach strzępek o wymiarach 8-10 x 1 μm , czasem z jedną przegrodą poprzeczną.



Ryc. 1. *Harposporium oxyracum* Drechsler; 2. *Harposporium anguillulae* Lohde; 3. *Harposporium helicoides* Drechsler; 4. Wygląd nicienia porażonego przez *Harposporium* sp.; A - konidium, B - fialida. Rysunki wykonane na podstawie obserwacji mikroskopowych, bez zachowania skali.

Fig. 1. *Harposporium oxyracum* Drechsler; 2. *Harposporium anguillulae* Lohde; 3. *Harposporium helicoides* Drechsler; 4. General view of nematode infected by *Harposporium* sp.; A - conidium, B - phialide. Drawings based on microscopic observation, real scale range not preserved.

Sierpowate konidia o wymiarach 12-15 x 0,3-0,5 μm są osadzone na wyraźnie widocznych sterygmach. Bazalny koniec konidium otoczony jest śluzową otoczką, koniec dystalny zaostroszony. Gatunek ten był obserwowany w lutym 2014 r. na nicieniach w hodowli larw muchówek (*Diptera: Sciaridae*) zebranych w kępach mchów 15 listopada 2013 r. w lesie mieszanym w Bystrej w Beskidzie Śląskim.

Harposporium anguillulae Lohde (ryc. 1)
Gatunek typowy rodzaju *Harposporium*.
Wnętrze martwych nicieni wypełniają ułożone +/- równolegle septowane strzępki o szerokości 1-2 μm . Dodatkowo we wnętrzu martwego nicienia widoczne są chlamydospory o średnich wymiarach 4,5 x 2,5 μm . Septowane konidiofory o szerokości do 3 mikrometrów z licznymi siedzącymi kulistymi fialidami o średnicy 3,5-4,0 μm . Konidia kształtu sierpa lub półksiężyca o tępych końcach tworzone pojedynczo na krótkich, ledwie widocznych sterygmach, wymiary konidiów w badanym materiale 7-16 x 0,8-2,0 μm .

Gatunek obserwowałem do tej pory trzykrotnie: maj 2010 – na nicieniach w hodowli chrząszczy żywiących się owocnikami *Trametes sp.*, grzyby zebrane z pnia topoli, pas zieleni przy ulicy, Bystra, Beskid Śląski; marzec 2011 – na nicieniach z hodowli tropikalnych krocionogów (*Diplopoda*). Podłoże w hodowli stanowiła mieszanina ziemi i liści buka; kwiecień 2011 – w hodowli owadów związanych z owocnikami *Trametes sp.*, grzyby zebrane z pnia buka 23.03.2011, las mieszany, stoki Koziej Góry w Beskidzie Śląskim.

Harposporium helicoides Drechsler (ryc. 1)
Strzępki wypełniające ciało nicieni szerokości 1-2 μm , konidiofory septowane, wyraźnie grubsze – szerokości do 2,5 μm . Fialidy owalne 3,5-5 x 3 μm , siedzące, sterygmy krótkie, słabo widoczne. Konidia 27-30 x 1 μm o kształcie nieco stylizowanej litery S. Na bazalnym końcu konidia zawierają śluzową otoczkę.

Gatunek obserwowany w grudniu 2012 r. na nicieniach z hodowli owadów związanych z owocnikami huby *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst. zebranymi z pnia olchy, 15.12.2012 r. w lesie mieszanym koło miejscowości Bystra w Beskidzie Śląskim.

Żaden z podanych powyżej gatunków nie został wymieniony w „A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland” (Mułenko et al. 2008).

Podsumowanie

Przedstawione w artykule, w dużej mierze przypadkowe, obserwacje świadczą o tym, że grzyby te są pospolite w środowisku oraz stosunkowo łatwe do obserwacji. Niewątpliwie dalsze, celowe poszukiwania, mogą wykazać występowanie kolejnych gatunków z rodzaju *Harposporium* w naszym kraju. Prosta metoda prowadzenia obserwacji w szalkach Petriego może być zastosowana nie tylko w stosunku do nicieni, ale także innych drobnych organizmów wodnych (wrotki, niesporczaki) czy lądowych (roztocze, skoczogonki). Świat grzybów patogennych dla tych drobnych bezkręgowców jest fascynujący, a jednocześnie w dalszym ciągu mało zbadany.

PODZIĘKOWNIA: Pragnę podziękować Pani dr Annie Kujawie oraz Panu Profesorowi Stanisławowi Bałazemu za cenne wskazówki oraz pomoc w trakcie pisania pracy.

LITERATURA

- BATKO A., BAŁAZY S., JAROWAJA N., LIPA J.J. 1964. „Grzyby” – Materiały konferencji nt. „Stan badań nad organizmami pożytecznymi z punktu widzenia potrzeb ochrony roślin w Psołce”. Skierńewice 8-9 maja 1962. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 45: 23-31.
- CHAVERRI P., SAMUELS G.J., HODGE K.T. 2005. The genus *Podocrella* and its nematode-killing anamorph *Harposporium*. *Mycologia* 97, 2: 433-443.

- ESSER R., EL-GHOLL N. 1992. *Harposporium*, a fungus that parasitizes and kills nematodes utilizing conidia swallowed by or sticking to its prey. Florida Dept. of Agriculture, Division of Plant Industry, Nematology Circular 200.
- HODGE K.T., VIAENE N., GAMS W. 1997. Two *Harposporium* species with *Hisrutella* synanamorphs. Mycol. Res. 101: 1377-1382.
- MUŁENKO W., MAJEWSKI T., RUSZKIEWICZ-MICHALSKA M. 2008. A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. In: MIREK Z. (Ed.). Biodiversity of Poland vol. 9. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- WANG CH., MO M., LI X., TIAN B., ZHANG K. 2007. Morphological characteristics and infection processes of nematophagous *Harposporium* with reference to two new species. Fungal Divers. 26: 287-304.

Summary

The *Harposporium* fungi are parasites of nematodes and rotifers and may have a significant impact on the populations of the latter. They are an imperfect form (anamorph) of the fungi of *Podocrella* genus (family *Clavicipitaceae*, *Ascomycota*). In order for infection to occur, the conidia have to be consumed by the sensitive host – that is why only the free-living species of sacrophagous nematodes get infected. Observation of the fungi is straightforward while the accessible keys enable identification of the species. Out of the three species presented in the article: *Harposporium anguillulae*, *H. oxyracum* i *H. helicoides* none is included in “A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland”, therefore the present note most likely constitutes the first stating of these species in Poland.

Adres autora:

Grzegorz Dubiel
ul. Fałata 2d/2
43-360 Bystra
e-mail: gdubiel@o2.pl