

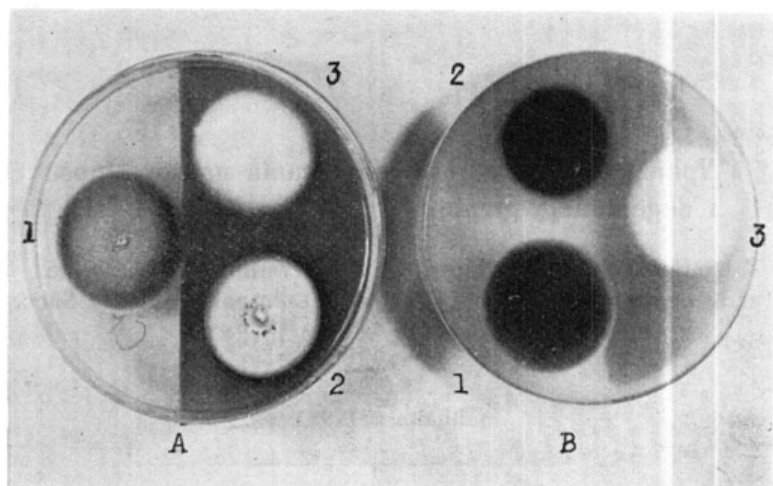
Wpływ warunków przechowywania na żywotność i degenerację grzybni *Cercospora beticola* Sacc.

L'influence des conditions de conservation sur la vitalité
et la dégénération du mycélium de *Cercospora beticola* Sacc.

BARBARA OSIŃSKA

Długotrwałe utrzymywanie grzybów w kolekcjach obok niebezpieczeństwa zanieczyszczenia ich innymi mikroorganizmami prowadzi nieuchronnie do większych lub mniejszych zmian morfologicznych i fizjologicznych (Barmenkow 1959; Buell i Weston 1947; Coons i Larmer 1929). W zależności od rodzaju grzyba i celu ciągłego utrzymywania go pewne cechy stają się szczególnie ważne; zachowanie tych cech w stanie nie zmienionym staje się przedmiotem zabiegów zmierzających do maksymalnego ograniczenia pasażowania na świeże podłoża i tym samym do zachowania grzyba w stanie względnie nie zmienionym. W przypadku przechowywania szczepów patogenicznych, o ile mają one służyć do prac doświadczalnych, badań porównawczych, testowania czy innych celów, ważne jest utrzymanie ich w stanie nie zmienionej wirulencji.

Jednym z grzybów patogenicznych odznaczających się dużą zmiennością w hodowli *in vitro* jest *Cercospora beticola* Sacc. Kultura tego grzyba utrzymywana przez dłuższy czas na skosach agarowych traci swoje charakterystyczne, szarozielone zabarwienie (rewers zielonoczarny); po pewnym czasie przechowywania, w zależności od liczby pasażów, otrzymuje się grzybnię białoróżową, niekiedy kremową, bez ciemnego, melaninowego barwnika nawet w części hodowli rosnącej w podłożu (fot. 1). Larmer i Coons (1929) opisali to zjawisko po raz pierwszy i stwierdzili również bardzo słabą wirulencję bezpigmentowej, białej grzybni. Według Rykera (1942) powstawanie i większa aktywność biologiczna tego białego saltanta prowadzi do całkowitego wyeliminowania kultury oryginalnej. Canova (1957) w przerastaniu kultury *C. beticola* grzybnią bezmelaninową widzi przyczynę utraty zdolności do zarodnikowania tego patogena *in vitro*. Powstawanie bezbarwnych sal-



Fot. 1. Grzybnia *C. beticola* hodowana na agarze dekstrozowo-ziemniaczanym
 A — grzybnia powietrzna; B — rewers; 1 — grzybnia nie zmieniona, druga generacja po wyizolowaniu z tkanki rośliny żywicielskiej; 2 — grzybnia po 7 pasażach — wyraźnie jaśniejsza;
 3 — grzybnia całkowicie zdegenerowana, bezpigmentowa

Mycélium de *C. beticola* cultivé sur agar de dextrose et de pomme de terre

A — mycélium aérien; B — revers; 1 — mycélium invariable; deuxième génération après isolement du tissu de la plante-hôte; 2 — mycélium après 7 passages, nettement plus clair;
 3 — mycélium entièrement dégénéré, sans pigment

tantów zostało zaobserwowane również w hodowli cerkospory w kolekcji mikrokultur Ogrodu Botanicznego IHAR w Bydgoszczy. Celem przeprowadzenia niżej opisanych doświadczeń były próby hamowania procesu degeneracji przez zastosowanie różnych sposobów ograniczenia metabolizmu tego grzyba.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie założono w 61 r. Użyto kulturę *C. beticola* z izolacji własnej z rośliny żywicielskiej (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* Alef.). Grzybnię do doświadczeń wyhodowano na agarze dekstrozowo-ziemniaczanym w buteleczkach o pojemności 10 ml zawierających warstwę pożywki grubości 1 cm. Inkubowano przez okres 7 dni w temp. 24°C.

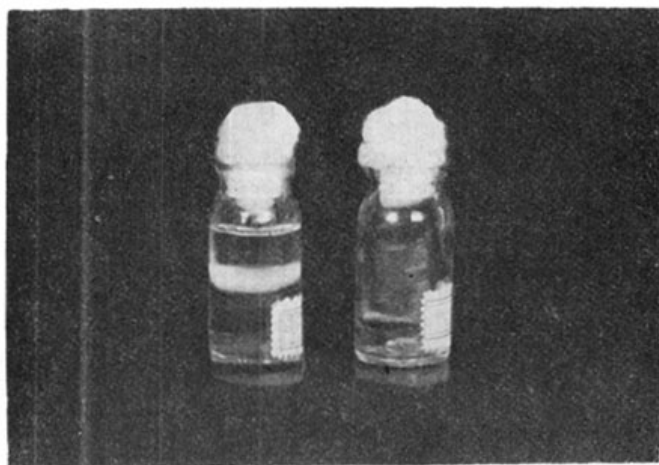
W celu ograniczenia metabolizmu grzybni zastosowano metody powszechnie używane w kolekcjach mikroorganizmów, jak: przechowywanie pod warstwą oleju mineralnego, przechowywanie w glebie, w obniżonej temperaturze oraz przez okresowe przeszczepianie na świeże skosy agarowe; dla porównania zbadano żywotność kultur przechowywanych

na pożywce agarowej, lecz nie przeszczepianych. Ze względu na charakter kultury (grzybnia nie zarodnikująca) nie zastosowano liofilizacji.

Przechowywanie pod warstwą oleju mineralnego zastosowano zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami (Buell i Weston 1947; Fennel i Raper 1950; Pumpianskaja 1964); zastosowanie buteleczek miało tę zaletę, że warstwa przykrywającego oleju była równa na całej powierzchni rosnącej grzybni w przeciwieństwie do grzybni utrzymywanej pod olejem rosnącej na skosach agarowych. Rosnącą kulturę zalewano sterylizowanym w autoklawie olejem parafinowym na grubość ca 2 cm ponad górny poziom grzybni.

Przechowywanie w glebie jest metodą stosowaną z różnymi modyfikacjami, szczególnie w laboratoriach przy obiektach przemysłowych (Fennel i Raper 1950) do przechowywania kultur zarodnikujących. Używa się piasku, torfu, ziemi ogrodniczej i glinki. W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowano mieszaninę piasku z talkiem w stosunku 2:1. Talk miał na celu zmniejszenie przewodności piasku. Rosnącą kulturę przykrywano tą mieszaniną na grubość ca 2 cm.

Przechowywanie w obniżonej temperaturze jest powszechnie stosowane w laboratoriach, często w połączeniu z przechowywaniem pod olejem. W opisanym doświadczeniu kultury *C. beticola* umieszczono w chłodni w temperaturze $4^{\circ}\text{C} \pm 1$.



Fot. 2. Grzybnia *C. beticola* po 5 latach przechowywania

A — pod warstwą oleju mineralnego; widoczna grzybnia bezmelaninowa; B — grzybnia przechowywana w obniżonej temperaturze; widoczne całkowite wyschnięcie podłoża

Mycélium de *C. beticola* après 5 ans de conservation

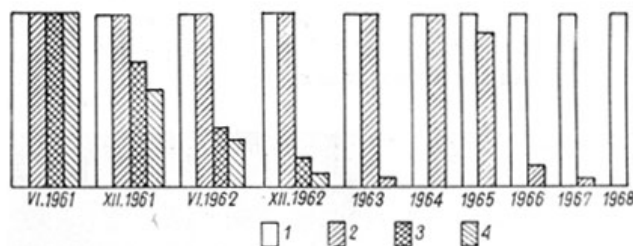
A — mycélium conservé sous une couche d'huile minérale; on voit le mycélium sans mélanine; B — mycélium conservé dans une température abaissée; on voit le substrat complètement séché

Kultury przechowywane przez okresowe przeszczepianie utrzymywane były przez okres trwania doświadczenia w temperaturze 14—16°C i pasażowane na świeżą pożywkę co 6 miesięcy. W takich samych warunkach utrzymywano grzybnię kontrolną, to jest nie przeszczepianą i nie ograniczaną we wzroście.

Dla każdej metody przechowywania (z wyjątkiem okresowego przeszczepiania) przygotowano 100 buteleczek.

Sposób oceny żywotności i degeneracji

Żywotność kultur grzybów nie wytwarzających organów rozmnażania określano w dotychczasowych pracach na podstawie wzrostu (lub braku objawów wzrostu) grzybni po przeszczepieniu na świeże podłoże, przy czym brak danych dotyczących liczby posiewów kontrolnych pozwala przypuszczać, że były to posiewy jednorazowe lub nieliczne. W opisanym doświadczeniu oceniano żywotność grzybni pochodzącej ze 100 posiewów niewielkich jej fragmentów branych przy każdej kontroli z 10 butele-



Wykres 1. Żywotność grzybni *C. beticola* przechowywanej w różnych warunkach
1 — pod warstwą oleju mineralnego; 2 — w obniżonej temperaturze; 3 — pod warstwą płasku z talkiem; 4 — kontrola

Vitalité du mycélium de *C. beticola* conservé dans des conditions différentes

1 — sous une couche d'huile minérale; 2 — dans une température abaissée; 3 — sous une couche de sable avec du talc; 4 — contrôle

czek. Procent wyrosłych kolonii był miarą żywotności kultury grzyba. Kontrolę przeprowadzano w dwu pierwszych latach co 6, a w następnych co 12 miesięcy.

Stopień degeneracji określano na podstawie liczby kolonii bezmelaninowych, które obliczano stosując posiewy metodą płytkową porównywalnych ilości homogenatów grzybni przechowywanej w różnych warunkach. Ocenę degeneracji przeprowadzono trzykrotnie: po 4 latach przechowywania uwzględniając grzybnię przechowywaną: a) w obniżonej temperaturze, b) pod olejem i c) przez okresowe przeszczepianie, oraz po 6 i 7 $\frac{1}{2}$ latach dla dwu ostatnich wariantów doświadczenia. Kontrolę sta-

nowiła bezpośrednio wyizolowana z rośliny żywicielskiej grzybnia patogena (po 1 pasażu).

WYNIKI

Stan kultur *C. beticola* w zależności od warunków przechowywania przedstawiał się różnie (wykres). Po upływie roku żywotność kultury przechowywanej pod mieszaniną piasku z talkiem spadła poniżej 80%, co wskazuje na nieprzydatność tej metody do przechowywania grzybni cercospory. Dalsze oceny żywotności grzybni w tym wariantcie doświadczenia wskazują na niewielkie tylko (około 10%) różnice w stosunku do żywotności grzybni kontrolnej. Zadowolająca żywotność grzybni przechowywanej w obniżonej temperaturze (95%) i pod warstwą oleju mi-

Tabela 1 — Tableau 1

Degeneracja grzybni *C. beticola* przechowywanej w różnych warunkach
Dégénération du mycélium de *C. beticola* conservé dans les conditions différentes

Metoda przechowywania Méthode de la conservation	Procent kolonii zdegenerowanych w latach: Pour-cent de colonies dégénérées en:		
	1964	1966	1968
1. Pod warstwą oleju mineralnego Sous une couche d'huile minérale	19	48	92
2. W obniżonej temperaturze Dans une température abaissée	0	nie badano sans recherches	
3. Okresowe przeszczepianie Transplantation périodique	24	28	25
4. Kontrola Contrôle	0	0	0

neralnego (100%) utrzymywała się przez okres 4 lat; kontrola w roku następnym wykazała bardzo znaczny spadek żywotności kultury przechowywanej w obniżonej temperaturze. Niezmienne, 100% wyniki uzyskiwano dla grzybni utrzymywanej pod olejem przez cały czas trwania doświadczenia (to jest przez 90 miesięcy).

Grzybnia przechowywana w różnych warunkach degenerowała w różnym stopniu; w grzybni przechowywanej w chłodni nie było kolonii bezmelaninowych, a więc nie uległa ona żadnym uchwytnym zmianom. W tym samym czasie stwierdzono występowanie kolonii pozbawionych melanin w grzybni przechowywanej pod olejem (ca 20%) i przez okresowe przeszczepianie (ca 25%). Końcowa kontrola wykazała, że grzybnia przechowywana przez 8 lat pod warstwą oleju mineralnego uległa całkowitej degeneracji (100% kolonii bezmelaninowych). Liczba kolonii

bezbarwnych w posiewie homogenatu grzybni utrzymywanej przez okresowe przeszczepianie utrzymywała się przez cały czas trwania doświadczenia mniej więcej na tym samym poziomie (ca 25%). Kultury kontrolne nie wykazywały obecności kolonii zdegenerowanych.

WNIOSKI

Przechowywanie grzybni *C. beticola* pod warstwą oleju mineralnego jest niewskazane ze względu na występowanie bezbarwnych saltantów, których ilość po kilku latach przechowywania dochodzi do 100%.

Przechowywanie w chłodni w temperaturze ca 4°C przedłużyło żywotność grzybni cerkospory do 4 lat, przy czym w warunkach przeprowadzonych doświadczeń nie stwierdzono procesu degeneracji. Zadowalająca żywotność kultury kontrolnej (bez przeszczepiania) utrzymuje się przez 1 rok.

Utrzymywanie grzybni pod warstwą piasku z talkiem w opisanym doświadczeniu nie dało wyników pozytywnych.

DYSKUSJA

Przedstawione wyżej sposoby przechowywania stosowane są w kolekcjach mikroorganizmów, przy czym na pierwsze miejsce wysuwa się przechowywanie pod olejem. Łatwość zastosowania tej metody, podkreślana przez Buella i Westona (1947), przyczyniła się do szerokiego jej stosowania. Obok znacznego przedłużania żywotności (Rowell i Williams 1966 — pozytywne wyniki po 11 latach przechowywania) zaletą tej metody jest ochrona kultur przed molikiem (Wernham 1946) oraz zamieranie molików w kulturach zanieczyszczonych tym roztoczem po dwumiesięcznym okresie przechowywania pod olejem. Szereg autorów podkreśla fakt wzrostu i rozmnażania kultur utrzymywanych w ten sposób, lecz brak jest doniesień o objawach degeneracji. W wyżej opisanych doświadczeniach nastąpiła bardzo wyraźna i daleko idąca zmiana zabarwienia grzybni przechowywanej tą metodą; trudno powiedzieć, czy badana kultura stanowi wyjątek, jednak można przypuszczać, że podobnie będą się zachowywały grzyby tych gatunków, które w hodowli na pożywkach agarowych wykazują skłonność do tworzenia bezpigmentowych saltantów. Niewątpliwie odgrywa tu również pewną rolę grubość warstwy ochronnej oleju; przy zastosowanej metodzie kultura miała możliwość wzrostu, lecz wzrost ten był pomnażaniem komórek zdegenerowanych (fot. 2). Z tych przyczyn, powszechnie stosowana i naprawdę prosta metoda przechowywania pod olejem nie może

być polecana do przechowywania grzybni *C. beticola*. W przeprowadzonym doświadczeniu najlepsze wyniki uzyskano przechowując grzybnię w obniżonej temperaturze.

Należy tu również zaznaczyć, że stałe pojawianie się białego saltanta, które w skrajnych wypadkach prowadzi do wzrostu bezmelaninowej i niewirulentnej grzybni cercospory, jest prawdopodobnie różne w zależności od cech indywidualnych kultury; przeprowadzone badania laboratoryjne pozwalają stwierdzić, że odgrywają tu również rolę takie czynniki, jak rodzaj podłoża, metoda posiewu oraz sposób brania inokulum do posiewów z rosnącej kolonii.

Doc. dr Irenie Michalskiej składam wyrazy podziękowania za wskazówki metodyczne przy zakładaniu doświadczeń.

Zakład Buraka i Innych Roślin Korzeniowych
Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Bydgoszcz, pl. Weysenhoffa 11

RÉSUMÉ

Le mycélium de *Cercospora beticola* était conservé dans des conditions différentes de conservation; dans une température de 40°C environ, une vitalité suffisante s'était entretenue pendant la durée de quatre ans. Le mycélium conservé sous une couche d'huile minérale avait démontré une vitalité invariable de 100% pendant huit ans, mais il subissait une dégénération nette se manifestant dans la croissance des colonies blanches, sans mélanine. Leur nombre se monta à 100% après huit ans. L'absence d'une dégénération du mycélium conservé dans une température abaissée, met cette méthode de conservation au premier rang par rapport à l'espèce étudiée.

LITERATURE

- Barmenkow A. S., 1959, O dlitelnom chranienii mikrokultur, Mikrobiologija 28:444—446.
- Buell C. B., Weston H. W., 1947, Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungus cultures, Amer. J. Bot. 34:555—561.
- * Canova A., 1958, Formazioni di conidi di *Cercospora beticola* Sacc. in cultura artificiale, Ann. Sper. Agr. N. S. 11, (wg Rev. Appl. Myc., 1958, 37:386).
- Coons G. H., Larmer F. G., 1929, The physiology and variation of *Cercospora beticola* Sacc. in pure culture, Papers Mich. Acad. Sci. 11:75—104.
- Fennel D. J., Raper K. B., Flickinger M. H., 1950, Further investigation on preservation of mold cultures, Mycol. 42:135—147.
- Pumpianskaja L. W., 1964, Chranienie mikroorganizmow pod mineralnym masłom, Mikrobiologija 33:1065—1070.
- Rowel J. B., Williams W. F., Kernkamp M. F., Survival for 11 years of smut cultures under mineral oil, Plant Dis. Report 50:300.
- Ryker T. C., 1942, Loss of sporulation in *Cercospora*, Phytopath. 32:16.
- Wernham C. C., 1946, Mineral oil as a fungus culture preservative, Mycologia 38:691—692.