



## Metoda izolacji jednozarodnikowych kultur grzybów z rodzaju *Zoophthora*

Irena Majchrowicz

Katedra Entomologii Stosowanej  
Akademia Rolnicza, Szczecin

### The method of isolation fungal cultures from a single spores of *Zoophthora* species

#### Summary

*Zoophthora neoaphidis* (Remaud. et Henneb.) Bałazy is the most important and the most frequently causing epizootics of aphids fungal species among all species of entomopathogenic fungi from *Entomophthorales* appearing in North-Western Poland.

As a result of the experiments performed, it was possible to describe a method for obtaining the isolates from single spore of *Z. neoaphidis*. This method may be of great importance for further studies of the biology of *Z. neoaphidis* and other similar species aimed at their applications in the production of bio-insecticides.

#### Key words:

*Zoophthora neoaphidis*, *Acyrtosiphon pisum*.

Na podstawie dotychczasowych badań prowadzonych zarówno przez nas jak i inne ośrodki naukowe (1,2), dotyczących występowania mykoflory mszyc bytujących w agrocenozach (5,7), stwierdzono, że głównym patogenem powodującym epizootycę mszyc, jest grzyb *Zoophthora neoaphidis* (Remaud. et Henneb.) Bałazy.

W obrębie populacji poszczególnych gatunków mikroorganizmów, w tym także grzybów owadobójczych, istnieje zróżnicowanie pod względem wielu cech, m.in. uzdolnień pasożytniczych. Badania często prowadzone są nad określonymi mikroorganizmami będącymi czystymi kulturami, nie zawsze jednak wy-

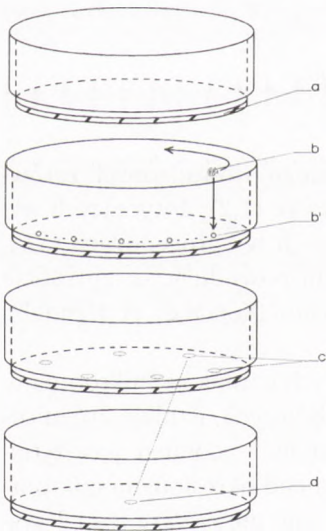
#### Adres do korespondencji

Irena Majchrowicz,  
Katedra Entomologii,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Słowackiego 17,  
71-454 Szczecin.

izolowanymi z pojedynczego zarodnika. Podczas poszukiwania patogennych w stosunku do mszyc izolatów grzybowych stwierdziliśmy, że grzyb *Z. neoaphidis* wyizolowany za pomocą najczęściej stosowanej metody (4), wykazuje duże zróżnicowanie aktywności lipolitycznej (6). W mikologicznej technice laboratoryjnej opisanych jest kilka metod pozyskiwania czystych kultur grzybowych (3,4), do tej pory jednak brak wśród nich opisu izolacji kultur z jednego zarodnika grzybów należących do rodzaju *Zoophthora*. W celu uzyskania jednozarodnikowych kultur grzybów należących do rzędu *Moniliales*, najczęściej stosuje się zmiksowaną i wielokrotnie rozcieńczoną zawiesinę zarodników określonego gatunku grzyba do inokulacji podłoża agarowego, a następnie pojedyncze zarodniki przenoszone są na odpowiednio dobrane podłoża. W przypadku grzyba *Z. neoaphidis* metoda ta nie może być stosowana, gdyż zarodniki konidialne tego mikroorganizmu posiadają cienkie ściany o lepkiej powierzchni i są bardzo delikatne. Podczas sporządzania zawiesiny wodnej łatwo ulegają destrukcji i nie kiełkują na pożywce agarowej. Z tego powodu wynikła konieczność poszukiwania metody, która umożliwiłaby uzyskiwanie kultur z jednego zarodnika także w przypadku grzybów należących do rodzaju *Zoophthora*.

Materiał do badań stanowił grzyb *Z. neoaphidis* wyizolowany z mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum*, Harris) na pożywce Sabouraud z dodatkiem żółtka jaja kurzego, opisaną przez Müller-Köglera (8), a w ostatnich latach nieco zmodyfikowanej i szeroko stosowanej w laboratoriach zajmujących się badaniem patologii owadów (4).

W celu uzyskania jednozarodnikowych kultur tego mikroorganizmu, przeprowadzano trzydniową hodowlę czystej kultury *Z. neoaphidis*, przystosowanej do rozwoju na pożywce Sabouraud, w temperaturze 15°C na podłożu stałym. Następnie przenoszono część młodej kolonii grzybowej (z jak najmniejszą ilością pożywki agarowej i w sposób sterylny) na górną część jałowej szalki Petriego (rys. 1b). Po upływie 24

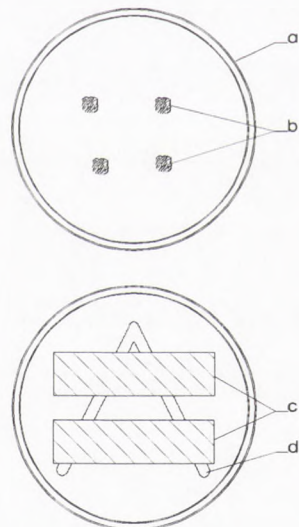


Rys. 1. Schemat izolacji 1-zarodnikowych kultur *Zoophthora* sp.

a – szalka Petriego z pożywką Sabouraud; b – grzybnia *Zoophthora* sp. na górnej części szalki Petriego; b' – zarodnik konidialny *Zoophthora* sp.; c – kilka małych, pojedynczych kolonii *Zoophthora* sp.; d – jedna kolonia *Zoophthora* sp.

godzin (a czasem nieco później), kiedy rozpoczynało się wytwarzanie pierwszych zarodników, górną część szalki wraz z grzybnią przenoszono nad pożywkę Sabouraud, znajdującą się w innej szalce Petriego o tej samej wielkości, i powoli jeden raz przekręcano górną część szalki, lekko „strząsając” zarodniki, tak aby pojedyncze konidia spadały na powierzchnie pożywki znajdującej się w dolnej szalce (rys. 1b'). Czynność tę można powtórzyć kilka razy, zmieniając dolną część szalki z pożywką. Następnie całą powierzchnię pożywki obserwowano pod mikroskopem i pojedyncze zarodniki z fragmentami pożywki, przenoszono do osobnych próbek (lub szalek Petriego) z wymienioną pożywką. Kilka zarodników leżących w pewnej odległości od siebie pozostawiano na 2-3 dni, a następnie przenoszono pojedyncze kolonie do osobnych próbek z pożywką (rys. 1c-d). Dalszą hodowlę kultur jednozarodnikowych *Z. neoaphidis* prowadzono w temperaturze 15°C.

Izolacje jednozarodnikowych kultur *Z. neoaphidis* można również wykonać w nieco inny sposób, przedstawiony schematycznie na rysunku 2. W dolnej części szalki (o średnicy 10 cm), na szklanej bagietce, umieszczono dwa szkiełka podstawkowe, po czym wyjałowiono w autoklawie, pokryto szkiełka cienką warstwą pożywki Sabouraud i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Do innej jałowej szalki o tej samej średnicy, na jej górną część, prostopadłe do szkiełek podstawkowych, przeniesiono (w sposób sterylny) po 2 fragmenty młodej kolonii grzybowej *Z. neoaphidis* (rys. 2b). Po rozpoczęciu wytwarzania przez grzyb pierwszych zarodników, górną część szalki wraz z grzybnią przenoszono nad pokryte pożywką szkiełka podstawkowe, znajdujące się w innej szalce (rys. 2c), i po pewnym czasie (około 20-40 min) oglądano pod mikroskopem powierzchnie pożywki na szkiełkach podstawkowych. Następnie wybierano pojedyncze zarodniki i przenoszono do osobnych szalek Petriego lub próbek z pożywką. Dodać należy, że hodowlę jednozarodni-



Rys. 2. Schemat izolacji jednozarodnikowych kultur *Zoophthora* sp. z grzybni na szkiełka podstawkowe.

a – szalka Petriego widziana z góry; b – grzybnia *Zoophthora* sp. umieszczona na wewnętrznej stronie górnej szalki; c – szkiełka podstawkowe pokryte pożywką Sabouraud; d – bagietka szklana umieszczona na bibule w dolnej części szalki.

kowych kultur w początkowym etapie dobrze jest prowadzić na pożywce wzbogaconej, to znaczy Sabouraud z dodatkiem żółtka jaja kurzego (8). Izolaty grzyba *Z. neoaphidis* uzyskane z jednego zarodnika charakteryzowały się jednakową, stabilną aktywnością lipolityczną, co stwierdzono w testach laboratoryjnych na pożywce Sabouraud z dodatkiem tributyriny.

Sądzę, że tylko izolaty jednazarodnikowe grzybów (zarówno należących do *Entomophthorales* jak i *Moniliales*) powinny być używane do badania poszczególnych gatunków, a w szczególności do badania ich właściwości enzymatycznych i patogenicznych, które w końcowym efekcie mogą pozwolić na wyselekcjonowanie odpowiednich kultur do produkcji biopreparatów.

### Literatura

1. Bałazy S., Miętkiewski R., Majchrowicz I., (1990), *Z. Prob. Post. Nauk Roln.*, 392, 35-56.
2. Bałazy S., (1993), *Folara of Poland, Fungi (Mycota), Entomophthorales*, Inst. Botaniki im. Szafera, PAN, Kraków.
3. Dhingra O. D., Sinclair J. B., (1985), *Basic Plant Pathology Methods*, Boca Raton, Fla., CRC Press.
4. Lacey L., (1997), *Manual of Techniques in Insect Pathology*, San Diego [etc.] Acad. Press.
5. Majchrowicz I., (1992), *Studies on mycoflora in population of Aphis fabae Scop. Zwalczenie biologiczne szkodników roślin w programach integrowanych*, Mater. z Konf. Nauk. PAN, V Wydz., Skierniewice, 40-49.
6. Majchrowicz I., (1995), *Lipolytic activity of seven isolates of entomopathogenic fungi*, Proceedings of the conference: Actual and potential use of biological pest control, Polish Academy of Science 5<sup>th</sup> Division, 100-104.
7. Majchrowicz I., (1998), *Entomopathogenic fungi of aphids infesting wild plants in Szczecin region*, in: *Aphids and other homopterous insects 6*, Polish Academy of Science 5<sup>th</sup> Division, 85-88.
8. Müller-Kögler E., (1959), *Entomophaga*, 3, 261-275.