

'N ONDERSOEK NA DIE INVLOED VAN VERSKILLEND E KULTUURTOESTANDE
OP DIE SPORULASIE, SPOORMORFOLOGIE EN UITWENDIGE SPOORULTRA-
STRUKTUUR VAN TWEE NUWE SWAMSOORTE

deur

J.N. PAPENFUS, Honns. B.Sc.

Verhandeling ingelewer ter gedeeltelike
nakoming van die vereistes vir die graad

MAGISTER SCIENTIAE

in die

Departement Plantkunde aan die
Potchefstroomse Universiteit vir C.H.O.

November 1971
Potchefstroom.

INHOUDSOPGAWE

Hoofstuk 1	Bladsy
Inleiding, doelstelling en literatuuroorsig	1
1.1 Inleiding en doelstelling	1
1.2 Literatuuroorsig	2
1.2.1 Voedingsmedium as kultuurfaktor	2
1.2.2 Temperatuur as kultuurfaktor	3
1.2.3 Lig as kultuurfaktor	4
 Hoofstuk 2	
Materiaal en algemene metodes	6
2.1 Materiaal	6
2.2 Algemene metodes	7
2.2.1 Bepaling van 'n geskikte medium vir groei en sporulering	7
2.2.2 Eksperimentele vasstelling van 'n geskikte metode om sporulasie nou= keurig te bepaal	11
2.2.3 Voorbereiding van eksperimentele kulture vir die ondersoek na die invloed van die omgewingsfaktore op sporulasie en spoormorfologie	16
2.2.4 Resultate	17
 Hoofstuk 3	
Spoormorfologie van <i>Botryoderma lateritium</i> en <i>B. rostratum</i>	18
3.1 Metodes vir die bestudering van spoormorfologie	18
3.1.1 Ligmikroskopiese ondersoek	18
3.1.2 Elektronmikroskopiese ondersoek	19
3.2 Spoormorfologie van <i>B. lateritium</i> en <i>B. rostratum</i> onder standaardtoestande	22
3.2.1 Die spore van <i>B. lateritium</i>	23
3.2.2 Die spore van <i>B. rostratum</i>	25
 Hoofstuk 4	
Die invloed van temperatuur as kultuurfaktor	27
4.1 Metodes	27

4.2 Resultate	28
4.2.1 Sporulasie	28
4.2.2 Spoormorfologie	29
4.3 Bespreking	31

Hoofstuk 5

Die invloed van lig as kultuurfaktor	37
5.1 Metodes	37
5.1.1 Die invloed van ligintensiteit	37
5.1.2 Die invloed van ligkwaliteit	39
5.1.3 Die invloed van die duur van bestraling	40
5.2 Resultate	40
5.2.1 Sporulasie	40
5.2.2 Spoormorfologie	40
5.3 Bespreking	46

Hoofstuk 6

Die invloed van voedingsmedium as kultuurfaktor	53
6.1 Metodes	53
6.2 Resultate	53
6.2.1 Sporulasie	53
6.2.2 Spoormorfologie	54
6.3 Bespreking	54

Opsomming	58
Summary	61
Verwysings	63
Dankbetuiging	73
Bylaag	I-XV

HOOFSTUK 1

1.1 INLEIDING EN DOELSTELLING

Die grootte en morfologiese eienskappe van swamspore bly steeds waardevolle en noodsaaklike taksonomiese kenmerke waar daar tussen spesies van die Hyphomycetes onderskei moet word (Leach & Aragaki, 1970; Snyder & Tousson, 1965). Dit geld ewe= wel vir die twee spesies wat in hierdie projek ondersoek is, nl. *B. lateritium* Papend. & Upadh. en *B. rostratum* Papend. & Upadh. Alhoewel daar veral sedert die belangrike bydrae van Hughes (1953), al hoe meer aandag gegee word aan die ontwerp van 'n nuwe klassi= fikasiestelsel vir die Deuteromycetes, gebaseer op die ontogenie van die konidiums (Subramanian, 1964; Tubaki, 1963), het sekere aspekte van die Saccardo-stelsel nog nie in onbruik geraak nie. Daar is egter verskeie kere reeds aangetoon dat spoormorfologie nie altyd onder variërende kultuurtoestande konstant bly nie (Pelletier & Aubè, 1970; Zimmer & McKeen, 1969; Leach, 1962a; Alexopoulos, 1962; Schenck & Gerdemann, 1956; Johnson & Halpin, 1954; Snyder & Hansen, 1941; Harter, 1939). Nuwe swamsoorte is dikwels in die verlede beskryf sonder dat die nodige aandag aan die invloed van kultuurtoestande op die spoormorfologie gegee is (Pelletier & Aubè, 1970). Verskeie navorsers het ook in die afgelope aantal jare daarop gewys dat dit vir taksonomiese doelein= des noodsaaklik is om swamsoorte sover moontlik onder gestandaardiseerde kultuurtoestande te kweek (Leach, 1962a; Raper & Thom, 1949). In gevalle waar spoormorfologiese kenmerke in taksonomie= se studies gebruik word, is dit dus wenslik om ondersoek in te stel na die betroubaarheid en bestendigheid van hierdie diagnostiese kenmerke. Indien daar variasie of afwyking t.o.v. belangrike kenmerke waargeneem word, is dit nodig dat taksonome hulle op hoogte sal stel met die aard en omvang van die veranderlikheid van die betrokke spesie (Leach & Aragaki, 1970; Johnson & Halpin, 1954).

Afgesien van die invloed wat veranderinge in kultuurtoestande op die spoormorfologie het, het dit ook 'n uitwerking op die voortplanting van swamme (Lilly & Barnett, 1951). Dit sal dus van be=

lang kan wees om die optimumtoestande vir sporulasie van swam=soorte te bepaal. Daar is verder verskeie kere reeds aangetoon dat sommige swamspesies hulle sporuleervermoë onder kunsmatige kultuurtoestande verloor (Barron, 1968; Chang & Tyler, 1964; Cochrane, 1958). Waar dit gebeur sal dit belangrik wees om te weet wat die optimumsporulasietoestande vir die betrokke spesies is, teneinde weereens bevredigende sporulasie te verkry.

In die lig van die feit dat kultuurtoestande die ontwikkeling en voortplanting van swamme kan beïnvloed, is die huidige navorsing beplan om die volgende probleme t.o.v. die twee spesies *Botryoderma rostratum* en *B. lateritium*, te ondersoek:

1. Die invloed van verskillende temperature, ligtoestande en voedingsmediums op die spoorproduksie.
2. Die invloed van dieselfde kultuurtoestande op die morfologie van die spore.

1.2 LITERATUUROORSIG

1.2.1 Voedingsmedium as kultuurfaktor

Wat die invloed van die voedingsbodem op die sporulasie van swamme betref, word hoofsaaklik fisiologiese ondersoekinge vermeld. In hierdie ondersoekinge word aan aspekte soos die aard van die koolstof- en stikstofbron, die rol van vitamien en die konsentrasie van die bestanddele van voedingsmediums, aandag geskenk (Cochrane, 1958; Hawker, 1957; Richards, 1951; Mathur et al., 1950). Sover vasgestel kon word is daar nie soveel navorsing gedoen i.v.m. die sporulasie van swamme op die verskillende konvensionele voedingsmediums nie en in heelwat van hierdie ondersoekinge is die bepaling van sporulasie nie d.m.v. spoortellings gedoen nie. Uit die literatuur wat bestudeer is, kon geen algemene afleidings i.v.m. die invloed van die konvensionele voedingsmediums op sporulasie gemaak word nie. Daar is gevind dat sommige swamspesies goed sporuleer op sintetiese mediums, (Cooke & Jones, 1970; Chang & Tyler, 1964; Glynne, 1953) terwyl ander soorte beter sporuleer op natuurlike mediums (Fahim,

1966; Wechmar, 1961; Houston & Oswald, 1946, Chona, 1932-33).

1.2.2 Temperatuur as kultuurfaktor

Die optimale sporulasietemperatuur by swamme verskil van spesie tot spesie (Cochrane, 1958; Hawker, 1957). Afgesien van die kwantitatiewe effek wat temperatuur op spoorproduksie uitoefen, het hierdie kultuurfaktor ook 'n invloed op die uitwendige morfologie van die spore. Wat spoorproduksie betref, verwys baie navorsers o.a. na die uitwerking van 'n hoë of lae temperatuur sonder om te vermeld watter spesifieke temperature ter sprake is. Uit die literatuur wat in hierdie verband bestudeer is, kan afgelei word dat temperature onder 22° as lae en bo 22° as hoë temperature beskou kan word. Daar is gevind dat sommige swamsoorte bevredigend by hoë temperature ($>22^{\circ}$) sporuleer (Leach, 1967; Lukens, 1966; Fahim, 1966; Aragaki, 1961; Caltrider, 1961; Hannon & Weber, 1955; Johnson & Halpin, 1954; Barnett & Lilly, 1950; Henry & Andersen, 1948). 'n Aantal navorsers het egter gevind dat lae temperature ($<22^{\circ}$) bevorderlik is vir sporulasie, (Douglas & Pavsek, 1971; Weste, 1970; Zimmer & McKeen, 1969; Stavely & Nimmo, 1969; Burgess & Griffen, 1968; Leach, 1967; Lukens, 1966; Chang & Tyler, 1964; Lythgoe, 1961; Glynne, 1953). In ander gevalle is daar gevind dat sekere spesies beter by fluktuierende lae en hoë temperature sporuleer (Toussoun & Nelson, 1968; Zachariah et al., 1956; Houston en Oswald, 1946). Cole & Fernandez (1970) het by *Erypsiphe ohicoracearum* geen verskil in konidiumvorming by lae of hoë temperature gevind nie.

Tot op hede is die invloed van temperatuur op spoormorfologie deur 'n groot aantal navorsers ondersoek. In 'n paar gevalle is gevind dat spore groter en langer is by hoë temperature (Pelletier & Aubè, 1970; Raper & Thom, 1944; Mrak & Bonar, 1938), terwyl gevalle vermeld is waar langer spore by laer temperature gevind is (Leach & Aragaki, 1970; Stavely & Nimmo, 1969; Houston & Oswald, 1946). Cochrane (1958) maak melding van die bevindinge van Chowdhury nl. dat die konidiums van *Cercospora sesami* groter is by 'n matige temperatuur as by hoë of lae temperature.

1.2.3 Lig as kultuurfaktor

'n Breedvoerige oorsig van die literatuur i.v.m. die invloed van lig op die sporulasie en spoormorfologie word deur Carlile (1965), Marsh et al., (1959), Cochrane (1958), Hawker (1957), en Lilly & Barnett (1951) verstrek. Na aanleiding van 'n studie van hierdie en ander literatuur, is dit moontlik om verskillende swamspesies in die vorm-klas Deuteromycetes, in bepaalde groepe in te deel op grond van die invloed van lig op hulle spoorproduksie. Sagromsky (1952) maak melding van so 'n indeling in drie groepe, maar na aanleiding van 'n studie van die beskikbare literatuur blyk dit dat 'n vollediger indeling in vyf groepe gemaak kan word.

Groep 1. Soorte waarvan die sporulasie van lig afhanklik is.

Verskeie navorsers het gevind dat lig (volle of gedeeltelike spektrum) 'n vereiste is vir spoorvorming by sekere swamspesies (Calpouzios & Lapis, 1970; Sanderson, 1970; Tousoun & Nelson, 1968; Fahim, 1966; Leach, 1964, 1963, 1962a, 1962b; Miller & Reid, 1961; Wechmar, 1961).

Groep 2. Soorte waarvan die sporulasie deur lig bevorder word.

Daar is gevind dat in teenstelling met verpligte fotosporuleerders, sommige swamspesies in die donker sporuleer, maar dat lig die spoorproduksie kan verhoog (Menna, di, 1970; Cole & Fernandez, 1970; Cooke & Jones, 1970; Chakrabarti & Wilcoxson, 1970; Calpouzios & Stallknecht, 1967; Kaiser, 1964; Caltrider, 1961).

Groep 3. Soorte waarvan die sporulasie deur lig onderdruk word.

Miller (1969), Lukens (1963) en Cruickshank (1963) het aangetoon dat die sporulasie van sekere swamspesies deur witlig onderdruk word en dat hierdie swamme beter in die donker sporuleer. Laasgenoemde twee outeurs het gevind dat die blou gedeelte van die spektrum vir die onderdrukking van sporulasie verantwoordelik is.

Groep 4. Soorte waarvan die sporulasie nie deur lig beïnvloed word nie.

Daar is deur 'n aantal navorsers gevind dat lig geen invloed op die sporulasie van sommige swamme het nie en dat sulke spesies ewe goed in die lig as in die donker sporuleer (Leach, 1962b; Marsh et al., 1959).

Groep 5. Soorte waarvan die sporulasie afhanklik is van afwisselende lig en donker periodes.

Daar is gevind dat sommige swamspesies slegs in afwisselende lig en donker periodes sal sporuleer maar dat geen spoorproduksie in onafgebroke lig of donker periodes voorkom nie (Zimmer en McKeen, 1969; Leach, 1967; Woods et al., 1967; Leach, 1962b, 1961).

Daar is herhaaldelik aangetoon dat lig ook 'n invloed op die morfologie van swamspore uitoefen (Cochrane, 1958) en variasies in septering, vorm en grootte is al vasgestel (Johnson & Halpin, 1954; Snyder & Hansen, 1941; Harter, 1939). Daar is ook gevalle vermeld waar die spoormorfologie deur ultraviolet (UV) bestraling beïnvloed word (Zimmer & McKeen, 1969; Leach, 1962a).

HOOFSTUK 2

MATERIAAL EN ALGEMENE METODES

2.1 MATERIAAL

Die ondersoek is uitgevoer met twee grondhifomisete van die nuwe genus *Botryoderma* n.l. *B. rostratum* Papend. & Upadh. en *B. lateritium* Papend. & Upadh. (Papendorf & Upadhyay, 1969). Voorraadkulture van albei spesies is op ertappeldekstrose-agar gekweek. Kulture wat vir hierdie ondersoek gebruik is, is verkry van enkelspoorkulture afkomstig van die voorraadkulture. Hierdie kulture is aanvanklik op ertappeldekstrose-agar gekweek, maar nadat vasgestel is dat *B. rostratum* beter op mieliemeelagar sporuleer, is hierdie bodem vir lg. spesie gebruik.

Die verkryging van enkelspoorkulture

Vir die verkryging van enkelspoorkulture van bgn. twee spesies, is verskeie metodes gebruik (Collins, 1967; Anoniem, 1961; Funder, 1953; Rawlins, 1933; Ezekiel, 1930). Die metode van Ezekiel is effens gewysig en bevredigende resultate is daarmee verkry. Die prosedure is soos volg:

1. 'n Druppel van 'n spoorsuspensie in steriele water is d.m.v. 'n oognaald oorgedra en in 'n sig-sag patroon oor 'n 1% wateragar-plaat versprei.

2. Die posisie van die laaste gedeelte van hierdie patroon is op die agterkant van die petribakkie met 'n waspotlood aangedui.

3. Na 'n inkubasie tydperk van 16-24 uur by 25° is die kultuur van die onderkant af by die gemerkte deel met 2,5x en 10x objektiewe ondersoek. Die posisie van die ontkiemende spore is met 'n inkkol aangedui.

4. Die ontkiemende spore is vervolgens met behulp van 'n gesteriliseerde ponsapparaat uit die agarplaat verwyder. Die ponsapparaat is 'n klein silindriese skyfdrukker (2mm deursnee en 2mm lank) en van vlekvrre staal vervaardig. Die agarskyf

met die ontkiemende spoor daarin, is daarna met 'n steriele naald uit die ponsapparaat verwyder en op ertappeldekstrose-agar (in die geval van *B. lateritium*) en mieliemeelagar (in die geval van *B. rostratum*) oorgeplant en geïnkubeer.

'n Reeks oorentings van hierdie kulture op skuinsbodems van dieselfde twee mediums is as voorraadkulture gebruik. Hierdie kulture is in 'n yskas by 9° bewaar.

2.2 ALGEMENE METODES

2.2.1 Bepaling van 'n geskikte medium vir groei en sporulering

Sintetiese mediums is die geskikste voedingsbodems om te gebruik vir 'n vergelykende ondersoek na die invloed van verskillende omgewingstoestande op die groei en sporulasie van swamme aangesien so 'n medium 'n bekende en beheerbare chemiese samestelling het (Alexopoulos & Beneke, 1966). Om hierdie en ander redes is besluit om Czapek se medium in hierdie ondersoek te gebruik. Dit is voorberei volgens die voorskrif van Collins (1967, p 121-122). Dit het egter geblyk dat die sporulasie van albei spesies op hierdie medium onbevredigend was. Dit was gevolglik noodsaaklik om 'n reeks eksperimente uit te voer ten einde 'n geskikter groeibodem te vind. Vir hierdie doel is die geskiktheid van die volgende natuurlike mediums ondersoek nl. ertappeldekstrose-agar (EDA), hawermoutagar (HMA), mieliemeelagar (MMA), mieliemeelagar met dekstrose (MDA) en moutagar (MA). Czapekagar (CA) is as voorbeeld van 'n sintetiese medium behou. Vir die bereiding van die verskillende natuurlike voedingsbodems is gedehidreerde Difco mediums gebruik en almal behalwe HMA is gerehidreer volgens die voorskrifte van die vervaardiger. Die hawermoutagar is berei deur 5g medium (i.p.v. 7,25g) met 100 cm³ gedistilleerde water te rehidreer. In hierdie geval is die medium dan minder taai en slymerig en kan dit makliker uit die proefbuis oorgegiet word. In al die gevalle behalwe HMA is 13cm³ van die medium in geskikte proefbuis (150 x 15mm) gevoeg. Die buise is afgesluit met „Labocap” proefbuisdeksels en vir 15 minute by 'n druk van 103 kN/m² gesteriliseer. Daar is egter gevind dat 13cm³ in die geval van HMA 'n te groot hoeveelheid is

omdat die medium tydens sterilisasie oorkook en die proefbuisdeksels laat afskiet. Gevolglik is slegs 10cm³ hoeveelhede van hierdie medium gesteriliseer. Daar is verder vasgestel dat wanneer die warm HMA uit die proefbuis gegiet word, ongeveer 3cm³ van die medium in die buise agterbly a.g.v. die klewerigheid van die hawermout. Vir hierdie rede is die inhoud van drie proefbuise in die geval van HMA teenoor twee proefbuise in die geval van die ander mediums gebruik om agarplate in steriele "Wertheim" petribakkies (85 x 15mm) te berei. Van al die mediums is dus nagenoeg gelyke hoeveelhede vir die voorbereiding van agarplate gebruik, behalwe in die geval van HMA waar dit weens die genoemde probleme nie altyd moontlik was nie. Na afkoeling is die agarplate geïnokuleer. Vir elkeen van die spesies is sewe replikaatkulture al om die tweede dag op elk van die agars by 30° vir 14 dae gekweek. Die replikate is in 'n geskikte houer geplaas en met aluminiumblad toegedraai om te verseker dat dit in algehele donker verkeer.

As maatstaf vir die bepaling van die doeltreffendheid van elke medium, is van die koloniedeursnee gebruik gemaak. Hierdie metode word algemeen aanbeveel as geskik vir hierdie doel (Cochrane, 1958; Brancato & Golding, 1953; Lilly & Barnett, 1951). Twee deursneemetings nl. die kleinste en grootste is reghoekig met mekaar geneem (Isaac, 1949). Die gemiddelde van dié twee waardes is as die deursnee van die kolonie aanvaar. Die deursnee van die hele kolonie, insluitende die nie-sporulerende rand daarvan, is op die agterkant van die petribakkie gemeet. In die geval van 'n ondeursigtige medium soos HMA is die koloniedeursnee met behulp van 'n tweebeenpasser bepaal. Die sektor-area metode van Worley (1939) bring ook die dikte van die groeiende miselium in berekening. Die metode is egter nie vir die doel van hierdie ondersoek as noodsaaklik beskou nie aangesien die miselium van hierdie swamsoorte hoofsaaklik in die medium ontwikkel het.

Resultate:

Oor die algemeen groei *B. rostratum* op al ses mediums beter as *B. lateritium*. Hierdie waarneming is ook in ooreenstemming

met die resultate van Papendorf & Upadhyay (1969). Die kolonie=grootte op die verskillende mediums word in Tabelle 1 en 2 aange=toon.

Tabel 1.

Die koloniegrootte van *B. rostratum* op verskillende mediums

Replikaat	MEDIUM					
	HMA	MDA	MMA	EDA	MA	CA
1	80 mm	76,5	72,5	60	63	60
2	80	75,5	73	72	60,5	63,5
3	79,5	77	77	78	68	64,5
4	80	77,5	76	60	62,5	68
5	78	77,5	71	80	62	63,5
6	80	75	74	80	66	63
7	80	80	80	80	64,5	62,5
Gemid.	79,6	77,0	74,8	72,9	63,8	63,6

Tabel 2.

Die koloniegrootte van *B. lateritium* op verskillende mediums

Replikaat	MEDIUM					
	HMA	CA	EDA	MMA	MA	MDA
1	43 mm	42	42	34,5	33,5	23,5
2	46	41	40	32	32	25,5
3	42	33	40	33,5	32,5	22,5
4	44	41,5	37	33,5	28	22
5	44,5	42	37,5	33	28	20
6	44	41,5	37,5	32	28	21,5
7	44	42	37	34	33,5	20
Gemid.	43,9	40,4	38,7	33,2	30,8	22,1

Uit die resultate blyk dit dat HMA die geskikste medium is vir die groei van beide soorte.

'n Voorlopige visuele sowel as 'n mikroskopiese ondersoek van die sporulerende gedeeltes van die kolonies het daarop ge=dui dat maksimale sporulasie by *B. rostratum* op HMA en MMA en by *B. lateritium* op HMA en EDA voorkom. Noukeurige spoortel=lings (sien 2.2.2) het hierdie waarnemings grootliks bevestig (Tabel 3). Die individuele tellings wat in hierdie tabel aange=toon word, verteenwoordig die aantal spore in 'n monster van $0,02\text{mm}^3$ (Peacock, 1966).

Tabel 3.

Sporulasie van *B. rostratum* en *B. lateritium* op verskillende mediums

SPESIE	MEDIUM	MONSTER	SPOORTELLINGS						
			Individuele tellings						Totale
			1	2	3	4	5	6	
<i>B. rostratum</i>	HMA	I	104	127	89	100	105	109	634
		II	99	95	102	107	107	87	597
	MMA	I	15	18	10	11	9	7	70
		II	5	12	19	13	5	7	61
<i>B. lateritium</i>	HMA	I	42	34	45	42	47	47	257
		II	36	45	40	42	31	39	233
	EDA	I	49	60	36	46	48	39	278
		II	45	30	26	40	37	55	233

Bogenoemde waarnemings het aangetoon dat HMA die geskikste voedingsmedium vir albei spesies is. Nieteenstaande 'n geringer hoër spoortelling vir *B. lateritium* op EDA, is HMA as voedingsmedium vir hierdie spesie gekies omdat dit wenslik is om vir doeleindes van morfologiese vergelykings, verskillende spesies op dieselfde medium te kweek. Om 'n voldoende voorraad van hierdie medium op hande te hê, is vier 454g bottels gedehidreerde Difco HMA medium in 'n groot houer bymekaar gevoeg, die inhoud goed gemeng en weer terug gegooi in die bottels.

2.2.2 Eksperimentele vasstelling van 'n geskikte metode om sporulasie noukeurig te bepaal

Die visuele beoordeling van die sporulasie van 'n kolonie is onnoukeurig en subjektief (Cochrane, 1958). Teneinde sporulasie noukeurig kwantitatief te bepaal is dit nodig om die aantal spore per oppervlakte-eenheid so betroubaar moontlik vas te stel. Om telkens ewe groot skywe van die sporulerende gedeeltes van die kolonies vir hierdie doel te kon gebruik, is 'n silindriese ponsapparaat met 'n deursnee van 11mm van vlekvrystaal vervaardig, en die skywe met hierdie apparaat uit die kulture verwyder.

Die verwydering van die spore vanaf die oppervlakte van die skyf is aanvanklik gedoen deur die spore met 'n plat naald van die skyf af te skraap. Dit was egter moontlik dat van die spoortrosse en spore op die agar kon agterbly. A.g.v. die ondeursigtigheid van die medium was dit ook nie moontlik om mikroskopies vas te stel of al die spore deur die metode van afskrapping verwyder is nie. Daar is verder gevind dat wanneer die spore in water opgeskud word, dit nie moontlik is om 'n geskikte spoorsuspensie te verkry nie aangesien die spore van beide spesies, soos sommige ander van die Moniliaceae, nie maklik van die konidiofore vrykom nie (Papendorf & Upadhyay, 1969; Masri, 1967; Johnson & Tucker, 1954). Dit is nie moontlik om noukeurige tellings met so 'n suspensie te maak nie aangesien baie van die spore in digte groepe aan die konidiofore bly vassit. Daar is ook opgemerk dat die konidiums nie behoorlik deur die water benat word nie. Hierdeur word dit nog verder bemoeilik om die konidiums van die konidiofore los te kry. Hierdie probleem is ook deur Hughes & Bisalputra (1970) ondervind.

Verskeie metodes om hierdie probleme op te los, is op die proef gestel. Die spore wat afgeskraap is, is in 'n mengsel van gelyke hoeveelhede 10% soutsuur en 10% chroomsuur opgeskud en vir 15 minute laat staan (Chang & Tyler, 1954). Hierdie metode was nie suksesvol nie. Vervolgens is die spore direk in laktofenol

afgeskraap (Fahim, 1966) dog ook sonder sukses. Die metode van Johnson & Tucker (1954) om die spore met behulp van 'n fyn verdeelde vaste stof, soos glasstukkies, van die konidiofore te verwyder, is ook probeer. Vir die huidige doel is egter van steariele sand i.p.v. glasstukkies gebruik gemaak maar die metode het ook nie bevredigende resultate opgelewer nie. Vervolgens is die spore in 25cm³ water afgeskraap en vir 5 minute behandel in 'n Ultra-turrax homogeniseerder. Die spore is daarna vir 15 minute gesentrifugeer in 'n Sorvall SS-4 sentrifugeerder teen 27 000 x g (15 000 o.p.m.). Om die suspensie te konsentreer, is die bōvloei-stof afgegooi en 5cm³ gedistilleerde water by die neerslag gevoeg.

Hierdie suspensie is vir spoortellings gebruik. Om die spore deeglik te benat, is 'n oplossing van 3cm³ Agfa "Agepon" benattingsmiddel in 250cm³ gedistilleerde water gebruik. Die probleme met die sentrifugeermetode was egter dat heelwat spore aan die wande van die houër en aan die lemme van die homogeniseerder vasgekleef het. Dit is ook moontlik dat van die spore tydens dekantering van die bōvloei-stof verlore kon gaan. Gevolglik is sentrifugering gestaak en twee ander homogeniseerders nl. 'n Sorvall Omni-mixer en 'n M.S.E. model waarvan die lemme met die benattingsmiddel afgespoel kon word, gebruik.

Vir die vasstelling van 'n finale metode was die volgende faktore dus op hierdie stadium ter sake, nl.

1. die tipe homogeniseerder wat gebruik moes word,
2. die medium waarin die suspensie voorberei moes word, en
3. die metode waarvolgens die spore van die agarskyf verwyder moes word.

Teneinde die geskikste metode met betrekking tot hierdie aspekte te bepaal, is die volgende prosedure gevolg.

1. Agt agarskywe van elk van die twee spesies is d.m.v. die 11mm ponsapparaat uit die sporulerende gedeeltes van die kolonies verwyder.
2. Die volgende reeks eksperimente is met die skywe van albei spesies uitgevoer.

Skyf A: Die spore is van die agarskyf afgeskraap met 'n plat naald en in 'n homogeniseerfles met 3cm^3 gedistilleerde water gespoel. Die suspensie is vir 3 minute gehomogeniseer in die M.S.E. homogeniseerder. Daarna is die lem van die instrument met nog 2cm^3 gedistilleerde water in dieselfde fles afgespoel. Die aantal spore in ses monsters van hierdie suspensie is met 'n hemositometer bepaal (sien p 16).

Skyf B: Soos metode A behalwe dat die hele agarskyf gehomogeniseer is. Dieselfde homogeniseerder (M.S.E.) is gebruik en die skyf teen dieselfde snelheid as in die vorige geval gehomogeniseer.

Skyf C: Soos metode A behalwe dat die gedistilleerde water (3cm^3 en 2cm^3 hoeveelhede) vervang is met die "agepon" benattingsvloeistof.

Skyf D: Soos metode B, behalwe dat die hele skyf in 3cm^3 benattingsvloeistof gehomogeniseer is en dat die lem na homogenisering met 2cm^3 benattingsvloeistof afgespoel is.

Skyf E: In hierdie geval (sowel as vir skywe F, G en H hieronder) is die M.S.E. homogeniseerder vervang met die Omni-mixer. 'n Mikro-aanhegtingstuk is aan die instrument vasgeskroef en die spore in 'n houer van vlekvrystaal gehomogeniseer. Metode E het verder verloop soos metode A hierbo.

Skyf F: Soos E, maar die hele agarskyf is in water met die Omni-mixer gehomogeniseer.

Skyf G: Soos E, behalwe dat die benattingsmiddel in plaas van gedistilleerde water gebruik is.

Skyf H: Soos F behalwe dat die hele skyf in die benattingsmiddel gehomogeniseer is en dat die lem daarna met hierdie middel afgespoel is.

Die spoortellings is in elke geval met 'n OA Spencer Bright-Line hemositometer gedoen.

'n Fuchs-Rosenthal hemositometer is ook gebruik maar daar is gevind dat dit nie geskik is vir noukeurige tellings nie aangesien die telkamers te groot is. Elke spoortelling verteenwoordig die aantal spore in 80 klein vierkante (elk met $0,00025\text{mm}^3$ spoorsuspensie), wat in 5 telraampies versprei is. Die tellings is volgens die voorskrifte vir die telling van eritrosiete in Peacock (1966), Brink (1963) en Student (1906-07) gedoen.

'n Opsomming van die verskillende metodes met die resultate van die spoortellings vir elke metode, word in Tabel 4 uiteengesit.

Tabel 4.

Spoortellings vir *Botryoderma lateritium* en *B. rostratum* volgens 'n aantal verskillende metodes

METODE	SPOORTELLINGS			
	<i>B. lateritium</i>		<i>B. rostratum</i>	
	Ses replikaat=tellings	Tot.	Ses replikaat=tellings	Tot.
M.S.E. homogeniseerder:				
A. Afskraap in water	9, 7, 15, 16, 14, 13	74	54, 57, 53, 57, 51, 53	325
B. Skyf in water	18, 22, 24, 33, 24, 25	146	88, 94, 83, 85, 104, 90	544
C. Afskraap in agepon	24, 34, 24, 31, 30, 25	168	92, 88, 88, 86, 87, 107	548
D. Skyf in agepon	33, 22, 39, 37, 39, 27	197	95, 96, 92, 102, 95, 89	569
Omni-mixer:				
E. Afskraap in water	9, 10, 9, 13, 9, 13	63	76, 88, 108, 67, 62, 68	469
F. Skyf in water	12, 25, 21, 18, 20, 12	108	82, 84, 84, 95, 81, 82	508
G. Afskraap in agepon	25, 13, 24, 25, 19, 29	135	83, 78, 86, 80, 89, 93	509
H. Skyf in agepon	37, 32, 26, 36, 38, 28	197	94, 101, 97, 88, 90, 93	563

Statistiese ontleding van die resultate.

Die deelgroep van die faktor wat gevarieer word wat die beste sporulasie gee, is bepaal deur die toepassing van Gupta (1965)

se seleksieprosedure (Sien ook Gupta & Sobel, 1957).

Deur die toepassing van hierdie metode kan met 95% sekerheid aangetoon word dat een van die metodes C, D of H vir *Botryoderma lateritium* die geskikste is. Vir *B. rostratum* kan met 90% sekerheid beslis word dat een van die metodes B, C, D of H die beste resultate lewer. Vir beide homogeniseerders blyk dit dat die hoogste tellings verkry word wanneer die hele skyf in die benattingsmiddel gehomogeniseer word. Aangesien die M.S.E. homogeniseerder permanent beskikbaar was, is metode D deurgaans gebruik.

Finale metode

Die volgende metode is deurgaans in hierdie navorsing gebruik:

1. Van elke replikaat is agarskywe d.m.v. 'n standaardgrootte agarpons (2.2.2, p. 11) uit die sporulerende gedeelte van die kolonie verwyder. Een skyf is aan die kant van die kolonie, die tweede in die middel en die derde in 'n posisie tussen die vorige twee, verwyder (Fig. 1).



Fig. 1. 'n Voorbeeld van 'n kultuur waar drie skywe op verteenwoordigende plekke uit die sporulerende deel van die kolonie verwyder is.

In sommige gevalle het die swamkolonies egter swak ontwikkel en is slegs een of twee skywe daaruit verwyder.

2. Die drie skywe is by 9cm^3 verdunde "agepon" benattingsmiddel ($1,5\text{cm}^3$ "agepon" in 250cm^3 gedistilleerde water) in 'n 15cm^3 M.S.E. hormogeniseerbottel gevoeg. In die gevalle van een en twee skywe is respektiewelik 3cm^3 benattingsmiddel (in 'n 8cm^3 bottel) en 8cm^3 benattingsmiddel (in 'n 15cm^3 bottel), gebruik.

3. Die skywe is vir 9 minute met die 3-5mm lem van die homogeniseerder teen 'n konstante snelheid gehomogeniseer.

4. Die houer is verwyder en die lem versigtig met 2cm^3 benattingsmiddel in 'n klein tregter afgespoel sodat die spoelvloei-stof in die spoorsuspensie opgevang is.

5. Die suspensie is tot 15cm^3 opgemaak deur nog 4cm^3 van die benattingsmiddel by te voeg. In die geval van een en twee skywe is die suspensie nie verder verdun nie.

6. Die suspensie is deeglik geroer en 'n monster m.b.v. 'n 10cm^3 pipet daaruit verwyder en 'n gedeelte daarvan toegelaat om onder die dekglasie van die homositometer te versprei. Vir elke spoortelling is die aantal spore in 'n $0,02\text{mm}^3$ monster, versprei oor 80 vierkante van die homositometer, getel. Ses monsters is uit elke suspensie geneem en ses spoortellings dus met elke replikaat uitgevoer. Die som van die ses tellings verteenwoordig die aantal spore in $0,12\text{mm}^3$ spoorsuspensie.

7. Vir die bepaling van die aantal spore per oppervlakte-eenheid, is onderstaande formule gebruik (Peacock, 1966):

$$\frac{\text{Totale aantal spore} \times 4\,000 \times 1\,000 \times \text{verdunning van suspensie}}{\text{aantal vierkante per telling} \times \text{aantal tellings} \times \text{aantal skywe van } 1\text{cm}^2}$$

2.2.3 Voorbereiding van eksperimentele kulture vir die ondersoek na die invloed van die omgewingsfaktore op sporulasie en spoormorfologie

In al die eksperimente is van glas petribakkies gebruik gemaak. Hierdie houe is met agar voedingsmedium soos in 2.2.1 op p 7 beskryf is, gevul. Na afkoeling van die plate is die spore van die voorraadkulture (sien p 7) op die agarmediums oorgeënt. Die petribakkies is omgekeer en die okulasie van onder

af gedoen om te verhoed dat spore van die naald op die agarplate val. Hierdeur kon verseker word dat slegs een enkele sentrale kolonie op elke plaat ontwikkel. Die kulture is vervolgens aan die verskillende kultuurtoestande onderwerp. Afhangende van die grootte van die beskikbare ruimte in die inkubators, is 13-15 replikate vir elke eksperiment voorberei. Hiervan is 10 kulture gebruik vir die spoortellings en die ondersoek na die spoormorfologie. In gevalle waar die kolonies swak ontwikkel het, is die ander replikate gebruik vir die bestudering van die spoormorfologie. In al die eksperimente is die kulture vir 14 dae geïnkubeer.

2.2.4 Resultate

Die volledige resultate t.o.v. die twee spesies se sporulasie onder die verskillende kultuurtoestande, word in tabelle 1 tot 25 in die bylaag aangegee. Opsommings van hierdie resultate word in die teks verstrek.

Die sporulasie van die twee spesies is telkens onder dieselfde toestande vergelyk om te bepaal watter spesie die beste onder 'n bepaalde toestand sporuleer. Die finale afleidings is gemaak na toepassing van die Mann-Whitney U-toets (Siegel, 1956).

Tweedens is die resultate betreffende sporulasie onder die verskillende kultuurtoestande gebruik om die optimumtoestande vir maksimale sporulasie by elke spesie te bepaal. Hiervoor is die seleksieprosedure van Gupta (1965) gebruik.

Die grootte van die spore van kulture wat onder die verskillende kultuurtoestande gekweek is, word in tabelle 6 (vir die temperatuurfaktor), 8 (vir die ligfaktor) en 10 (vir die verskillende voedingsmediums) aangetoon.

HOOFSTUK 3

SPOORMORFOLOGIE VAN *BOTRYODERMA ROSTRATUM* EN *B. LATERITIUM*

3.1 METODEDES VIR DIE BESTUDERING VAN SPOORMORFOLOGIE

3.1.1 Ligmikroskopiese ondersoek

Die materiaal wat vir die ligmikroskopiese ondersoek van die spore gebruik is, is vooraf op die volgende manier behandel:

1. Nadat drie skywe vir die bepaling van die mate van sporulasie uit die kulture verwyder is, is die res van die sporulerende gedeelte van die kolonie afgeskraap in 3cm laktofenol in 'n 8cm³ M.S.E. homogeniseerfles. In sommige gevalle is te min materiaal uit een kultuur verkry en is gebruik gemaak van ander replikate wat onder dieselfde toestande gekweek is.

2. Die spoorsuspensie in laktofenol is vir 3 minute gehomogeniseer om die spore van die konidiofore los te maak.

3. 'n Monster van die spoorsuspensie is op 'n skoon voorwerp glasie gepipetteer en met 'n dekglasie bedek. Vir die ligmikroskopiese ondersoek is gebruik gemaak van 'n Zeiss navorsingsmikroskoop. Daar is deurgaans gebruik gemaak van fasekontras optika met 'n Neofluar olie-immersielens by 'n totale vergroting van 1 250 x.

Die grootte van vyftig verskillende spore is d.m.v. 'n okulêr mikrometer bepaal. Daarna is slegs ooglopende groot en klein spore wat in die preparaat voorgekom het, gemeet. Die spoorvorm is bepaal en die lengte van die snawel van die spore van *B. rostratum* is ook vasgestel. Die spoorvorm asook spoorgrootte van kulture wat vir 14 dae by 25⁰ op HMA in onafgebroke donker gekweek is, is as standaard aanvaar aangesien die spoor mates in die oorspronklike beskrywing (Papendorf & Upadhyay, 1969) behalwe vir 'n enkele geringe verskil (Tabel 10), ooreenstem met dié wat onder bg. toestande gekweek is. Enige spoorafwykings is genoteer en gefotografeer met 'n Zeiss fotomikroskoop met Nomarski interferensie-optika op Ilford FP 3 35mm film.

Daar is deurgaans gebruik gemaak van 'n 100x Plan-apochromaat. Om kontras te verhoog is die film ongeveer 50% onderbelig en vir 12 minute by 20⁰ in Acutol ontwikkel.

Vir elke kultuurtoestand is vyf replikate op 'n ewekansige wyse gekies en gebruik om vyf spoorsuspensies voor te berei. Drie monsters uit elke spoorsuspensie is ondersoek.

3.1.2 Elektronmikroskopiese ondersoek

By die bestudering van die uitwendige morfologie van spore, word ondersoek met die ligmikroskoop met sy beperkte resolusie van 300 nm, in die jongste tyd aangevul met die skandeerelektronmikroskoop (Hawker, 1968) met 'n resolusiewaarde van 20 nm (Heywood, 1969; Oatley, 1966). Voor die gebruik van die skandeerelektronmikroskoop is die transmissie-elektronmikroskoop gebruik om die uitwendige ultrastruktuur van die spoorwand te ondersoek. Vir die voorbereiding van die materiaal is die koolstofreplikametode van Bradley (1954-55; 1967) gewoonlik gebruik (Hess & Stocks, 1969; Bigelow & Rowley, 1968). Hierdie metode is egter moeilik en tydrowend (Jones, 1967) en word al hoe meer vervang deur die metode van direkte waarneming in die skandeermikroskoop waarmee 'n meer lewensgetroue en pseudo drie-dimensionele beeld van die spore verkry word (Jones, 1968). Verskeie navorsers het reeds die metode om swamspore direk in die skandeermikroskoop te ondersoek, met sukses toegepas (Mills, 1970; Clarke & Griffiths, 1970; Wyllie & Brown, 1970; Willets & Calonge, 1969; Old & Robertson, 1969; Greenhalgh, 1967).

In hierdie navorsing is die ligmikroskopiese studie van die spoormorfologie ook aangevul met 'n elektronmikroskopiese ondersoek.

Vir die ondersoek van die spore met die skandeerelektronmikroskoop, is verskeie metodes aangewend. Om bevredigende resultate te verkry, is dit belangrik om die natuurlike drie-dimensionele voorkoms van die spoor asook die natuurlike wandstruktuur te behou. Dit is noodsaaklik om seker te maak dat enige ornamentasie op die wand van die spoor asook onreëlmatig-

hede in die wandstruktuur natuurlike kenmerke is en nie artefakte a.g.v. die metode van voorbereiding nie (Echlin, 1968). Namate die ondersoek na 'n geskikte metode gevorder het, het dit duidelik geword dat die volgende aspekte van belang is.

1. Fiksering

Die meeste navorsers het goeie resultate verkry deur die spore vooraf te fikseer en glutaaraldehyd is in 'n hele aantal ondersoeke met sukses as fikseermiddel gebruik (Brown & Wyllie, 1970; Williams & Webster, 1970; Hawker, 1970; Hughes & Bisalputra, 1970; Clarke & Salsbury, 1967). Ander fikseermiddels wat ook aanbeveel word, is kaliumpermanganaat (Hawker, 1970; Williams & Webster, 1970), osmiumtetroksied (Boyde & Barber, 1969) en akroleïn (Zachariah & Pasternak, 1970). Verskeie werkers gebruik osmiumtetroksied as 'n tweede fikseermiddel, gewoonlik na aanwending van glutaaraldehyd as eerste fikseermiddel (Williams & Webster, 1970; Hawker, 1970; Hughes & Bisalputra, 1970). Al die fikseermiddels hierbo genoem en ook pikriensuur, is gebruik vir die fiksering van die spore van albei spesies. Nie een van hierdie fikseermiddels het bevredigende resultate gelever nie. Dit het geblyk dat die gebruik van hierdie middels vervorming van die spore veroorsaak.

2. Vriesdroging

Vriesdroging word deur verskeie navorsers as 'n geskikte metode vir die voorbereiding van sagte materiaal vir skandeerelektronmikroskopiese ondersoekinge aanbeveel (Zachariah & Pasternak, 1970; Echlin, 1968). Die eenvoudige vriesdroogapparaat van Zachariah & Pasternak (1970) is ook hier gebruik maar daar is gevind dat dit moeilik is om 'n voldoende voorraad vloeibare lug te voorsien en dat die droging deur hierdie metode tydrowend is.

Materiaal is vervolgens met 'n Pease "Tissue Dryer", model 1, onder 'n vakuum van 10^{-4} torr met P_2O_5 vir 24 uur gevriesdroog. Die materiaal is nie vooraf gefikseer nie. 'n Druppel van 'n spoorsuspensie is direk op 'n skoon en droë skandeerelektronmi-

kroskoop aluminium objekhouer geplaas, die oortollige vloeistof afgeskud, die objekhouer vinnig in vloeibare lug gedruk (Zachariah & Pasternak, 1970; Echlin, 1968), uitgehaal en dadelik op die verkoelde tafel (-40°) van die vriesdroeër geplaas. By latere ondersoek van die spore, is egter gevind dat hierdie metode ook nie suksesvol was nie.

Vervolgens is twee ander metodes aangewend:

1. 'n Spoorsuspensie is in gedistilleerde water voorberei en 'n monster daarvan op 'n skoon objekhouer geplaas. Die oortollige vloeistof is afgeskud en die vloeistoflagie op die houer toegelaat om lugdroog te word. Die materiaal is daarna in vacuo in 'n Balzers Micro BA 3 bedampingsapparaat met 'n lagie goud-palladium allooi (60 goud:40 palladium) geplaas. Die goud-palladium draadryertjies (elk 7mm lank en 0,5mm in deursnee) is op 'n afstand van 150mm vanaf die materiaal verhit en die objekhouers tydens die opdamping stadig geroteer ten einde die objek met 'n egalige lagie allooi te bedek.

2. Die monster is voorberei soos in 1. hierbo maar i.p.v. lugdroging is dit direk in die bedampingsapparaat geplaas en daarna met 'n lagie goud-palladium bedek.

'n Onderzoek van die spore wat volgens metode 1. voorberei is, het getoon dat hulle nie so vervorm is soos met vooraf fiksering nie. Die resultate wat met metode 2. behaal is, was nie baie bevredigend nie. Die mate van welslae wat met metode 1. behaal is, het daarop gedui dat die spore op een of ander manier gedroog moes word alvorens hulle in die bedampingsapparaat geplaas word. Die ondersoek van Greenhalgh (1967) i.v.m. die mikromorfologie van spore van die Xylariaceae, is gedoen met spore wat verkry is van droë herbariummateriaal. Na aanleiding van die metode van Greenhalgh, is die spore van *Botryoderma rostratum* en *B. lateritium* eers in 'n oond gelaat om te droog alvorens dit met goud-palladium bedek is. Onderstaande prosedure is gevolg:

1. 'n Aantal replikaatkulture van beide spesies is in 'n oond by 30° geplaas en die deksels van die petribakkies afgehaal.

2. Na twee uur is die oond op 40⁰ gestel en die kulture ge= laat tot die medium droog en hard was.

3. 'n Skoon en droë aluminium objekhouer is liggies op die sporulerende gedeelte van 'n droë kultuur gedruk en daarna onder 'n stereomikroskoop ondersoek om te bepaal of voldoende ma= teriaal op die oppervlak vasgekleef het.

4. Die materiaal is daarna driemaal agtereenvolgens met 'n lagie goud-palladium allooi in die bedampingsapparaat bedek (sien p. 21 vir besonderhede). Dit word aanvaar dat 'n lagie metaal van hierdie dikte nie die oppervlakstruktuur van die ma= teriaal sal verander nie (Heywood, 1969). Na opdamping is die objekhouers in 'n stofdigte houer bewaar.

5. Die materiaal is ondersoek met 'n Cambridge Stereoscan Mk II elektronmikroskoop teen 'n spanning van 20 kv. Skandeerelek= tronmikroskoopfotos (S.E.M.-fotos) van die spore is geneem met apertuur 2 (100 μ m) op Ilford FP4 35mm film en op die gewone wyse ontwikkel.

Verskeie S.E.M.-fotos van die spore van beide spesies onder standaardtoestande (HMA medium, 25⁰, donker, 14 dae inkubasie) is geneem. Die morfologie van die spore wat onder ander lig= en temperatuurtoestande en op ander voedingsmediums ontwikkel het, is ook met die elektronmikroskoop bestudeer.

Die metode om spore direk op die objekhouer te monteer sonder enige ander behandeling voordat dit met 'n metaallagie bedek word, is ook deur ander navorsers toegepas (Old & Robert= son, 1969; Jones, 1968; 1967). In die meeste gevalle is die spore egter nie vooraf gedroog nie maar direk op die skoon alu= minium objekhouers of op 'n kleefstof wat op die houer aangebring is, geplaas.

3.2 DIE SPOORMORFOLOGIE VAN *BOTRYODERMA LATERITIUM* EN *B. ROSTRATUM* ONDER STANDAARD TOESTANDE

Die spore van kulture wat onder standaardtoestande gekweek is, is met die ligmikroskoop (sien p 18) en met die skandeerelek=

tronmikroskoop (sien p. 19) ondersoek. Die morfologie van die spore verkry van kulture op MA by 25° is reeds deur Papendorf & Upadhyay (1969) beskryf. Hierdie kulture is ook in onafgebroke donker geïnkubeer (Papendorf-mondelinge mededeling). 'n Verge-lykende ondersoek het aangetoon dat die spoormorfologie van beide spesies op HMA in alle opsigte behalwe vir 'n enkele geringe verskil in die spoormate van *B. rostratum*, met dié op MA ooreenstem (Papendorf & Upadhyay, 1969; Tabel 10).

3.2.1 Die spore van *B. lateritium*

Ligmikroskopiese ondersoek

Die konidiums word sittend of aan kort sterigmas op sporogene selle of direk op die hifes gedra. Die konidiums is eensellig, breed tot lank-ellipsvormig, eiervormig of min of meer rond. Die spore is glad, kleurloos of soms effens getint en vertoon 'n dik wand. Spore wat vrykom van die sporogene selle vertoon 'n duidelike ringvormige basale of sublaterale merk wat soms omring is deur 'n dun membraanagtige aanhangsel wat volgens Papendorf en Upadhyay (1969) die oorblyfsel van die geskeurde sterigma of sporogene sel is. Die spoormate is 4-6 x 4-8µm.

Elektronmikroskopiese ondersoek (Fig. 2 - p 24).

Afhangende van die waarnemingsposisie, vertoon die spore die kenmerkende breed- tot lank-elliptiese vorm (Fig. 2a) sowel as min of meer rond (Fig. 2b, c) of eiervormig (Fig. 2d). Die wand vertoon oor die algemeen redelik glad (Fig. 2a, d). Soms kom 'n onreëlmatige geriffeldheid op die wand voor (Fig. 2c). Hierdie wandstruktuur is egter nie deurgaans waargeneem nie en is moontlik die gevolg van die metode waarvolgens die materiaal voorberei is.

Die spore wat van die sporogene selle of van die sterigmas vrykom, vertoon in baie gevalle 'n ringvormige afsnoeringsmerk (Fig. 2c) wat ook met die ligmikroskoop waargeneem is, (Papendorf & Upadhyay, 1969). Hierdie merk word aan die onderkant van die kort konidiumsteeltjie (Fig. 2b), waargeneem. Hierdie

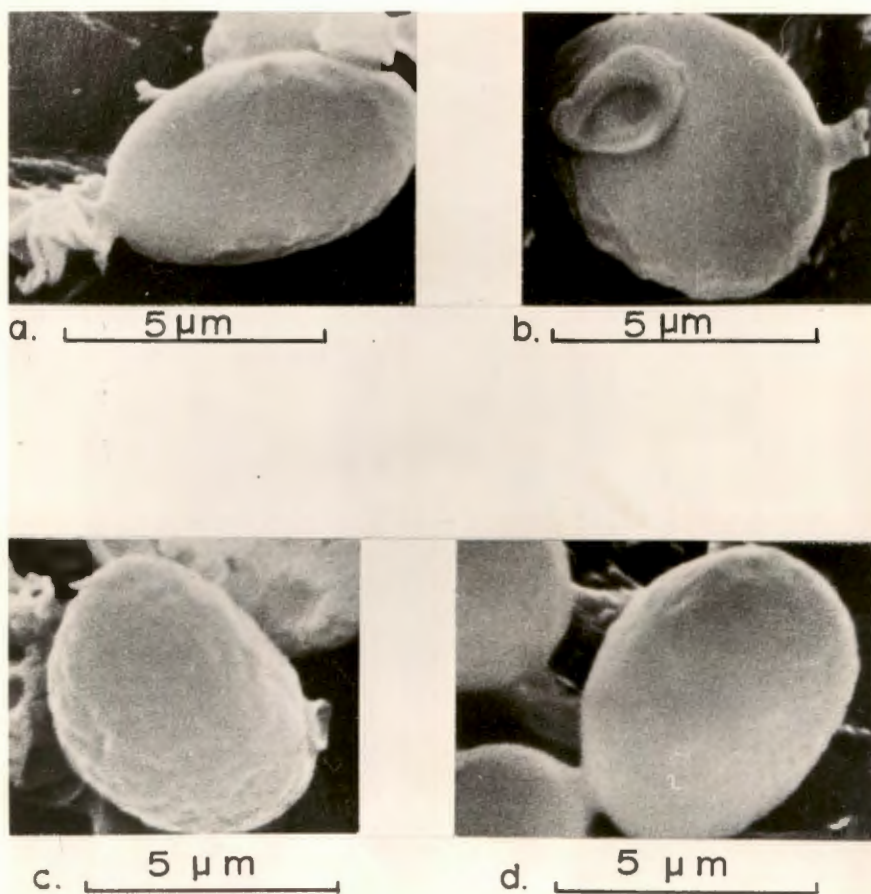


Fig. 2. S.E.M.-fotos van die spore van *Botryoderma lateritium* gekweek op HMA vir 14 dae by 25° in onafgebroke donker.

steeltjie besit in baie gevalle 'n membraanagtige aanhangsel wat 'n oorblyfsel is van die sporogene sel waaraan die spoor vasgeheg is (Fig. 2a). Die konidiumsteeltjie is dieselfde struktuur as dié wat Papendorf & Upadhyay (1969) as 'n sterigma beskryf. Dit is in hierdie verband moontlik belangrik om daarop te let dat Goos (1956) voorgestel het dat die term sterigma slegs by die Basidiomycetes en nie by die Deuteromycetes gebruik behoort te word nie.

3.2.2 Die spore van *Botryoderma rostratum* Ligmikroskopiese ondersoek

Die spore word sittend of op kort sterigmas gedra. Hulle is eensellig, breed spoelvormig-ellipties, eiervormig of min of meer rond. Kenmerkend van die spore is dat sommige 'n terminale of subterminale doringagtige uitsteeksel of snawel besit. Die lengte van hierdie uitsteeksel wissel van 0,5 tot 5,5µm, terwyl die spoorgrootte (sonder die snawel) 4-6 x 4,5-9µm is. Die spore is kleurloos tot effens getint, dikwandig en glad. Net soos in die geval van *B. lateritium* word 'n basale of sublaterale ringvormige afsnoeringsmerk aan die spore wat van die sporogene selle vrykom, opgemerk. In baie gevalle word 'n membraanagtige aanhangsel aan die sterigma waargeneem.

Elektronmikroskopiese ondersoek (Fig. 3- p 26).

Die spore vertoon breed spoelvormig-ellipties (Fig. 3a), eiervormig (Fig. 3b) of soms rond. Die posisie van die snawel, waar dit voorkom, is terminaal (Fig. 3b) of subterminaal (Fig. 3a). Die variasie in snawellengte kan in Fig. 3a, b en c opgemerk word. Die ringvormige afsnoeringsmerk vertoon duidelik aan die onderkant van die steeltjie (Fig. 3a,b) waarmee die konidium aan die sporogene sel vasgeheg is. Hierdie steeltjie is hol (Fig. 3a, b) en 'n vliesagtige membraan is in baie van die spore aan die steeltjie vasgeheg (Fig. 3c). Hierdie membraan is 'n deel van die sporogene sel wat aan die steeltjie vasgeheg bly wanneer die spore vrykom. Die wand het in die meeste gevalle 'n onreëlmatige geriffelde voorkoms (Fig. 3a). Geen reëlmatige ornamentasiepatroon is egter waargeneem nie.

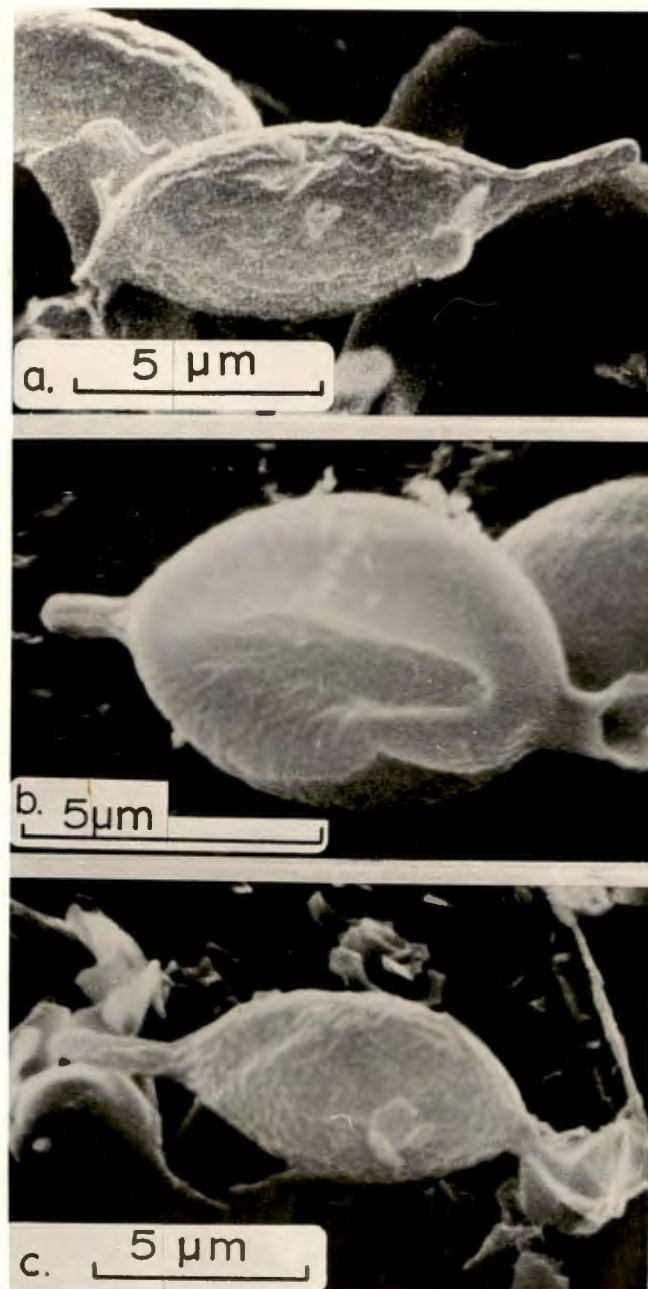


Fig. 3. S.E.M.-fotos van spore van *Botryoderma rostratum* gekweek op HMA vir 14 dae by 25° in onafgebroke donker.

HOOFSTUK 4

DIE INVLOED VAN TEMPERATUUR AS KULTUURFAKTOR

4.1 METODEDES

In al die eksperimente waarin die invloed van temperatuur op sporulasie ondersoek is, is HMA as voedingsmedium gebruik en is die kulture vir 14 dae in onafgebroke donker geïnkubeer. Die kulture is in die donker gehou deur hulle met aluminiumblad te bedek, in 'n kartondoos te plaas en die doos vervolgens met swart papier toe te draai. Om 'n aanduiding te kry van die maksimum en minimum temperature vir die groei van hierdie swamme, is onderstaande proef vooraf uitgevoer. Drie replikate van elk van die swamsoorte is vir 14 dae op HMA in onafgebroke donker by die volgende temperature geïnkubeer: 15°, 30° (as kontrole), 40° en 50°. Die resultaat van die groei van die twee swamsoorte by hierdie temperature, word hieronder aangegee.

Botryoderma lateritium

Temperatuur	Waarneming	Kolonie= deursnee
15°	Groei vind plaas na die sewende dag. Heelwat spore onder die mikroskoop waargeneem.	7 mm
30°	Goeie groei en sporulasie.	44,5 mm
40°	Geen groei waargeneem nie.	-
50°	Geen groei waargeneem nie.	-

B. rostratum

Temperatuur	Waarneming	Kolonie= deursnee
15°	Groei hoofsaaklik in die medium. Sporulerende gedeelte beperk.	8,5 mm
30°	Goeie groei en sporulasie.	80 mm
40°	Redelike groei. Sporulasie swak.	33 mm
50°	Geen groei.	-

Na aanleiding van hierdie lootsproewe is die invloed van temperatuur van 15⁰, 25⁰, 35⁰ en 40⁰ op die sporulasie en spoormorfologie van beide swamsoorte ondersoek.

In verband met die voorbereiding van die voedingsbodems vir hierdie reeks eksperimente is daar gevind dat wanneer die warm HMA in die petribakkies gevoeg word, heelwat waterdamp teen die deksels van die bakkies kondenseer. Om hierdie nadeel te voorkom, is die bakkies, nadat die medium gestol het, omgekeer en die deksels met ander droë gesteriliseerde deksels vervang. Daarna is die inokulasies op die gewone manier (p 17) gedoen.

Vir temperature van 15⁰ en 25⁰ is 'n Gallenkamp "cooled incubator" model H330 en vir 35⁰ en 40⁰ 'n Heraeus model BA 3 oond gebruik.

Vir die bepaling van die sporulasie by 15⁰ is slegs een skyf van 1cm² uit elke replikaatkultuur verwyder, aangesien die groei by albei spesies besonder swak was. By *Botryoderma lateritium* was die gemiddelde deursnee van die tien replikaatkolonies slegs 11,3mm en by *B. rostratum* het die deursnee gewissel van 2-10mm. Die tien spoorsuspensies is in elk geval opgemaak met 5cm³ benattingsmiddel soos beskryf in 2.2.2 op p 16. In die geval van *B. rostratum* was die kolonie by 40⁰ groot genoeg om twee skywe daaruit te kon verwyder. Die spoor-suspensie van hierdie kulture is opgemaak in 10cm³ benattingsmiddel. By die ander temperature is drie skywe verwyder en behandel soos in 2.2.2 op p 16 beskryf. Die res van die replikate is gebruik vir die bestudering van die spoormorfologie. Vir elektronmikroskopiese ondersoekinge is die eksperimente onder dieselfde toestande in dieselfde oonde herhaal en die materiaal gebruik soos beskryf in 3.1.2 op p 21.

4.2 RESULTATE

4.2.1 Sporulasie

Die volledige spoortellings word in tabelle 1 tot 7 in die bylaag aangetoon. Onderstaande spoorgetalle (Tabel 5) is

'n opsomming van die gegewens uit die tabelle in die bylaag.

Tabel 5.

Gemiddelde aantal spore per cm^2 vir *Botryoderma rostratum* en *B. lateritium* by verskillende temperature

Temperatuur	<i>B. rostratum</i>	<i>B. lateritium</i>
15°	254 167	2 016 668
25°	13 991 678	6 441 672
35°	15 166 678	6 204 172
40°	783 334	-

4.2.2 Spoormorfologie

4.2.2.1 Spoormate

Die afmetings van 'n aantal kleinste en grootste spore in elk van enige vyf replikate, is bepaal soos beskryf in 3.1.1 op p 18.

Tabel 6.

Spoormate vir *B. lateritium* en *B. rostratum* by verskillende temperature

Temperatuur	<i>B. lateritium</i>	<i>B. rostratum</i>	
		Spoor	Snawellengte
15°	3-6 x 3-8,5 μm	4-6,5 x 5-8 μm	2,5 μm
25°	4-6 x 4-8	4-6 x 4,5-9	5,5
35°	3,5-6 x 4-8	4-6 x 5-8	5,5
40°	-	4-6 x 4-8,5	3,5

Die standaardafmetings op HMA by 25° is soos volg:

B. lateritium : 4-6 x 4-8 μm

B. rostratum : spore 4-6 x 4,5-9 met die maksimum snawellengte 5,5 μm .

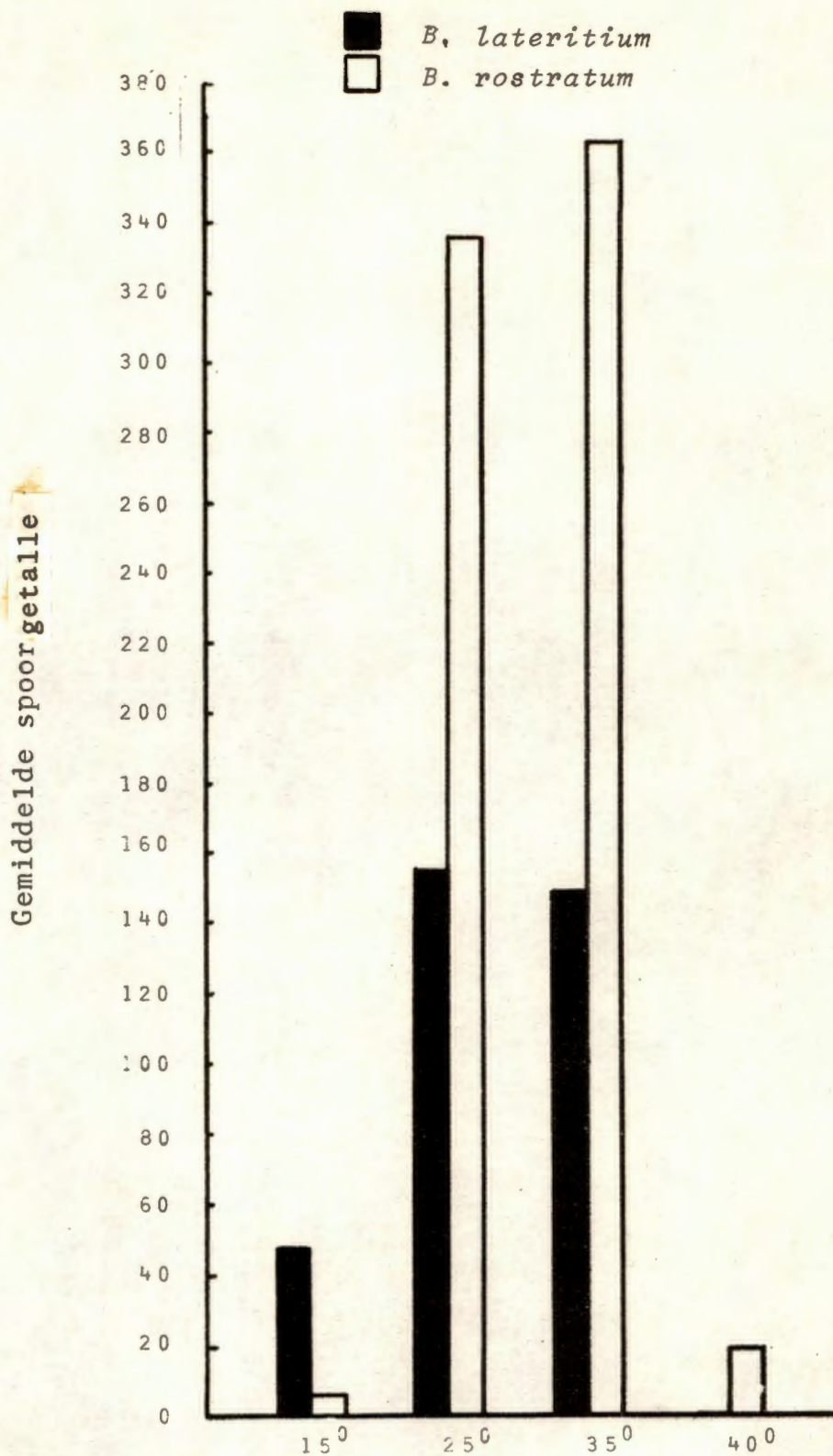


Fig. 4. Die invloed van temperatuur op die sporulasie van *Botryoderma lateritium* en *B. rostratum*.

4.2.2.2 Spoorvorm

Met die lig- en elektronmikroskopiese ondersoek van die spore van *B. lateritium* is geen verskille tussen die spore van kulture wat by verskillende temperature gekweek is, opgemerk nie. 'n Ligmikroskopiese ondersoek van die spore van *B. rostratum* kulture wat by verskillende temperature gekweek is, toon 'n duidelike afwyking in die vorm van sommige spore by 40°. In vergelyking met die standaardmorfologie soos by 25° (p 23) is gevind dat beide normale en abnormale spoorvorms in dieselfde kultuur voorkom. Die afmetings van die spore by 40° wat in Tabel 6 aangegee word, is die afmetings van die normale spore. Min van die abnormale spoorvorms is met die elektronmikroskopiese ondersoek waargeneem. Aangesien die swam swak sporuleer by 40° mag dit wees dat te min van die spore met die metode wat gevolg is, op die houer oorgebring is. Twee afwykings wat wel opgemerk is, word in Fig. 6 (p 33) aangetoon. Fig. 6a toon 'n ingesnoerde spoor en b 'n spoor met 'n deel wat moontlik 'n verdikte steeltjie soos dié in Fig. 5e2 is. In Fig. 5 (p 32) word die abnormale spore, soos onder die ligmikroskoop waargeneem, aangetoon. Geen verskil in die wandstruktuur van die spore van kulture wat by verskillende temperature gekweek is, is waargeneem nie.

4.3 BESPREKING

Die resultate van die ondersoek i.v.m. sporulasie by verskillende temperature toon aan dat die optimum-sporulasie-temperature vir *B. lateritium* en *B. rostratum* onderskeidelik 25° en 35° is (Tabel 5 en Fig. 4). Volgens die seleksieprosedure van Gupta (1965) kan vir beide spesies met 97,5% sekerheid beslis word dat 25° of 35° die optimumtemperatuur vir sporulasie is. Na aanleiding van die verwante literatuur wat bestudeer is (Literatuuroorsig, p 3), kan beide spesies dus geklassifiseer word as swamme wat by 'n relatief hoë temperatuur (>22°) goed sporuleer. Verskeie ondersoekers het vir verskillende nie-termofiele swamsoorte hoë optimumtemperatuur ($\pm 25^\circ$) vir sporulasie vasgestel (Fahim, 1966; Caltrider, 1961), maar slegs Chona

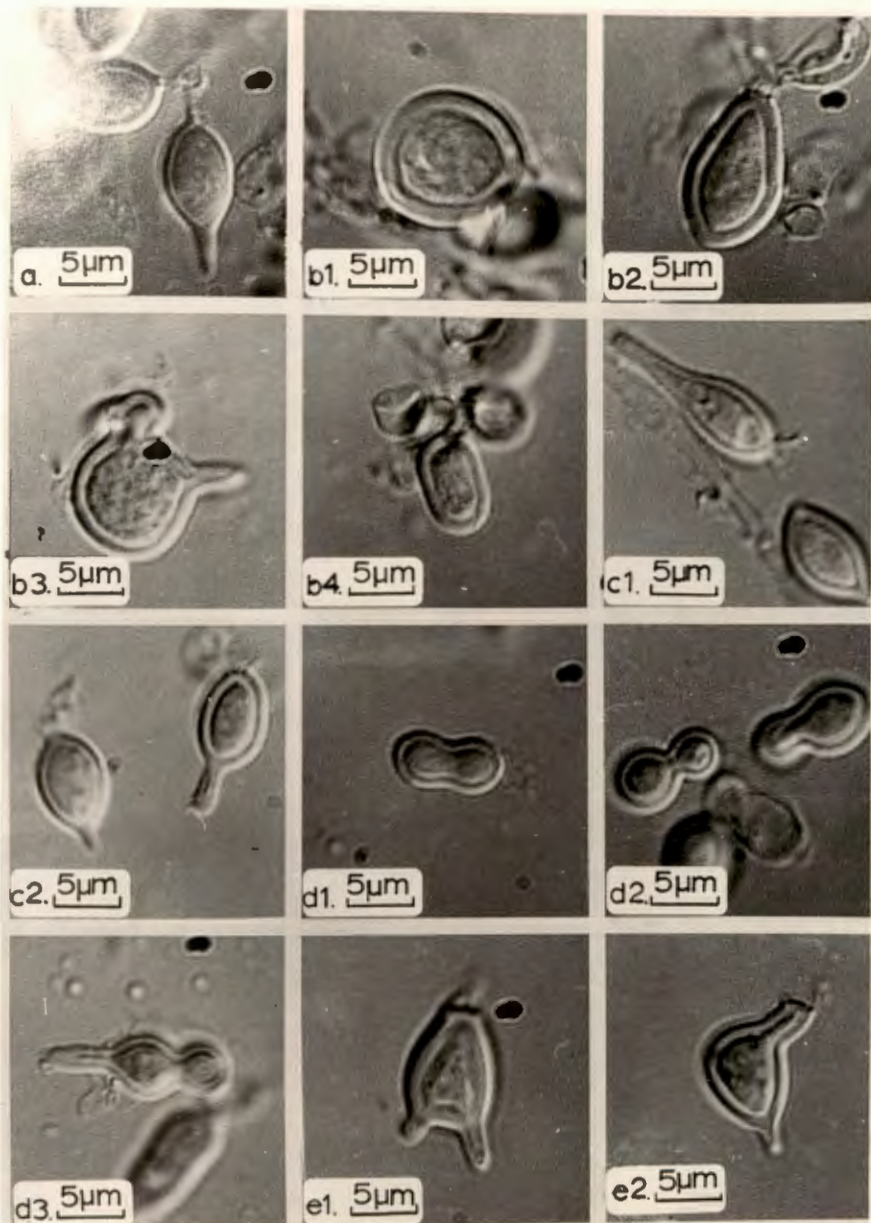


Fig. 5. Spoormorfologie van *Botryoderma rostratum*-kulture, gekweek op HMA by 40° in onafgebroke donker vir 14 dae.
a: normale spoorvorm. b-e: abnormale spoorvorms

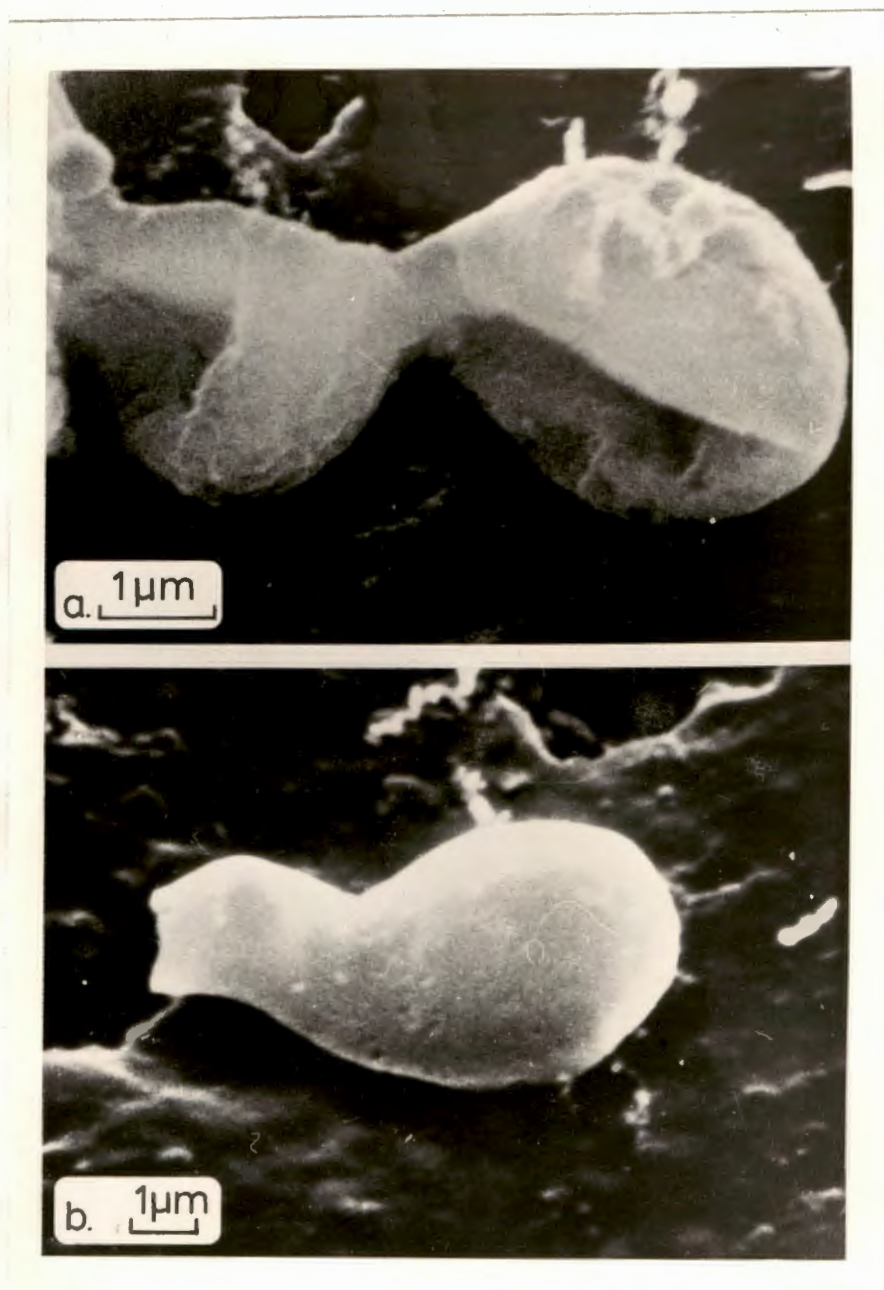


Fig. 6. S.E.M.-fotos van twee abnormale spore van *B. rostratum*-kulture gekweek op HMA by 25° in onafgebroke donker vir 14 dae.

(1932-33) het 'n hoër optimum (30° op natuurlike medium) vir *Aspergillus glaucus* gevind. Geen gevalle van nie-termofiele swamme met so 'n hoë optimumtemperatuur vir sporulasie (35°) is in die literatuur wat bestudeer is, teëgekom nie.

'n Vergelyking van die sporulasie van die twee spesies (Fig. 4) toon 'n hoër spoorproduksie vir *B. rostratum* as vir *B. lateritium* by 25° , 35° en 40° . Volgens die Mann-Whitney U-toets (Siegel, 1956) kan die nul-hipotese (geen verskil in sporulasie van die twee spesies) telkens by elk van hierdie temperature op die 0,001 drempel verwerp word. Dit is 'n aanduiding van 'n betekenisvolle verskil in die sporulasie van die twee spesies. Uit die resultate in Tabel 5 sowel as uit Fig. 4 is dit duidelik dat, van die twee spesies, *B. rostratum* by aldie genoemde temperature (25° , 35° , 40°) die beste sporuleer. By 15° toon die Mann-Whitney toets 'n beduidende verskil tussen die sporulasie van die twee spesies (0,001 drempel). In hierdie geval sporuleer *B. lateritium* egter beter as *B. rostratum* (Fig. 4). Die resultate toon ook aan dat *B. lateritium* oor die algemeen beter by laer temperature en *B. rostratum* beter by hoër temperature sporuleer.

In Tabel 6 word die spoorafmetings van beide spesies by die verskillende temperatuurtoestande aangetoon. Die afmetings stem nagenoeg ooreen met dié wat as standaard vir hierdie twee spesies aanvaar word (sien p 29).

Die lengte van die snawel van spore van *B. rostratum* toon 'n afwyking van die standaardafmetings. By 15° en 40° is die snawels van hierdie spore korter as by die standaardtoestande en by 35° . Dit mag moontlik wees dat lae en hoë temperature die ontwikkeling van die snawel onderdruk. By 15° is kleiner spore ($3 \times 3\mu\text{m}$) in die geval van *B. lateritium* opgemerk. Die normale ontwikkeling van hierdie spore mag a.g.v. die laer temperatuur gestrem word. Die enigste afwyking in spoorvorm by die twee swamspesies, het in die geval van *B. rostratum* by 40° voorgekom. In die monsters wat ondersoek is, is beide normale (Fig. 5a) en abnormale (Fig. 5b-e) spoorvorms aangetref. 'n

Onderzoek van die abnormale spoorvorms wat aangetref is, toon aan dat hulle in vier kategorieë ingedeel kan word.

- I. Die eerste groep bestaan uit spore waarvan die gewone vorm geheel en al verander het (Fig. 5b1-4). So bv. is min of meer halfronde (Fig. 5b1) en peervormige (Fig. 5b2) spore waargeneem. Die spoor in Fig. 5b3 is aan die eenkant min of meer rond met twee snawels aan die anderkant terwyl die een in Fig. 5b4 kort-silindries soos die spore van *B. lateritium* vertoon. Dit is opmerklik dat die meeste van hierdie spore groter is as die normale spore en dat die spoorwand dikker is (Fig. 5b1).
- II. Sommige spore vertoon 'n afwyking in die grootte en vorm van die snawel. Twee opvallende variasies is waargeneem nl. spore met snawels wat òf langer òf dikker as die normale is. In Fig. 5c1 word 'n spoor met 'n lang snawel en in Fig. 5c2 een met 'n verdikte snawel aangetoon. In beide hierdie fotos word 'n normale spoor ook aangetoon.
- III. 'n Afwyking wat heel algemeen voorkom nl. spore met 'n ingesnoerde wand, word in Fig. 5d aangetoon. Die insnoering kom soms in die middel van die spoor voor (Fig. 5d1) en in ander gevalle nader aan die uiteinde van die spoor (Fig. 5d2). Die ingesnoerde spore is soms gesnawel (Fig. 5d3) en 'n dwarswand is in sommige gevalle by die insnoering waargeneem.
- IV. Spore met ander afwykings as dié van die vorige kategorieë, word in 'n aparte groep geplaas. 'n Eerste en interessante afwyking wat by verskeie spore opgemerk is, is spore met twee snawels (Fig. 5e1). 'n Tweede afwyking wat by 'n aantal spore opgemerk is, is 'n verlengde en verdikte aangesel aan die teenoorgestelde kant as die snawel (Fig. 5e2) wat moontlik 'n verdikte steeltjie is (sien ook Fig. 6b).

Nieteenstaande die indeling van die abnormale spore van *B. rostratum* in vier kategorieë, is dit duidelik dat die variasie

in spoormorfologie nie 'n reëlmatige patroon volg nie. Uit die resultate kan egter afgelei word dat spoorvorm sowel as snawel=lengte en -dikte by hoë temperature onbetroubare taksonomiese kenmerke is.

Met die elektronmikroskopiese ondersoek is geen verskil in die wandstruktuur van die spore van enige van die twee spesies by enige van die temperature gevind nie.

HOOFSTUK 5

DIE INVLOED VAN LIG AS KULTUURFAKTOR

In 'n ondersoek na die invloed van lig op die sporulasie en spoormorfologie van *Botryoderma lateritium* en *B. rostratum*, is HMA as voedingsmedium gebruik en die kulture vir 14 dae by 25° geïnkubeer. Vir die beligtings- en bestralingseksperimente is "Schott & Mainz" 70 x 10mm petribakkies gebruik. Die transmissiespektrum van hierdie petribakglas is met 'n Zeiss PM Q II spektrofotometer bepaal. Die resultaat word grafies voorgestel in Fig. 7.

5.1 METODES

5.1.1 Die invloed van ligintensiteit

Vir lae ligintensiteite is twee 30cm 8W witlig Atlas fluoressente buise gebruik. Hierdie buise is 8cm van mekaar in die middel onder die afkoelingseenheid van 'n Gallenkamp-oond ("cooled incubator") model H-330, ingebou. In die oond is die ligintensiteit op 'n afstand van 22cm onder die ligbron met 'n Weston model 756 ligmeter bepaal. Die fotosel van die meter is met 'n skoon deksel van dieselfde soort petribak waarin die kulture was, bedek. Die intensiteit is op vyf verskillende plekke op die rak in die oond bepaal. Maksimum- en minimumlesings van 9 en 5 lux onderskeidelik met 'n gemiddelde waarde van 7 lux is verkry. Die meter gee die lesings in vt/kers. Die omsetting na lux geskied deur met 10,76 te vermenigvuldig (Weast, 1968). Die kulture is op 'n rak 22cm vanaf die ligbron geplaas en die posisie van die bakkies periodiek verander deur hulle daaglik om 2000 uur te verskuif sodat 'n min of meer reëlmatige beligting op al die kulture verkry kon word.

Vir 'n hoër ligintensiteit is 'n stel van vier 40W witlig Atlas fluoressente buise van 120 cm elk in 'n konstante-temperatuurkamer (25°) opgestel. Die afstand tussen die buise was 10mm en die ligmeterlesings op 'n afstand van 31,5 cm onder die buise, was soos volg:

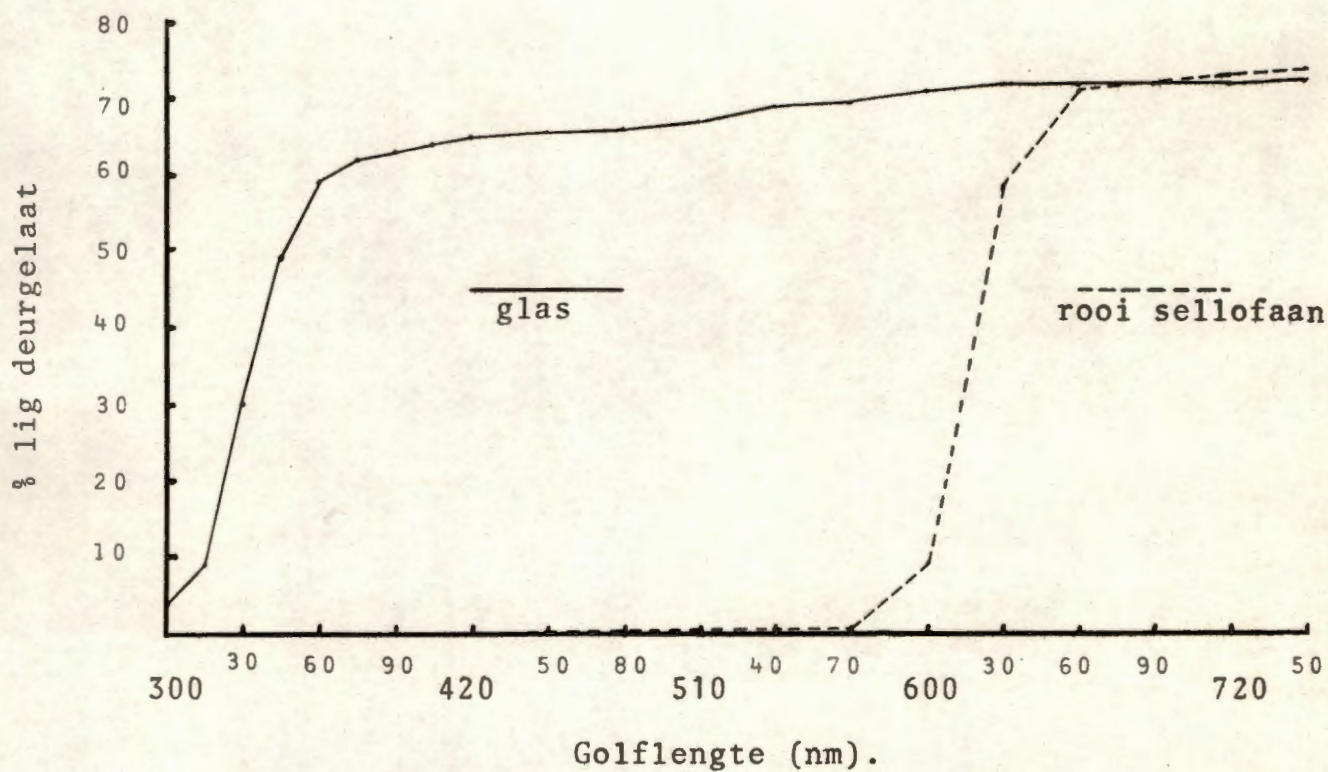


Fig. 7. Die transmissie van witlig deur petribakglas en rooi sellofaan.

Maksimumlesing - 77 lux.

Minimumlesing - 54 lux.

Die gemiddeld van ses lesings op verskillende plekke onder die buise, was 63 lux. Die kulture is op 'n afstand van 31,5cm onder die ligbron geplaas.

5.1.2 Die invloed van ligkwaliteit

In die vorige eksperimente is van die volle ligspektrum gebruik gemaak vir die beligting van die kulture. Eksperimente om die invloed van die korter (blou deel) en langer golwe (rooi deel) van die ligspektrum op die sporulasie en spoormorfologie te ondersoek, is ook beplan.

Om die invloed van die korter golflengtes te ondersoek, is 'n 38cm Philips 57415 ^P/30 15W fluoressente buis as ultraviolet (UV) ligbron gebruik. Hierdie buis is in 'n staalkas in die konstante-temperatuurkamer geïnstalleer. Die kante van die kas is met weerkaatsende aluminiumblad uitgevoer om 'n eweredige bestraling te verkry. Die kulture is met die deksels na 52cm onder die ultravioletbuis geplaas. Na 14 dae is die sporulasie sowel as die spoormorfologie op die gewone wyses ondersoek.

Die invloed van rooilig is ondersoek deur gebruik te maak van die stel van vier 120cm 40W witlig Atlas fluoressente buise as ligbron en 'n dubbelvel rooi sellofaanpapier as filter. Die fluoressente buise is op 'n afstand van 20cm bokant die kulture opgestel en die sellofaan dig om die stel buise aan die buishouer vasgeheg. 'n Dubbelvel sellofaanpapier is aangebring na aanleiding van die resultate van 'n lootsproef om die persentasie deurlaatbaarheid van die sellofaan vir rooilig te bepaal. Die bepaling is met 'n Zeiss PM Q II spektrofotometer gedoen en die resultate met twee strokies rooi sellofaanpapier word in Fig. 7 aangetoon.

Die intensiteit van die rooilig is met die Weston 756 ligmeter op ses verskillende plekke onder die stel buise bepaal en het van 3-5 lux gewissel.

'n Dubbel ry kulture is onder die ligbron geplaas en periodiek verskuif om te verseker dat elke kultuur sover moontlik in die geheel aan min of meer dieselfde ligintensiteit blootgestel is.

5.1.3 Die invloed van die duur van bestraling

Die ondersoek na die invloed van die duur van witlig bestraling op die twee swamspesies is in die Gallenkampoond met die ingeboude ligbron, uitgevoer (sien 5.1.1). Twee ligtoestande is tydens hierdie eksperimente gebruik nl. onafgebroke beligting vir 14 dae en afwisselende lig- en donkerperiodes van 12 uur vir 14 dae. Vir lg. eksperiment is die kulture op 'n vel swart papier op die rak in die oond geplaas en elke dag om 0800 uur met 'n swart plastieksak en 'n ligdigte kartondoos bedek. Die kulture is die volgende dag om 2000 uur weer aan die lig blootgestel. Hierdie twee eksperimente is later onder dieselfde toestande vir die elektronmikroskopiese ondersoekinge herhaal. In hierdie geval is daar vir die 12-uur fotoperiodiese ligtoestand van 'n outomatiese tydskakelaar gebruik gemaak.

5.2 RESULTATE

5.2.1 Sporulasie

Die individuele spoortellings word in die bylaag in Tabelle 8-15 uiteengesit. 'n Opsomming van hierdie resultate word in onderstaande Tabel 7 en in Fig. 8 aangetoon.

5.2.2 Spoormorfologie

Die spoorvorms van beide spesies onder onafgebroke beligting met witlig (intensiteit 7 lx) stem ooreen met dié by standaardtoestande en geen afwykings is waargeneem nie. Afwykings in die spoorvorm is egter by *B. rostratum* onder UV-bestraling, rooilig en onder 12-uur fotoperiodiese beligting met witlig (7 lux), waargeneem en word in Figure 9, 10 en 11 respektiewelik aangetoon.

Tabel 7.

Gemiddelde spoorgetalle per cm² kolonie-oppervlakte vir beide spesies onder verskillende ligtoestande

Ligtoestand	<i>B. rostratum</i>	<i>B. lateritium</i>
Ligintensiteit: 7 lux.	1 279 168	5 629 171
63 lux.	-	-
Ligkwaliteit: UV.	5 791 671	9 791 675
rooilig.	17 800 014	9 483 341
witlig (71x).	1 279 168	5 629 171
Duur van bestraling:		
(witlig 7 lux):		
onafgebroke.	1 279 168	5 629 171
12-uur fotoperio-		
des.	3 391 670	8 904 174
geen (donker).	13 991 678	6 441 672

'n Vergelykende skandeerelektronmikroskopiese ondersoek van die uitwendige wandstruktuur van die spore van kulture van beide spesies onder die verskillende ligtoestande en dié van standaardkulture, het geen beduidende verskille aangetoon nie.

Die spoormate vir beide spesies is bepaal soos in 3.1 beskryf en word in Tabel 8 aangetoon.

Tabel 8.

Spoormate (µm) vir *B. rostratum* en *B. lateritium* onder verskillende ligtoestande

Ligtoestand	<i>B. lateritium</i>	<i>B. rostratum</i>	
		Spoor	Snawellengte
Onafgebroke witlig (7 lx).	4-7 x 4-8	4-6 x 5-8	2
UV-bestraling.	4-6,5 x 4-7	4-6 x 5-8	3
Rooilig.	4-6 x 4,5-7	4-6 x 5-8	6
12-uur fotoperiodes (witlig 7 lx)	4-6 x 4-7	3-5 x 4-8	3
Donker.	4-6 x 4-8	4-6 x 4,5-9	5,5

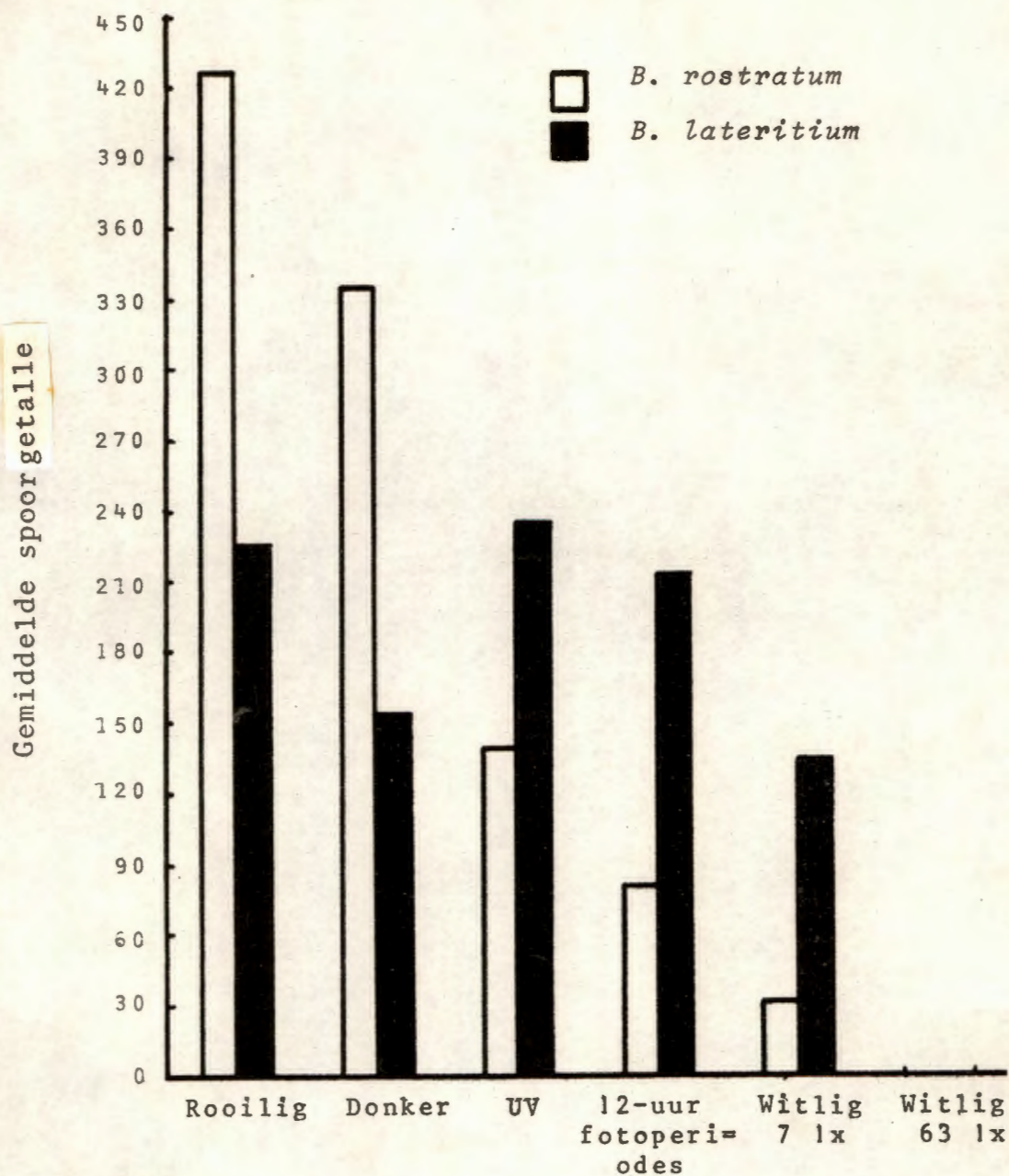


Fig. 8. Die invloed van lig op die sporulasie van *Botryoderma rostratum* en *B. lateritium*.

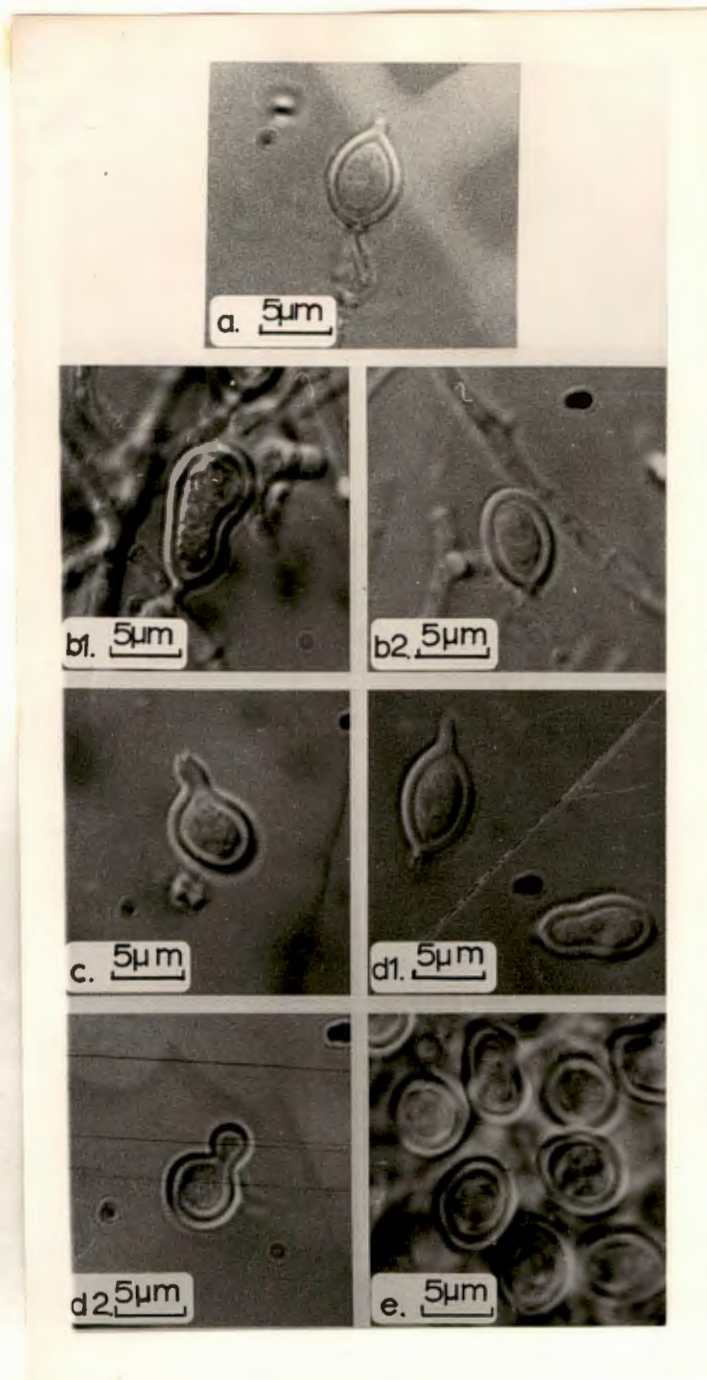


Fig. 9. Spoorvorms van *Botryoderma rostratum*-kulture gekweek op HMA by 25° onder onafgebroke UV-bestraling vir 14 dae. Normale spore: a. Abnormale spore: b-d Groep spore sonder snawels: e.

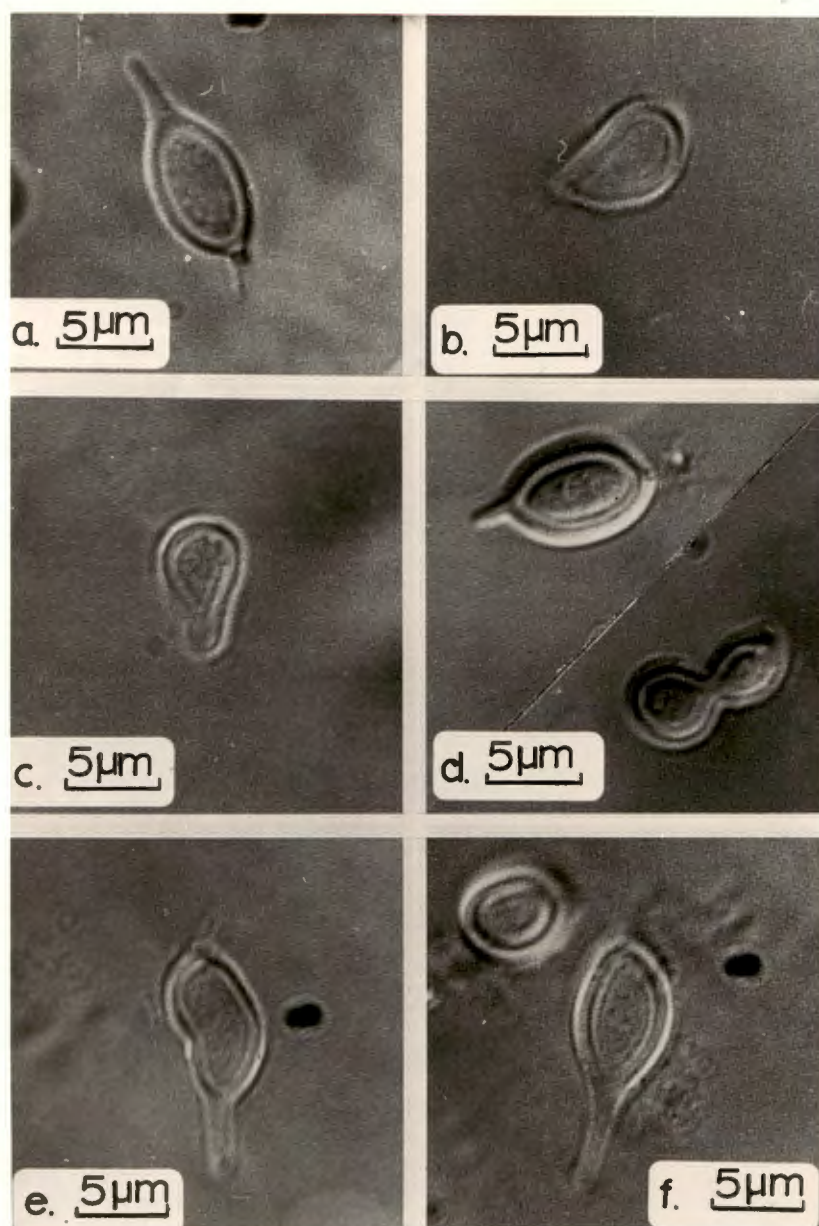


Fig. 10. Spoorvorms van *B. rostratum*-kulture gekweek op HMA by 25° onder onafgebroke rooilig vir 14 dae. Normale spoor: a. Abnormale spore: b-e. Spore met lang snawels: f.

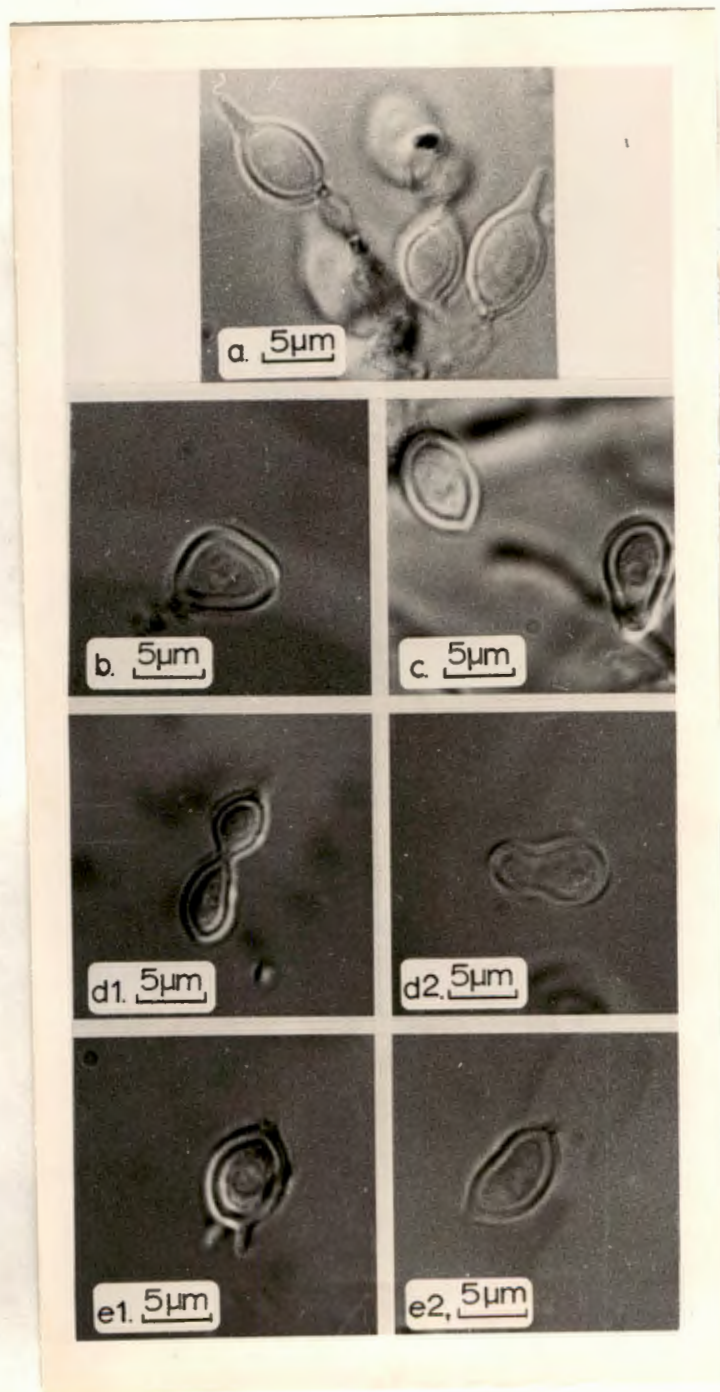


Fig. 1. Spoorvorms van *B. rostratum*-kulture gekweek op HMA by 25° onder 12-uur fotoperiodiese beligting vir 14 dae. Normale spore: a. Abnormale spore: b-e.

5.3 BESPREKING

5.3.1 Die algemene invloed van lig en die besondere effek van ligintensiteit.

By 'n vergelyking van die spoorproduksie onder toestande van onafgebroke donker en onafgebroke of fotoperiodiese beligting met kunsmatige witlig (intensiteit 7 lux), is dit duidelik dat so 'n beligting die sporulasie van *B. rostratum* nadelig beïnvloed (Tabel 7, Fig. 8). Die swam sporuleer beter in die donker as in onafgebroke lig met 'n intensiteit van 7 lux. By 'n ligintensiteit van 63 lux vind geen groei plaas nie. Dit is moontlik om swamme op grond van bestaande gegewens (Literatuuroorsig, p 4) in verskillende groepe te verdeel na aanleiding van die invloed van lig op spoorproduksie. Op grond van die resultate wat vir *B. rostratum* verkry is, kan hierdie swam in groep 3 (lig nadelig vir sporulasie) van hierdie groepering geplaas word.

In die geval van *B. lateritium* is slegs 'n geringe verskil in die gemiddelde spoorgetalle per cm^2 kolonie-oppervlakte vir kulture in onafgebroke donker (6 441 672 - Tabel 8) en dié in onafgebroke lig (5 629 171 - Tabel 8) gevind. Die histogramme in Fig. 8 toon egter dat die swakste sporulasie by hierdie swam tydens onafgebroke witligbestraling met 'n intensiteit van 7 lux, plaasvind. Daar is verder gevind dat, net soos in die geval van *B. rostratum*, geen groei onder onafgebroke bestraling met witlig van 'n hoër intensiteit (63 lux) plaasvind nie. Daar bestaan dus aanduidings dat verhoogde ligintensiteit sporulasie by *B. lateritium* nadelig beïnvloed. Aangesien daar egter nie 'n betekenisvolle verskil tussen die sporulasie in die donker en in onafgebroke witlig (7 lux) is nie, kan hierdie swam in groep 4 van die voorgestelde indeling (Literatuuroorsig, p 5) geplaas word. Die spoorproduksie van swamme in hierdie groep word nie deur lig beïnvloed nie.

Dat die onderdrukking van die groei by hierdie twee spesies onder hoë ligintensiteit (63 lux) egter slegs 'n tydelike verskynsel is, kan aangetoon word deur die kulture, wat vir 14 dae so be-

lig is, daarna by dieselfde temperatuur in die donker te plaas. In die donker groei hierdie kulture bevredigend en bereik by *B. lateritium* na nege dae 'n gemiddelde deursnee van 23,5mm en by *B. rostratum* 'n deursnee van 44,5mm. Die sporulasie is egter swak en die gemiddelde grootte van die sporulerende gedeeltes het 'n deursnee van slegs 20mm by *B. rostratum* en 15 mm by *B. lateritium*.

By 'n vergelyking van die spoorproduksie van die twee spesies (Fig. 8) is dit duidelik dat *B. lateritium* beter sporuleer onder onafgebroke witlig (7 lux) as *B. rostratum*. 'n Betekenisvolle verskil in die sporulasie van hierdie twee spesies onder hierdie besondere toestande is deur toepassing van die Mann-Whitney U-toets (0,001 drempel) aangetoon. Dit is dus duidelik dat die spoorproduksie by *B. rostratum* tydens bestraling met kunsmatige witlig (7 lux) nadelig beïnvloed word. Die sporulasie by *B. lateritium* word egter nie deur lig beïnvloed nie en hierdie swam sporuleer in die lig beter as *B. rostratum*.

Die spoormate van kulture onder onafgebroke beligting (7 lux), verskil slegs in 'n geringe mate van dié wat onder standaardtoestande gekweek is (Tabel 8). Hierdie verskille is egter nie van so 'n aard dat dit as betekenisvolle afwykings beskou kan word nie. In geval van *B. rostratum* is egter gevind dat die maksimum lengte van die spoorsnawel (2µm) korter is as dié van die standaardspore (5,5µm). Dit wil dus voorkom of lig ook nadelig is vir die normale ontwikkeling van die spoorsnawel waar dit by spore van *B. rostratum* voorkom.

Die skandeerelektronmikroskopiese ondersoek van die struktuur van die spoorwand het, in vergelyking met dié van standaardspore, geen afwyking by enige van die spesies aan die lig gebring nie.

5.3.2 Die invloed van ligkwaliteit

Daar is opgemerk dat die spoorproduksie van *B. rostratum* onder die verskillende ligkwaliteite groot verskille vertoon, terwyl hierdie faktor op die sporulasie van *B. lateritium* slegs

'n geringe invloed het (Fig. 8 en Tabel 7). Volgens Gupta (1965) se seleksieprosedure kan met 97,5% sekerheid beslis word dat *B. rostratum* 'n maksimale spoorproduksie onder rooilig gee. Met 97,5% sekerheid kan beslis word dat maksimale spoorproduksie by *B. lateritium* onder òf rooilig òf UV-bestraling plaasvind.

Kunsmatige witlig met golflengte 400-700 nm (dagligtype fluoressente buise) het 'n nadelige uitwerking op die spoorproduksie van *B. rostratum* (5.3.1) terwyl die swam goed sporuleer onder beide UV (325-400 nm) en rooilig (600-800 nm). Dat die spoorproduksie van swamsoorte deur UV-bestraling verhoog word, is deur verskeie navorsers aangetoon (Sanderson, 1970; Leach, 1967, 1964, 1963, 1962a, 1962b, 1961; Carlile, 1965; Leach & Trione, 1965; Marsh, et al., 1959). Miller & Reid (1961) beweer dat wanneer swamme lig benodig vir sporulasie, die blou deel van die spektrum gewoonlik effektief is. *B. lateritium* toon tydens UV-bestraling 'n hoër spoorproduksie as tydens onafgebroke donker. Dit is egter nie die geval met *B. rostratum* nie. Hierdie spesies sporuleer beter in onafgebroke donker as onder onafgebroke UV-bestraling. By hierdie swam vind maksimale spoorproduksie egter onder rooilig plaas. Die verskynsel dat sommige swamme in die donker of in rooilig beter as in wit- of bloulig sporuleer, is deur slegs 'n paar navorsers aangetoon. McClellan, et al., (1955) het gevind dat *Monilinia fructicola* goed sporuleer in rooilig en in die donker. Die resultate van Lukens (1963) met *Alternaria solani* toon ooreenstemming met dié vir *B. rostratum* in hierdie ondersoek. Hy het gevind dat *Alternaria solani* goed in rooilig en in die donker sporuleer en dat konidiums nie in blou lig gevorm word nie.

Die Mann-Whitney U-toets (Siegel, 1956) is gebruik om die verskille in sporulasie vir die twee spesies onder die verskillende ligkwaliteite (witlig, UV en rooilig) te ontleed. Met hierdie ontleding is die nulhipotese met betrekking tot die sporulasie onder witlig (intensiteit 7 lx) op die 0,01 drempel verwerp. Daar is dus 'n betekenisvolle verskil tussen die twee spesies wat sporulasie onder hierdie ligtoestand betref en die resultate toon aan dat *B. lateritium* onder witlig 'n hoër spoor=

produksie as *B. rostratum* het (Fig. 8). Afsien van 'n paar hoër spoortellings vir *B. rostratum* (bylaag: Tabelle 12, 13) is die verskil in sporulasie vir die twee spesies onder rooilig nie betekenisvol nie en kan die nulhipotese nie op die 0,01 drempel verwerp word nie. Die spoorgetalle toon egter dat *B. rostratum* onder rooilig beter as *B. lateritium* sporuleer (Fig. 8). Met UV-bestraling kan die nulhipotese op die 0,001 drempel verwerp word en *B. lateritium* sporuleer die beste van die twee spesies onder hierdie ligtoestand (Tabel 7; Fig. 8).

In verband met spoormorfologie is gevind dat die spoormate van die spore van *B. lateritium* onder die verskillende ligkwaliteite, slegs geringe verskille met dié van standaardspore vertoon. In die geval van *B. rostratum* was daar egter 'n opmerklike variasie in die lengte van die spoorsnawel (Tabel 8). Onder onafgebroke witlig (7 lux) en in 'n mindere mate by 12-uur fotoperiodes en UV-bestraling, is die snawels kort, terwyl oorwegend lang snawels onder rooilig waargeneem is (Tabel 8, Fig. 9;10).

Wat die spoorvorme betref, is afwykings slegs by *B. rostratum* aangetref. Onder beide rooilig en UV-bestraling is enkele abnormale spore (Fig. 9b-d;10b-e) onder die oorwegend normales (Fig. 9a;10a) aangetref. Die spore met afwykings kan in dieselfde kategorieë as wat by 'n temperatuur van 40° die geval was, ingedeel word (4.3, p 35).

- I. In die eerste kategorie is spore waarvan die vorm geheel en al verander het (Fig. 9b1;10b). Onder UV-bestraling word heelwat spore aangetref met die tipiese breed-ellipsvormige voorkoms van *B. lateritium*-spore (Fig. 9b2).
- II. 'n Tweede groep spore vertoon afwykings in die snawels. Daar is waargeneem dat die snawels verdik is (Fig. 9c;10c) in teenstelling met die spits punte van die normale snawels (Fig. 9a;10a).
- III. Ingesnoerde spore is onder albei ligtoestande aangetref (Fig. 9d;10d) en kan duidelik van die normale spore onderskei word (Fig. 9d1;10d1). Soms is die insnoering mediaan

(Fig. 10d1) en soms meer distaal (Fig. 9d2).

IV. 'n Laaste groep abnormale spore, met afwykings wat nie in die kategorieë hierbo ingedeel kan word nie, word in Fig. 10e aangetoon. Hierdie spore is slegs onder rooilig aangetref. Hulle het die kenmerkende *B. rostratum* vorm (spoel-ellipsvormig) met 'n normale snawel, maar aan een van die kante kom 'n duidelike induiking in die wand voor.

'n Opmerklike verskil tussen normale spore van kulture na UV- en rooilig bestraling, is dat die spore wat onder lg. toestand ontwikkel het, langer snawels het as dié wat met UV bestraal is (Tabel 8; Fig. 9e; 10f).

'n Elektronmikroskopiese ondersoek van die spoorwand het geen afwyking van die normale struktuur onder enige van hierdie ligtoestande aangetoon nie.

5.3.3 Die invloed van die duur van beligting

Die seleksieprosedure van Gupta (1965) is toegepas om die resultate van die spoortellings van kulture wat vir verskillende tye belig is, te ontleed. Volgens hierdie ontleding kan met 97,5% sekerheid beslis word dat 'n tydsduur van 12-uur fotoperiodiese beligting in die geval van *B. lateritium* die beste sporulasie sal verseker. Volgens dieselfde toets kan met 97,5% sekerheid beweer word dat *B. rostratum* 'n maksimale sporulasie in onafgebroke donker sal gee (Fig. 8). Beide spesies sporuleer beter onder 12-uur fotoperiodiese as onder onafgebroke beligting.

Onder 'n toestand van afwisselende lig en donker periodes van 12 uur, word opeenvolgende ringe van digte rooskleurige gedeeltes afgewissel met gryskleurige dele van minder digte groei, in die kolonies waargeneem. Hierdie sg. sonerings, wat o.a. onder die invloed van lig en temperatuur ontstaan, is 'n bekende verskynsel wat reeds by 'n groot verskeidenheid swamsoorte aangetoon is (Marsh, et al., 1959). Sagromsky (1952) het i.v.m. sonering identiese waarnemings by twee *Penicillium* spesies gemaak. In 'n vergelyking van die spoorproduksie van *B. lateritium* en

B. rostratum onder verskillende tydperke van beligting, is die spoortellings met die Mann-Whitney U-toets (Siegel, 1956) ontleed. Volgens hierdie toets kan die nulhipotese in die geval van onafgebroke beligting op die 0,001 drempel verwerp word. *B. lateritium* sporuleer onder hierdie toestand beter as *B. rostratum* (Fig. 8). Met geen beligting (onafgebroke donker) kan die nulhipotese weereens op die 0,001 drempel verwerp word maar in hierdie geval is *B. rostratum* die beste sporuleerder (Fig. 8). In die geval van afwisselende lig en donker periodes van 12-uur, kan die nulhipotese op die 0,01 drempel verwerp word en toon *B. lateritium* die hoogste spoorproduksie (Fig. 8).

In verband met die spoormorfologie, kom die enigste opmerklike afwykings by die spore van *B. rostratum* voor. Ten eerste is aangetoon dat sommige van die spore wat onder 12-uur fotoperiodes ontwikkel het, kleiner is as dié wat onder standaardtoestande gevorm is (Tabel 8). Tweedens is opgemerk dat die snawels van spore wat onder 12-uur fotoperiodiese en onafgebroke beligting ontwikkel het, korter is as dié van spore wat in die donker (dus onder standaardtoestande) gekweek is (Tabel 8).

Wat die spoorvorms onder afwisselende lig en donker periodes van 12-uur betref, is daar slegs in die geval van *B. rostratum* afwykings van die standaardvorm opgemerk. Anbormale en normale spore is in dieselfde kulture aangetref. Die abnormale spore vertoon variasies wat min of meer ooreenstem met dié van spore wat onder die volgende toestande ontwikkel het: (a) 40°, (b) UV-bestraling en (c) rooilig. Hulle kan weereens in dieselfde kategorieë as in die geval van 40° (4.3 p 35) ingedeel word.

1. 'n Algehele vormverandering (Fig. 11b).
2. 'n Snawelvariasie (Fig. 11c).
3. 'n Mediane (Fig. 11d1) en distale (Fig. 11d2) insnoering.
4. Ander afwykings (Fig. 11e). In hierdie geval word spore met twee snawels aangetref (Fig. 11e1) sowel as spore met die normale vorm behalwe vir 'n induiking aan een kant van die spoor (Fig. 11e2).

Dit is opmerklik dat onder onafgebroke donker sowel as onafgebroke beligting geen abnormale spore waargeneem is nie.

Uit die resultate kan afgelei word dat verskillende ligtoestande die sporulasie van albei spesies beïnvloed en dat die spoormorfologie van *B. rostratum* onder sekere ligtoestande nl. (a) UV-bestraling, (b) rooilig en (c) 12-uur fotoperiodiese beligting (witlig, 7 lx) onbetroubare taksonomiese kenmerke is.

Die elektronmikroskopiese ondersoek van die uitwendige struktuur van die spoorwand het geen verskille tussen spore onder die verskillende toestande vir enige van die spesies aangetoon nie.

DIE INVLOED VAN VOEDINGSMEDIUM AS KULTUURFAKTOR

6.1 METODEDES

Dieselfde mediums wat aanvanklik gebruik is vir die bepaling van die medium waarop maksimale groei en sporulasie plaasvind, t.w. ertappeldekstrose-agar (EDA), hawermoutagar (HMA), mieliemeelagar (MMA), mieliemeelagar met dekstrose (MDA), moutagar (MA) en Czapekagar (CA), is gebruik om die invloed van die voedingsmedium op sporulasie en spoormorfologie te ondersoek. Die mediums is voorberei soos beskryf in 2.2.1 p 7. Albei spesies is op die gewone manier (2.2.3 p 16) vanaf die voorraadkulture op die verskillende mediums oorgeënt en die kulture is vir 14 dae by 25° in die donker geïnkubeer. Die bepaling van die sporulasie en die ondersoek na die spoormorfologie met die lig- en elektronmikroskope, is uitgevoer soos beskryf in 2.2.2 (p 16), 3.1.1 (p 18), en 3.1.2 (p 22) respektiewelik. Op al die verskillende mediums is goeie groei verkry, sodat spoorsuspensies in alle gevalle berei is deur drie agarskywe op die gewone manier te homogeniseer.

6.2 RESULTATE

6.2.1 Sporulasie

Die individuele spoortellings word in tabelle 3, 4 (vir HMA) en 16-25 (vir die ander mediums) in die bylaag aangegee.

Tabel 9.

Gemiddelde spoorgetalle per cm² kolonie-oppervlakte vir *B. rostratum* en *B. lateritium* op verskillende voedingsmediums

Medium	<i>B. rostratum</i>	<i>B. lateritium</i>
HMA	13 991 678	6 441 672
MMA	1 995 835	1 879 168
MA	1 125 001	3 779 170
CA	620 834	225 000
EDA	225 000	11 654 176
MDA	50 000	4 391 670

6.2.2 Spoormorfologie

Tabel 10.

Spoormate in μm vir *B. lateritium* en *B. rostratum* op verskillende voedingsmediums

Medium	<i>B. lateritium</i>	<i>B. rostratum</i>	
		Spoor	Snawellengte
HMA	4-6 x 4-8	4-6 x 4,5-9	5,5
EDA	4-6 x 4,5-8	4-6 x 4-7	2
MMA	4-5 x 5-7	4-5,5 x 5-9	4
MDA	4-4,5 x 5-8	4-6 x 5-7	4
MA	4-6 x 4,5-8	4-6,5 x 5-8	4
CA	4-6 x 4-8	4-6 x 4-10	6

Beide die ligmikroskopiese en die elektronmikroskopiese ondersoekinge het geen afwyking in spoorvorm of wandstruktuur van die spore van kolonies wat op verskillende mediums gekweek is, aangetoon nie.

6.3 BESPREKING

Uit die gegewens in Tabel 9 en Fig. 12 is dit duidelik dat die hoogste spoorproduksie by *B. rostratum* en *B. lateritium* respektiewelik op HMA en EDA voorkom. Volgens Gupta (1965) se seleksieprosedure kan met 97,5% sekerheid vir elke spesie beslis word dat die genoemde mediums die beste spoorproduksie verseker. Van die ses verskillende mediums wat gebruik is, vind die beste sporulasie in die geval van *B. rostratum* slegs op HMA plaas. Op al die ander mediums sporuleer hierdie spesie opvallend swaker en is daar nie een gemiddelde spoorgetal hoër as 2 000 000 spore per cm^2 kolonie-oppervlakte verkry nie. In die geval van *B. lateritium* is goeie spoorproduksie op EDA, HMA en MA verkry en gemiddelde spoortellings van 3 000 000 - 4 500 000 spore per cm^2 kolonie-oppervlakte is op hierdie mediums verkry. Die resultate t.o.v. spoorproduksie van *B. lateritium* op MA en EDA (Tabel 9) verskil van die waarnemings van Papendorf en Upadhyay (1969).

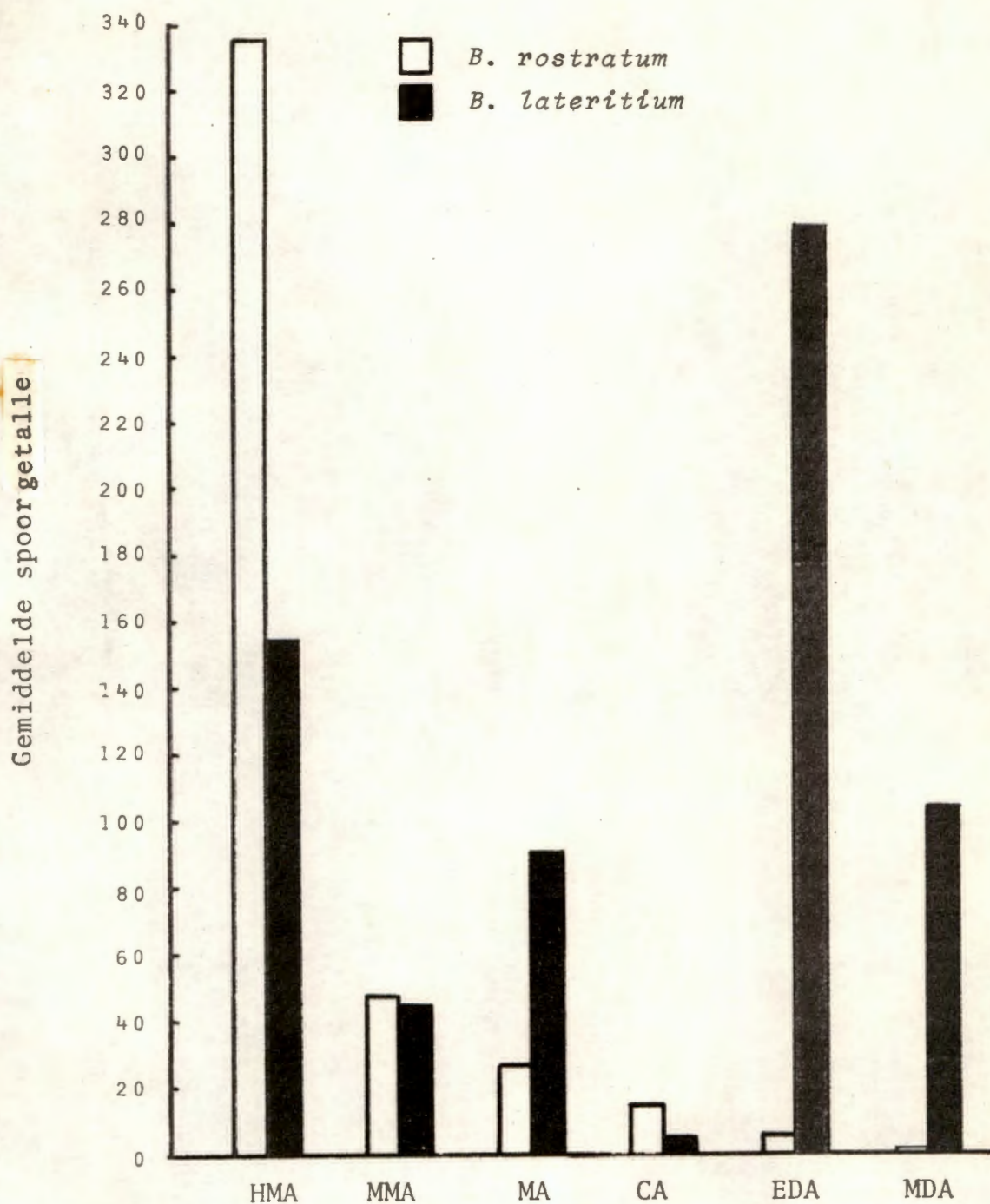


Fig. 12. Die invloed van verskillende voedingsmediums op die sporulasie van *Botryoderma rostratum* en *B. lateritium*.

In die huidige ondersoek is vasgestel dat 'n hoë spoorproduksie op EDA en slegs 'n redelike sporulasie op MA voorkom. Die resultate toon verder dat *B. lateritium* oor die algemeen op al die mediums behalwe HMA en CA beter sporuleer as *B. rostratum*. Hierdie resultate word ook deur 'n statistiese ontleding van die spoortellings bevestig. Met die Mann-Whitney U-toets (Siegel, 1956) kan op die 0,001 drempel aangetoon word dat die sporulasie van die twee spesies op HMA, EDA, MDA, MA en CA verskil, met *B. rostratum* die beste sporuleerder op HMA en CA en *B. lateritium* die beste op EDA, MDA en MA. Slegs in die geval van MMA kan die nulhipotese op die 0,10 drempel nie verwerp word nie en is daar dus geen betekenisvolle verskil in die sporulasie van die twee spesies op hierdie medium nie. Die spoorproduksie vir *B. rostratum* op MMA is laer as op HMA terwyl *B. lateritium* swakker op MMA as op HMA, MA, EDA en MDA sporuleer (Fig. 12). Goeie sporulasie vir beide spesies is slegs op HMA verkry. Beide spesies toon 'n swak sporulasie op die sintetiese medium, CA.

Dit is opmerklik dat *B. rostratum* die swakste sporuleer op dié twee mediums wat dekstrose bevat nl. EDA en MDA (Fig. 12 en Tabel 9). Die gemiddelde spoorproduksie per cm² kolonie-oppervlakte is 50 000 op MDA, terwyl dit vermeerder tot 1 995 835 op MMA. Daar is dus aanduidings dat dekstrose onder die huidige eksperimentele toestande die sporulasie van *B. rostratum* nadelig beïnvloed. Hierdie verskynsel is ook waargeneem by *Septoria tritici* (Wechmar, 1961). Sy het gevind dat die spoorproduksie laer was by 'n dekstrosekonsentrasie van 1,2% as by 0,8% en nog swakker was by 'n konsentrasie van 6%. Miller (1969) het soortgelyke resultate met *Cercospora gossypina* verkry. Hy het gevind dat die sporulasie toeneem namate die glukosekonsentrasie in die medium afneem. In 'n reeks konsentrasies van 0,0; 5,0 en 10,0g glukose per liter, het maksimale sporulasie op die medium wat geen glukose bevat het nie, plaasgevind. In die geval van *B. lateritium* het dekstrose nie 'n nadelige uitwerking op sporulasie nie aangesien 'n hoër spoorproduksie op MDA as op MMA verkry is. Trouens die medium waarop hierdie spesie die beste sporuleer, nl. EDA, bevat 2% dekstrose. Uit die resultate is dit dus duidelik

dat die samestelling en aard van die voedingsmedium 'n besliste invloed op die spoorproduksie van *B. rostratum* en *B. lateritium* het.

In verband met die spoormorfologie toon die resultate dat die spoormate vir *B. lateritium* op al die mediums ooreenstem met dié van die standaardspore (Tabel 10). Die spoormate vir *B. rostratum* toon egter verskille met dié van die spore onder standaardtoestande. Die spoormate van kulture wat op EDA en MDA, (mediums wat dekstrose bevat) gekweek is, is kleiner as dié van kulture wat op ander mediums gekweek is (Tabel 10). In die geval van EDA is die spoorsnawel ook besonder kort en is 'n maksimale lengte van slegs 2µm waargeneem. Die grootste spore met die langste snawels is op die sintetiese medium, CA waargeneem.

Die aard van die voedingsmedium het dus beslis 'n invloed op die sporulasie van beide hierdie spesies, dog behalwe vir 'n geringe invloed op die spoormate van *B. rostratum*, word geen invloed op die spoormorfologie uitgeoefen nie.

OPSOMMING

Vir die afbakening en identifikasie van spesies in die Hyphomycetes, word vir taksonomiese doeleindes o.a. van verskillende spoorkenmerke gebruik gemaak. Die betroubaarheid van sommige van die spoorkenmerke word dikwels in twyfel getrek en in baie gevalle is ook aangetoon dat omgewingstoestande die spoormorfologie kan beïnvloed. Waar spoorkenmerke dus in taksonomiese werk vir klassifikasie- of identifikasiedoeleindes aangewend word, behoort rekening gehou te word met die invloed van kultuurtoestande op die spoormorfologie. Aangesien baie swamspesies hulle sporuleervermoë in vitro verloor, kan dit van belang wees om te weet wat die optimumtoestande vir sporulasie by sulke spesies is.

In hierdie ondersoek is die invloed van temperatuur, lig en die voedingsbodem op die spoormorfologie, uitwendige spoorultrastruktuur en sporulasie van twee nuwe swamspesies nl. *Botryoderma rostratum* Papend. en Upadh. en *B. lateritium* Papend. en Upadh., bestudeer.

Wat spoorproduksie betref is daar gevind dat verskillende toestande van temperatuur, lig en voedingsmedium wel die sporulasie beïnvloed. In verband met spoorproduksie is vasgestel dat *B. rostratum* meer sensitief is teenoor veranderinge in kultuurtoestande as *B. lateritium*.

Daar is in verband met spoormorfologie gevind dat die vorm en die grootte van die spore van *B. rostratum* onder sekere kultuurtoestande 'n verandering ondergaan terwyl dit nie die geval by *B. lateritium* is nie. Daar is geen verandering in die uitwendige ultrastruktuur van die spoorwand van enige van die spesies by enige van die kultuurtoestande opgemerk nie.

Aangaande die temperatuurfaktor is daar gevind dat: (a) die optimumtemperatuur vir sporulasie 35° vir *B. rostratum* en 25° vir *B. lateritium* is, (b) *B. lateritium* beter by die lae temperatuur (15°) en *B. rostratum* beter by die hoë temperatuur 40°

sporuleer, en (c) die grootte en vorm van die spore van *B. lateritium* konstant bly onder die verskillende temperatuurtoestande terwyl dié van *B. rostratum* wel wysiginge ondergaan by 40°. Beide normale sowel as abnormale spore word by hierdie temperatuur gevorm. Die abnormale spore kan in vier kategorieë ingedeel word, nl. spore met 'n geheel ander vorm as die normale spore; spore met 'n abnormale snawel; spore met 'n duidelike insnoering en spore met 'n verskeidenheid ander afwykings.

In verband met die invloed van lig is die volgende gevind.

1. Maksimale sporulasie by *B. rostratum* vind onder rooilig plaas en by *B. lateritium* onder UV- en rooiligbestraling.
2. *B. lateritium* sporuleer goed onder al die verskillende ligtoestande behalwe onder onafgebroke witlig met 'n intensiteit van 63 lux waar geen groei meer plaasvind nie. Daarenteen sporuleer *B. rostratum* redelik onder UV-bestraling, swak onder witlig (7 lux) en afwisselende 12-uur fotoperiodes en ook glad nie onder witlig met 'n intensiteit van 63 lux nie.
3. Wysiginge in die spoorvorm en grootte kom by *B. rostratum* onder UV-bestraling, rooilig en afwisselende 12-uur fotoperiodes (witlig 7 lux) voor. Normale sowel as abnormale spore word onder hierdie kultuurtoestande gevorm. Die abnormale spore kan in dieselfde kategorieë as by 40° ingedeel word.

Met verskillende voedingsmediums is onderstaande resultate verkry.

1. Maksimale sporulasie vind vir *B. rostratum* op HMA en vir *B. lateritium* op EDA plaas.
2. *B. rostratum* sporuleer goed op slegs een van die ses konvensionele mediums waarmee die ondersoek gedoen is, terwyl *B. lateritium* op 'n hele aantal (EDA, HMA, MA en MDA) goed sporuleer. *B. rostratum* is gevolglik meer selektief wat die voedingsbodem betref as *B. lateritium*.
3. *B. rostratum* sporuleer swak op die twee mediums wat dekstroose as C-bron bevat. Die spore van hierdie swam is ook effe klei-

ner op hierdie mediums.

4. Die grootste spore met die langste snawels by *B. rostratum* kom op CA voor.

5. Die medium het geen invloed op die spoorvorm of die ultrastruktuur van die spoorwand van enige van die spesies nie.

SUMMARY

Experimental work has shown that many of the characteristics by which species in the Deuteromycetes are identified and classified, are unstable under varying environmental conditions. Many examples have been cited of the influence of different cultural conditions on sporulation in Fungi. In recent years it has been shown that gross morphological structure, including features such as spore size and shape, does not necessarily provide sufficiently reliable characteristics for delimiting species in the Hyphomycetes.

In the present study the influence of cultural conditions on sporulation, the morphology of the spore and the external features of the spore wall as revealed by light and electron microscopy of two new species, viz. *Botryoderma rostratum* Papend. & Upadh. and *B. lateritium* Papend. & Upadh., were investigated. From the results obtained, the following conclusions could be drawn.

1. The sporulation of both species is affected by changes in the cultural conditions.

- (a) The optimum sporulation temperature for *B. rostratum* is 35° and for *B. lateritium* 25°.
- (b) As far as the influence of light is concerned, *B. rostratum* sporulates profusely in red light and in the dark, while maximal sporulation of *B. lateritium* occurs under UV radiation and in red light. This species sporulates well under photoperiods of white light in a 12 h on-off cycle, in continuous white light of low intensity and in the dark. In both species no sporulation occurs in continuous white light of a higher intensity.
- (c) Regarding the influence of the culture medium, maximal sporulation of *B. rostratum* occurs on oatmeal agar whereas *B. lateritium* sporulates well on four of the six media used, with maximal sporulation on potato dextrose agar.

2. The size and the shape of the spores of *B. rostratum* is influenced by changes in the cultural conditions. Spores with various abnormal shapes are produced under the following cultural conditions: (a) a temperature of 40°, (b) continuous red light illumination, (c) continuous UV radiation and (d) photoperiods of white light in a 12 h on-off cycle.

3. The features of the external spore wall are not influenced by changes in the environmental factors.

VERWYSINGS

- ALEXOPOULOS, C.J. (1962). Introductory mycology. New York, John Wiley & Sons. 613 p.
- ALEXOPOULOS, C.J. & BENEKE, E.S. (1966). Laboratory manual for Introductory Mycology. Minneapolis, Burgess Publishing Co. 199 p.
- ANONIEM. (1961). Handleiding voor het microbiologisch practicum, druk 3. Utrecht, Drukkerij H.J. Smits, Oude Gracht 231. 54 p.
- ARAGAKI, M. (1961). Radiation and temperature interaction on the sporulation of *Alternaria tomato*. *Phytopathology*, 51: 803-805.
- BARNETT, H.L. & LILLY, Virgil G. (1950). Influence of nutritional and environmental factors upon asexual reproduction of *Choanephora cucurbitarum* in culture. *Phytopathology*, 40(1): 80-89.
- BARRON, G.L. (1968). The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, The Williams & Wilkin Co. 364 p.
- BIGELOW, H.E. & ROWLEY, J.R. (1968). Surface replicas of the spores of fleshy fungi. *Mycologia*, LX(4): 869-887.
- BOYDE, A. & BARBER, V.C. (1969). Freeze-drying methods for the scanning electron-microscopical study of the protozoon *Spirostomum ambiguum* and the statocyst of the cephalopod mollusc *Loligo vulgaris*. *Journal of Cell Science*, 4(1): 223-239.
- BRADLEY, D.E. (1967). Replica and shadowing techniques. (In Kay, D., red. Techniques for electron microscopy. 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 560 p.
- BRADLEY, D.E. (1954-55). A carbon technique for microbiological specimens applied to the study of the division of *Saccharomyces cerevisiae* with the electron microscope. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 74-75(3): 254-261.

- BRANCATO, F.P. & GOLDING, N.S. (1953). The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia*, 45(6): 848-864.
- BRINK, H.E. (1963). Eksperimentele fisiologie, 3de uit. Stellenbosch, Universiteitsuitgewers. 251 p.
- BROWN, M.F. & WYLLIE, T.D. (1970). Ultrastructure of micro-sclerotia of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*, 60(3): 538-542.
- BURGESS, L.W. & GRIFFIN, D.M. (1968). The influence of diurnal temperature fluctuations on the growth of fungi. *New Phytologist*, 67(1): 131-137.
- CALPOUZOS, L. & LAPIS, D.B. (1970). Effects of light on pycnidium formation, sporulation, and tropism by *Septoria nodorum*. *Phytopathology*, 60(5): 791-794.
- CALPOUZOS, L. & STALKNECHT, G.F. (1967). Effects of light on sporulation of *Cercospora beticola*. *Phytopathology*, 57(7): 679-681.
- CALTRIDER, P.G. (1961). Growth and sporulation of *Guignardia bidwellii*. *Phytopathology*, 51: 860-863.
- CARLILE, M.J. (1965). The photobiology of the fungi. *Annual Rev. of Plant Phys.* 16: 175-202.
- CHAKRABARTI, N.K. & WILCOXSON, R.D. (1970). Effects of light on sporulation by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 60(1): 171-172.
- CHANG, E-Wa Pang & TYLER, L.J. (1964). Sporulation by *Cercospora herpotrichoides* on artificial medium. *Phytopathology*, 54(6): 729-735.
- CHONA, B.L. (1932-33). The effect of cultural conditions on the growth and sporulation of an organism belonging to the group species *Aspergillus glaucus*. *The British mycol. Soc. Trans.*, 17: 221-228.
- CLARKE, J.H. & GRIFFITHS, D.A. (1970). Ascospores of some common species of *Eurotium* (*Aspergillus glaucus*) as shown by scanning electron microscopy. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 55(1): 117-122.

- CLARKE, J.A. & SALSURY, A.J. (1967). Surface ultramicroscopy of human blood cells. *Nature*, 215 (5099): 402-404.
- COCHRANE, V.W. (1958). Physiology of fungi. New York, John Wiley. 524 p.
- COLE, J.S. & FERNANDES, Desirée. (1970). Effects of light, temperature and humidity on sporulation of *Erysiphe cichoracearum* on tobacco. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 55(3): 345-353.
- COLLINS, C.H. (1967). Microbiological methods, 2nd. ed. London, Butterworths. 404 p.
- COOKE, B.M. & JONES, D. (1970). The effect of near ultraviolet irradiation and agar medium on the sporulation of *Septoria nodorum* and *S. tritici*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 54(2): 221-226.
- CRUICKSHANK, I.A.M. (1963). Environment and sporulation in phytopathogenic fungi. IV. The effect of light on the formation of conidia of *Peronospora tabacina* Adam. *Aust. J. Biol. Sciences*, 16(1): 88-98.
- DOUGLAS, D.R. & PAVEK, J.J. (1971). An efficient method of inducing sporulation of *Alternaria solani* in pure culture. *Phytopathology*, 61: 239.
- ECHLIN, P. (1968). The use of the scanning reflection electron microscope in the study of plant and microbiol material. *Jour. Royal Micros. Soc.*, 88(3): 407-418.
- EZEKIEL, W.N. (1930). Modified procedure with the Keitt single-spore method. *Phytopathology*, 20(7): 583-586.
- FAHIM, M.M. (1966). The effect of light and other factors on the sporulation of *Alternaria porri*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 49(1): 73-78.
- FUNDER, S. (1953). Practical mycology. Oslo, Brøggers Boktr. Forlag. 145 p.
- GLYNNE, Mary D. (1953). Production of spores by *Cercospora herpotrichoides*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 36: 46-51.

- GOOS, R.D. (1956). Classification of the Fungi Imperfecti. *Proc. Iowa Acad. Sci.* 63: 311-320.
- GREENHALGH, G.N. (1967). A note on the conidial scar in the Xylariaceae. *New Phytologist*, 66(1): 65-66.
- GUPTA, S.S. (1965). On some multiple decision (selection and ranking) rules. *Technometrics*, 7(2): 225-245.
- GUPTA, S.S. & SOBEL, M. (1957). On a statistic which arises in selection and ranking problems. *Ann. Math. Statist.*, 28: 957-967.
- HANNON, C.I. & WEBER, G.F. (1955). A leaf spot of tomato caused by *Stemphylium floridanum* sp. nov. *Phytopathology*, 45: 11-16.
- HARTER, L.L. (1939). Influence of light on the length of the conidia in certain species of *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 26(4): 234-243.
- HAWKER, Lilian E. et. al. (1970). An electron microscope study of structure and germination of conidia of *Cunninghamella elegans* Lendner. *Journal gen. Microbiol.* 60(2): 181-189.
- HAWKER, L.E. (1968). Wall ornamentation of ascospores of species of *Elaphomyces* as shown by the scanning electron microscope. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 51(3 & 4): 493-498.
- HAWKER, Lilian E. (1957). The physiology of reproduction in fungi. Cambridge, University press. 128 p.
- HENRY, B.W. & ANDERSEN, A.L. (1948). Sporulation by *Piricularia oryzae*. *Phytopathology*, 38(4): 265-278.
- HESS, W.M. & STOCKS, D.L. (1969). Surface characteristics of *Aspergillus* conidia. *Mycologia*, LXI: 560-571.
- HEYWOOD, V.H. (1969). Scanning electron microscopy in the study of plant materials. *Micron*, 1: 1-14.
- HOUSTON, B.R. & OSWALD, J.W. (1946). The effect of light and temperature on conidium production by *Helminthosporium graminum* in culture. *Phytopathology*, 36: 1049-1055.

- HUGHES, S.J. (1953). Conidiophores, conidia and classification. *Can. Jour. Bot.*, 31: 577-659.
- HUGHES, G.C. & BISALPUTRA, Alice-Ann. (1970). Ultrastructure of Hyphomycetes. Conidium ontogeny in *Peziza ostracoderma*. *Can. Jour. Bot.*, 48(2): 361-366.
- ISAAC, Ivor. (1949). A comparative study of pathogenic isolates of *Verticillium*. *The Brit. Myc. Soc. Trans.*, 32: 137-157.
- JOHNSON, T.W. Jr. & HALPIN, J.E. (1954). Environmental effects on conidial variation in some Fungi Imperfecti. *Jour. Mitchell Soc.*, 70: 314-326.
- JOHNSON, T.W. & TUCKER, G.W. (1954). A technique for the aseptical removal of conidia from agar cultures. *Mycologia*, 46(3): 384-385.
- JONES, D. (1968). Surface features of fungal spores as revealed in a scanning electron microscope. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 51(3 & 4): 608-610.
- JONES, D. (1967). Examination of mycological specimens in the Scanning Electron Microscope. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 50(4): 690-691.
- KAISER, W.J. (1964). Effects of light on growth and sporulation of the *Verticillium* wilt fungus. *Phytopathology*, 54(7): 765-770.
- LEACH, C.M. (1967). Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Stemphylium*. *Can. Jour. Bot.*, 45(11): 1999-2016.
- LEACH, C.M. (1964). The relationship of visible and ultraviolet light to sporulation of *Alternaria chrysanthemi*. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 47(2): 153-158.
- LEACH, C.M. (1963). The qualitative and quantitative relationship of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora herbarum*. *Mycologia*, 55(2): 151-163.

- LEACH, C.M. (1962a). The quantitative and qualitative relationship of ultraviolet and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*. *Can. Jour. Bot.*, 40: 1577-1602.
- LEACH, C.M. (1962b). Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. *Can. Jour. Bot.*, 40(1): 151-161.
- LEACH, C.M. (1961). The sporulation of *Helminthosporium oryzae* as affected by exposure to near ultraviolet radiation and dark periods. *Can. Jour. Bot.*, 39: 705-715.
- LEACH, C.M. & ARAGAKI, M. (1970). Effects of temperature on conidium characteristics of *Ulocladium chartarum* and *Stemphylium floridanum*. *Mycologia*, 62: 1071-1076.
- LEACH, C.M. & TRIONE, E.J. (1965). An action spectrum for light induced sporulation in the fungus *Ascochyta pisi*. *Plant Physiology*, 40: 808-812.
- LILLY, V.G. & BARNETT, H.L. (1951). *Physiology of the Fungi*. New York, McGraw-Hill. 464 p.
- LUKENS, R.J. (1966). Interference of low temperature with the control of tomato early blight through use of nocturnal illumination. *Phytopathology*, 56: 1430-1431.
- LUKENS, R.J. (1963). Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *Amer. Jour. Bot.*, 50: 720-724.
- LYTHGOE, J.N. (1961). Effect of light and temperature on growth and development in *Thamnidium elegans*. Link. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 44(2): 199-213.
- MARSH, P.B. et al., (1959). A guide to the literature on certain effects of light on fungi: reproduction, morphology and phototropic phenomena. *Plant Disease Reporter*, Suppl. 261, 251-312.
- MASRI, S.S. (1967). An improved technique for studying spore germination of *Sclerotinia laxa*. *Phytopathology*, 57(9): 997.

- MATHUR, R.S. et al., (1950). Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology*, 40(1): 104-114.
- McCLELLAN, W.D. et al., (1955). Some responses of fungi to light. *Phytopathology* (Abstr.), 45: 465.
- MENNA, di, Margaret, et al., (1970). Sporidesmin production and sporulation in *Pithomyces chartarum*. *J. gen. Microbiol.*, 61: 87-96.
- MILLER, J.J. & REID, J. (1961). Stimulation by light of sporulation in *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz. *Can. Jour. Bot.*, 39: 259-262.
- MILLER, J.W. (1969). Cultural conditions affecting sporulation of *Cercospora gossypina*. *Phytopathology*, 59(4): 511.
- MILLS, J.T. (1970). Morphology of conidia of *Cochliobolus sativus* from untreated and fungicide-treated barley seed. *Can. Jour. Bot.*, 48(3): 541-546.
- MRAK, E.M. & BONAR, L. (1938). The effect of temperature on asci and ascospores in the genus *Debaryomyces*. *Mycologia*, 30(2): 182-186.
- OATLEY, C.W. (1966). The scanning electron microscope. *Sci. Prog.*, Oxf. 54: 483-495.
- OLD, K.M. & ROBERTSON, W.M. (1969). Examination of *Cochliobolus sativus* recovered from natural soil using transmission and scanning electron microscopy. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 53(2): 217-221.
- PAPENDORF, M.C. & UPADHYAY, H.P. (1969). *Botryoderma lateritium* and *B. rostratum* gen. et spp. nov. from soil in South Africa and Brazil. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 52(2): 257-265.
- PEACOCK, H.A. (1966). Elementary microtechnique. London, Edward Arnold. 547 p.
- PELLETIER, G. & AUBÉ, C. (1970). Conidial size and contents in *Verticillium* as affected by environmental factors. *Can. Jour. Microbiol.*, 16(4): 231-236.

- RAPER, K.B. & THOM, C. (1949). A manual of the Penicillia. Baltimore, The Williams & Wilkins Co. 875 p.
- RAPER, K.B. & THOM, C. (1944). New *Aspergilli* from soil. *Mycologia*, 36(6): 555-575.
- RAWLINS, T.E. (1933). Phytophathological and Botanical research methods. N.Y., John Wiley & Sons. 156 p.
- RICHARDS, G.S. (1951). Factors influencing sporulation by *Septoria nodorum*. *Phytopathology*, 41: 571-578.
- SAGROMSKY, H. (1952). Der Einfluss des Lichtes auf die rhythmische Konidienbildung von *Penicillium*. *Flora*, 139: 300-313.
- SANDERSON, F.R. (1970). *Fusarium* diseases of cereals. VII. The effect of light on sporulation of *F. nivale* in culture. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 55(1): 131-135.
- SCHENCK, N.C. & GERDEMANN, J.W. (1956). Taxonomy, pathogenicity and host-parasite relations of *Phoma trifolii* and *Phoma herbarum* var. *medicaginis*. *Phytopathology*, 46: 194-200.
- SIEGEL, S. (1956). Nonparametric Statistics. New York, McGraw-Hill. 312 p.
- SNYDER, W.C. & HANSEN, H.N. (1941). The effect of light on taxonomic characters in *Fusarium*. *Mycologia*, 33: 580-591.
- SNYDER, W.C. & TOUSSOUN, T.A. (1965). Current status of taxonomy in *Fusarium* species and their perfect stages. *Phytopathology*, 55: 833-837.
- STAVELY, J.R. & NIMMO, J.A. (1969). Effects of temperature upon growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. *Phytopathology*, 59(4): 496-498.
- STUDENT. (1906-07). On the error of counting with a haemocytometer. *Biometrika*, 5: 351-360.
- SUBRAMANIAN, C.V. (1964). Spore types in the classification of the Hyphomycetes. *Mycopath. et mycol. Applic.*, 26: 373-384.

- TOUSSOUN, T.A. & NELSON, P.E. (1968). A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. Pennsylvania, State Univ. Press. 51 p.
- TUBAKI, K. (1963). Taxonomic study of Hyphomycetes. *Ann. Rept. Inst. Ferment.*, Osaka. 1: 25-54.
- WEAST, R.C. (1968-69). Handbook of chemistry and physics, 49th ed. Ohio, The chemical and Rubber Co.
- WECHMAR, Barbara von. (1961). The influence of environmental factors on growth, sporulation and pathogenicity of *Septoria tritici* Desm. and *Septoria nodorum* Berk. and the pathological response of inoculated wheat varieties. M.Sc.-verhandeling, Universiteit Stellenbosch.
- WESTE, Gretna. (1970). Factors affecting vegetative growth and the production of perithecia in culture by *Ophiobolus graminis*. II. Variations in light and temperature. *Australian Jour. Bot.*, 18(1): 11-28.
- WILLETTS, H.J. & CALONGE, F.D. (1969). Spore development in the brown rot fungi (*Sclerotinia* spp.). *New Phytologist*, 68(1): 123-131.
- WILLIAMS, W.T. & WEBSTER, R.K. (1970). Electron microscopy of *Phytophthora capsici*. *Can. Jour. Bot.*, 48(2): 221-227.
- WOODS, R. et al., (1967). Induction of sporulation of *Phymatotrichum omnivorum* on a defined medium. *Phytopathology*, 57(2): 228-229.
- WORLEY, C.L. (1939). Interpretation of comparative growths of fungal colonies growing on different solid substrata. *Plant Physiology*, 14(3): 589-593.
- WYLLIE, T.D. & BROWN, M.F. (1970). Ultrastructural formation of sclerotia of *Macrophomina phaseoli*. *Phytopathology*, 60(3): 524-528.

- ZACHARIAH, Anna T. et al., (1956). The influence of environmental factors on cultural characters of *Fusarium* species. *Mycologia*, 48(4): 459-467.
- ZACHARIAH, K. & PASTERNAK, J. (1970). Processing soft tissues for scanning electron microscopy: simplification of the freeze-drying procedure. *Stain Tech.* 45(1): 43-45.
- ZIMMER, R.C. & McKEEN, W.E. (1969). Interaction of light and temperature on sporulation of the carrot foliage pathogen *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, 59: 743-749.

DANKBETUIGINGS

Dit is 'n voorreg om langs hierdie weg die persone wat my gedurende hierdie ondersoek behulpsaam was, te bedank.

Aan Prof. Dr. M.C. Papendorf van die Departement Plantkunde, my opregte dank en waardering vir sy leiding, belangstelling en daadwerklike hulp tydens hierdie ondersoek.

'n Woord van dank word ook gerig aan Mnr. J. Coetzee, Senior lektor, Departement Plantkunde, vir sy hulp en belangstelling.

Graag spreek ek ook my dank uit teenoor lede van die Departement Dierkunde, P.U. vir C.H.O. vir hulp verleen tydens die ondersoekinge met die skandeerelektronmikroskoop.

BYLAAG

Tabelle van spoortellings en spoorgetalle

BYLAAG

Die spoortellings en gemiddelde spoorgetalle per cm^2 kolonie-oppervlakte vir beide spesies word in Tabelle 1-25 in hierdie bylaag uiteengesit.

1. Tabelle 1-7. Kulture gekweek op HMA in onafgebroke donker by verskillende temperature (teks Hoofstuk 4).
2. Tabelle 8-15. Kulture gekweek op HMA by 25° onder verskillende ligtoestande (teks Hoofstuk 5).
3. Tabelle 16-25. Kulture gekweek in onafgebroke donker by 25° op verskillende mediums (teks Hoofstuk 6).

Tabel 1.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture by 15°

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	3	0	0	0	2	1	6	250 000
II	1	0	1	3	1	0	6	250 000
III	0	0	0	1	1	0	2	83 333
IV	1	0	2	1	1	2	7	291 667
V	0	3	0	0	0	0	3	125 000
VI	0	1	2	6	0	0	9	375 000
VII	1	4	0	3	1	1	10	416 667
VIII	0	3	0	0	3	0	6	250 000
IX	5	0	0	1	0	1	7	291 667
X	1	0	0	3	0	1	5	208 334

Tabel 2.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture by 15°

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	7	9	6	6	2	14	44	1 833 335
II	8	1	3	16	3	13	44	1 833 335
III	16	14	10	23	13	7	83	3 458 336
IV	6	12	2	10	6	12	48	2 000 002
V	12	7	2	7	9	13	50	2 083 335
VI	8	9	10	9	3	8	47	1 958 335
VII	10	5	6	4	10	16	51	2 125 002
VIII	1	5	1	9	4	8	28	1 166 668
IX	5	1	8	5	10	4	33	1 375 001
X	2	16	7	5	7	19	56	2 333 335

Tabel 3.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture by 25°

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	41	28	50	51	46	36	252	10 500 008
II	51	41	59	73	57	54	335	13 958 345
III	46	55	41	50	61	47	300	12 500 010
IV	58	69	63	54	60	57	361	15 041 679
V	67	59	85	59	67	62	399	16 625 013
VI	49	51	60	55	61	45	321	13 375 011
VII	74	75	68	79	84	69	449	18 708 348
VIII	62	59	64	51	66	53	355	14 791 679
IX	47	37	47	28	58	58	275	11 458 343
X	44	52	42	60	57	56	311	12 958 344

Tabel 4.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture by 25°

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	21	33	17	19	21	17	128	5 333 338
II	18	33	13	23	31	17	135	5 625 005
III	24	24	19	24	17	34	142	5 916 671
IV	22	20	21	34	17	32	146	6 083 338
V	28	29	25	20	27	31	160	6 666 672
VI	32	28	32	31	33	30	186	7 750 006
VII	40	32	26	35	36	28	197	8 208 340
VIII	26	16	17	14	28	32	133	5 541 671
IX	36	28	14	18	24	35	155	6 458 339
X	36	24	24	30	20	30	164	6 833 339

Tabel 5.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture by 35°

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	79	90	76	72	64	79	460	19 166 682
II	51	51	41	60	56	57	316	13 166 677
III	35	45	39	51	37	37	244	10 166 675
IV	49	46	47	36	48	48	274	11 416 676
V	67	72	76	62	79	60	416	17 333 347
VI	80	57	83	89	66	74	449	18 708 348
VII	36	62	46	42	44	66	296	12 333 343
VIII	78	97	63	65	62	85	450	18 750 015
IX	47	57	45	54	55	59	317	13 208 344
X	53	82	66	67	60	90	418	17 416 681

Tabel 6.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture by 35°

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	27	21	27	22	34	17	148	6 166 672
II	36	36	36	38	24	26	196	8 166 673
III	12	30	27	17	27	23	136	5 666 671
IV	35	13	28	19	25	24	144	6 000 005
V	42	23	38	13	35	22	173	7 208 339
VI	21	24	28	22	16	22	133	5 541 671
VII	22	27	25	25	30	35	164	6 833 339
VIII	21	23	28	16	20	30	138	5 750 005
IX	21	15	21	16	31	26	130	5 416 671
X	23	19	27	19	17	22	127	5 291 671

Tabel 7.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture by 40°

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	4	7	4	10	10	6	41	1 708 335
II	2	3	7	3	2	9	26	1 083 334
III	2	1	0	1	0	0	4	166 667
IV	0	2	1	2	0	2	7	291 667
V	5	0	3	2	0	2	12	500 000
VI	2	8	7	0	0	5	22	916 667
VII	16	7	11	3	4	12	53	2 208 335
VIII	1	0	0	2	3	1	7	291 667
IX	0	3	1	2	2	4	12	500 000
X	1	2	0	0	0	1	4	166 667

Tabel 8.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture onder onafgebroke witlig met intensiteit van 7 lux

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	4	5	2	6	7	6	30	1 250 001
II	3	6	5	1	6	5	26	1 083 334
III	2	5	3	2	6	5	23	958 334
IV	7	10	11	8	3	3	42	1 750 001
V	6	6	8	6	6	4	36	1 500 001
VI	4	4	7	7	2	6	30	1 250 001
VII	6	9	3	5	4	5	32	1 333 334
VIII	7	14	5	6	11	9	52	2 166 668
IX	4	7	1	2	1	1	16	666 667
X	0	4	4	4	4	4	20	833 334

Tabel 9.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture onder onafgebroke witlig met intensiteit van 7 lux

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	23	35	23	25	24	28	158	6 583 339
II	28	27	21	29	26	25	156	6 500 005
III	24	25	24	27	33	25	158	6 583 339
IV	23	25	18	19	24	21	130	5 416 671
V	20	18	25	16	15	21	115	4 791 671
VI	21	16	10	19	17	23	106	4 416 670
VII	17	21	23	33	13	32	139	5 791 671
VIII	23	22	12	18	33	13	121	5 041 671
IX	24	19	37	38	17	14	149	6 208 338
X	13	14	20	23	16	33	119	4 958 337

Tabel 10.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture onder onafgebroke UV-bestraling

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	18	27	28	19	18	14	124	5 166 671
II	32	30	28	23	26	29	168	7 000 006
III	13	11	11	11	20	18	84	3 500 003
IV	31	50	39	31	32	25	208	8 666 674
V	21	13	13	14	16	21	98	4 083 337
VI	19	22	5	16	20	21	103	4 291 670
VII	23	14	16	15	17	17	102	4 250 003
VIII	36	38	30	41	33	60	238	9 916 675
IX	15	16	14	19	25	14	103	4 291 670
X	19	37	26	29	26	25	162	6 750 005

Tabel 11.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture onder onafgebroke UV-bestraling

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	40	31	40	39	42	49	241	10 041 675
II	18	32	26	28	27	18	149	6 208 338
III	44	32	46	45	38	40	245	10 208 342
IV	27	60	45	32	33	21	218	9 083 341
V	27	39	34	46	46	51	243	10 125 008
VI	55	29	52	64	32	49	281	11 708 343
VII	35	29	60	48	41	33	246	10 250 008
VIII	27	33	37	46	32	36	211	8 791 674
IX	40	59	38	37	47	29	250	10 416 675
X	48	43	54	38	34	49	266	11 083 342

Tabel 12.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture onder onafgebroke rooilig

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	87	68	77	57	72	65	426	17 750 014
II	74	84	55	72	70	80	435	18 125 015
III	118	114	113	112	71	91	619	25 791 687
IV	55	69	67	63	66	57	377	15 708 346
V	20	31	29	29	19	24	152	6 333 338
VI	117	119	108	131	104	137	716	29 833 357
VII	24	36	17	28	19	22	146	6 083 338
VIII	14	13	23	19	16	26	111	4 625 004
IX	91	76	92	80	72	52	463	19 291 682
X	143	128	141	138	133	144	827	34 458 361

Tabel 13.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture onder onafgebroke rooilig

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	23	20	29	23	23	36	154	6 416 672
II	40	39	32	47	38	33	229	9 541 674
III	33	35	51	46	43	40	248	10 333 342
IV	45	35	51	49	47	61	288	12 000 010
V	35	18	18	20	13	22	126	5 250 004
VI	32	39	21	42	37	41	212	8 833 340
VII	72	56	63	54	56	40	341	14 208 345
VIII	54	46	30	45	36	43	254	10 583 342
IX	30	38	28	40	18	47	201	8 375 007
X	33	37	37	32	39	45	223	9 291 674

Tabel 14.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture, fotoperiodies belig

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	64	59	54	37	65	37	316	13 166 677
II	7	9	3	6	6	4	35	1 458 335
III	5	8	4	5	7	6	35	1 458 335
IV	7	6	4	4	10	7	38	1 583 335
V	6	11	7	17	5	13	59	2 458 335
VI	5	9	6	1	3	4	28	1 166 668
VII	2	3	1	1	8	4	19	791 667
VIII	8	12	2	6	6	7	41	1 708 335
IX	26	42	43	37	32	35	215	8 958 341
X	2	2	6	4	6	8	28	1 166 668

Tabel 15.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture, fotoperiodies belig

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	48	34	43	54	46	36	261	10 875 009
II	40	23	41	38	46	23	211	8 791 674
III	25	39	33	20	31	33	181	7 541 673
IV	25	38	28	31	43	32	197	8 208 340
V	26	36	23	28	34	30	177	7 375 006
VI	45	41	32	44	51	29	242	10 083 341
VII	22	26	39	35	39	31	192	8 000 006
VIII	37	34	31	29	36	29	196	8 166 673
IX	34	38	45	45	29	34	225	9 375 008
X	50	49	35	47	32	42	255	10 625 009

Tabel 16.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture gekweek op MMA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	5	8	10	7	7	7	44	1 833 335
II	5	6	2	4	3	9	29	1 208 334
III	6	12	2	1	12	13	46	1 916 668
IV	7	7	9	10	7	8	48	2 000 001
V	8	5	4	7	14	12	50	2 083 335
VI	10	8	7	12	5	4	46	1 916 668
VII	8	9	10	12	9	9	57	2 375 002
VIII	7	2	6	4	8	6	33	1 375 001
IX	10	9	16	11	12	5	63	2 625 002
X	6	12	13	12	8	12	63	2 625 002

Tabel 17.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture
gekleek op MMA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	17	7	4	9	2	8	47	1 958 335
II	5	1	11	3	4	2	26	1 083 334
III	4	14	2	10	6	5	41	1 708 335
IV	14	12	12	8	10	10	66	2 750 002
V	11	9	11	2	3	2	38	1 583 335
VI	7	9	4	12	3	8	43	1 791 668
VII	12	20	7	3	10	9	61	2 541 669
VIII	4	12	11	1	10	4	42	1 750 001
IX	7	4	4	8	4	7	34	1 416 668
X	11	6	11	9	12	4	53	2 208 335

Tabel 18.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture
gekleek op MA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	3	3	3	5	6	6	26	1 083 334
II	2	2	4	2	3	4	17	708 334
III	8	4	7	5	5	4	33	1 375 001
IV	3	9	3	7	7	2	31	1 291 668
V	6	6	7	7	2	4	32	1 333 334
VI	11	4	3	11	9	4	42	1 750 001
VII	2	3	3	7	3	0	18	750 001
VIII	7	6	4	11	6	3	37	1 541 668
IX	2	4	2	2	3	5	18	750 001
X	1	2	3	6	1	3	16	666 667

Tabel 19.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture gekweek op MA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	17	22	11	14	14	10	88	3 666 670
II	20	14	6	17	18	17	92	3 833 336
III	9	16	16	14	16	15	86	3 583 336
IV	30	19	16	23	27	27	142	5 916 671
V	22	11	28	16	17	31	125	5 208 338
VI	13	13	19	11	20	7	83	3 458 336
VII	16	14	10	10	10	10	70	2 916 669
VIII	24	19	17	13	10	10	93	3 875 003
IX	11	6	10	17	16	11	71	2 958 336
X	7	12	8	9	10	11	57	2 375 002

Tabel 20.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture gekweek op CA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	3	2	3	0	1	1	10	416 667
II	0	2	2	3	3	4	14	583 334
III	4	6	1	3	0	0	14	583 334
IV	1	1	1	8	2	2	15	625 001
V	1	2	2	6	4	7	22	916 667
VI	0	3	4	0	5	6	18	750 001
VII	1	2	0	0	0	4	7	291 667
VIII	2	3	5	2	2	4	18	750 001
IX	3	3	1	6	2	6	21	875 001
X	0	2	3	0	0	5	10	416 667

Tabel 21.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture gekweek op CA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	1	0	1	0	0	0	2	83 333
II	1	0	0	1	0	0	2	83 333
III	2	0	0	1	0	4	7	291 667
IV	2	1	1	5	2	1	12	500 000
V	1	0	0	3	0	0	4	166 667
VI	2	0	4	0	1	1	8	333 334
VII	2	0	0	0	0	0	2	83 333
VIII	3	0	1	0	2	0	6	250 000
IX	2	1	1	0	0	0	4	166 667
X	0	1	1	1	3	1	7	291 667

Tabel 22.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture gekweek op EDA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	0	0	1	2	3	0	6	250 000
II	3	0	2	7	2	2	16	666 667
III	1	1	0	1	0	0	3	125 000
IV	2	1	0	0	1	0	4	166 667
V	0	1	1	0	0	0	2	83 333
VI	2	3	0	2	2	2	11	458 334
VII	0	1	0	0	2	2	5	208 334
VIII	0	1	0	0	2	2	5	208 334
IX	0	1	0	0	0	0	1	41 667
X	0	0	0	0	1	0	1	41 667

Tabel 23.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture gekweek op EDA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	61	50	41	43	38	41	274	11 416 676
II	50	52	54	71	54	46	327	13 625 011
III	35	50	49	37	33	51	255	10 625 009
IV	54	19	32	57	33	33	228	9 500 008
V	47	43	52	41	37	52	272	11 333 342
VI	38	45	43	48	38	45	257	10 708 342
VII	62	48	48	55	39	52	304	12 666 677
VIII	33	67	57	56	64	48	325	13 541 678
IX	41	51	50	41	50	32	265	11 041 676
X	49	42	43	53	52	51	290	12 083 343

Tabel 24.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma rostratum*-kulture gekweek op MDA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per 1cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	0	0	0	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	3	0	1	4	166 667
V	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	0	0	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0	0	0
VIII	0	0	0	0	0	0	0	0
IX	0	0	0	1	0	0	1	41 667
X	1	2	1	0	1	2	7	291 667

Tabel 25.

Spoortellings en spoorgetalle vir *Botryoderma lateritium*-kulture gekweek op MDA

Replikate	Alikwottellings						Totale	Gemiddelde aantal spore per cm ²
	1	2	3	4	5	6		
I	19	28	18	10	17	16	108	4 500 004
II	25	22	24	26	24	13	134	5 583 338
III	8	13	7	7	9	9	53	2 208 335
IV	22	29	26	25	20	14	136	5 666 671
V	18	24	29	30	20	17	138	5 750 005
VI	13	18	20	22	24	25	122	5 083 337
VII	10	31	18	17	17	23	116	4 833 337
VIII	16	11	12	14	7	6	66	2 750 002
IX	15	21	15	7	21	13	92	3 833 336
X	10	19	9	25	10	16	89	3 708 336