

Badania poziomu chityny w grzybni wegetatywnej wybranych grzybów mikoryzowych

M. TRZCIŃSKA, R. PACHLEWSKI

Zakład Gleboznawstwa i Nawożenia, Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa-Sękocin

Trzcńska M., Pachlewski R.: (Department of Soil Science and Fertilization, Forest Research Institute, Warszawa-Sękocin, Poland). *Studies on chitin level in vegetative mycelium of some mycorrhizal fungi*. Acta Mycol. XXII(1): 89–94, 1986.

Chitin content was investigated in vegetative mycelium of the *Basidiomycetes* and *Ascomycetes* mycorrhizal fungi grown in vitro. It was demonstrated that the content varies between species and even between strains of a given species, and it changes with the age of mycelium. The chitin content increased with age in the mycelium of fungi of *Basidiomycetes* while it decreased in fungi of *Ascomycetes*.

Essential effect was found of nitrogen source on chitin content in the mycelium. Less chitin was determined in the mycelium grown on nitrate than in that grown on urea or ammonia salts.

WSTĘP

Chityna obok glukanów jest strukturalnym składnikiem ścian komórkowych grzybów. Analiza na zawartość chityny, a ściślej produktu hydrolizy tego związku — glukozaaminy, została zastosowana do oznaczania biomasy grzybów w różnych podłożach. W ten sposób określano na przykład stopień infekcji tkanki roślinnej przez grzyby patogeniczne (Ride i in. 1971; Ride i in. 1972), biomasę grzybów w rozkładającym się drewnie (Gurusiddaiah i in. 1978; Swift 1973) czy w zainfekowanych produktach spożywczych (Donald i in. 1977). Test na zawartość chityny w tkance roślinnej wypróbowano także do oznaczania stopnia infekcji mikoryzowych korzeni (Hepper 1977; Plassard 1982, 1983; Whipps i in. 1982). Jak wykazały doświadczenia jest to metoda czuła i stosunkowo prosta, wymagająca jednak znajomości zawartości chityny w strzępkach różnych grzybów oraz zmian tego parametru zależnie od warunków środowiska.

Podjęte prace miały na celu zbadanie ilości chityny w grzybni wegetatywnej wybranych mikoryzowych podstawczaków i workowców hodowanych w czystych kulturach in vitro. W badaniach uwzględniono również wpływ wieku hodowli i źródła azotu w pożywce na zawartość chityny w grzybni.

MATERIAŁ I METODY

Wszystkie użyte w eksperymentach szczepy grzybów mikoryzowych pochodziły z kolekcji Pracowni Biologii Gleby IBL w Sękocinie. Były to dwa szczepy *Suillus bovinus* (L. : Fr.) O. Kuntze — nr 1941 i 5382, dwa szczepy *Suillus luteus* (L. : Fr.) S. F. Gray — nr 1155 i 5383, trzy szczepy *Cenococcum graniforme* (Sow.) Ferde. Winge — nr 3543, 5259 i 4947; oraz szczepy *Amanita muscaria* (L. : Fr.) Hooker — nr 1/182; *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch. nr 5335; dodatkowo poddano analizie grzyb nie wykazujący własności mikoryzowych *Colybia butyracea* (Bull. : Fr.) Quéf. — nr 1841 oraz grzyb ektendomykoryzowy Mrg X — szczep I i II.

Grzyby hodowano na pożywce podstawowej (Pp) zawierającej w jednym litrze wody 20 g glukozy, 2,5 g ekstraktu maltozowego, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 ml 1% roztworu cytrynianu żelazowego, 0,5 ml 0,2% roztworu ZnSO_4 , 50 μg tiaminy i 15 g agaru. pH pożywki wynosiło 5,6, tylko dla szczepów MrgX stosowano pożywkę o pH 6,5. Ponadto hodowle dwóch szczepów *C. graniforme* nr 5259, 4947 oraz *C. butyracea* były prowadzone na pożywce płynnej. W tych przypadkach na powierzchni pożywki umieszczano siatkę plastikową w celu utrzymania inokulum na powierzchni pożywki. Inkubację prowadzono w termostacie w temperaturze 26°C. Analizie poddawano grzybnię powietrzną. Po 2, 4 i 6 tygodniach grzybnię zbierano na sitku plastikowym, przemywano wodą destylowaną, suszono przez noc w 80°C, a następnie ważono. Każdą kombinację wykonywano w 8-12 powtórzeniach.

Do badań nad wpływem źródła azotu na zawartość chityny w grzybni prowadzono hodowlę na zmodyfikowanej pożywce płynnej Pp, do której nie dodawano ekstraktu maltozowego, a winian amonu zastąpiono odpowiednio przez: 1 — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 — $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$; 3 — $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ lub KNO_3 (dla *C. graniforme*). Dawka tych soli była tak wyliczona, aby ilość azotu w pożywce była taka sama jak w cytowanej wyżej pożywce podstawowej. Każdy wariant był wykonywany w 5-10 powtórzeniach. Inkubację prowadzono przez 6 tygodni w 26°C. Przygotowanie grzybni do dalszych analiz wykonywano jak w poprzednim doświadczeniu, przy czym z każdego powtórzenia zbierano całą grzybnię — powierzchnią i substratową.

Wysuszoną grzybnię hydrolizowano przez 50 godz. w 3 ml 10 N HCl w temperaturze pokojowej, a następnie dodawano 3 ml H_2O , po czym próbki umieszczano na 9 godz. we wrzącej łaźni wodnej. Hydrolizaty przenoszono do parownic i odparowywano do sucha w strumieniu gorącego powietrza w celu usunięcia nadmiaru kwasu. Następnie próbki rozpuszczano w wodzie redestylowanej i przesączano ilościowo przez sączek z bibuły. Próbki oczyszczano sącząc przez kolumnę wypełnioną elektrolitem. Glukozoaminę eluowano z kolumny 1 N HCl. Z przesączów usuwano HCl odparowując strumieniem gorącego powietrza. Pozostały osad rozpuszczano w znanej objętości wody destylowanej i w otrzymanych roztworach oznaczano kolorometrycznie glukozoaminę metodą Elsona Morgana (Stevenson 1957). Jako standardu używano glukozoaminy HCl.

WYNIKI

Otrzymane wyniki (tab. 1) wykazują, że zawartość chityny w grzybni jest istotnie zróżnicowana, nie tylko u różnych gatunków, ale i wśród szczepów tego samego gatunku. Jest to zgodne z wynikami innych badań cytowanych w literaturze. Z przedstawionej przez Blumenthala (1957) analizy 25 szczepów wynika, że różnice w zawartości chityny u różnych grzybów mogą być nawet dziesięciokrotne. Nie mniejsze wahania udziału chityny w suchej masie różnych gatunków grzybów wykazał Sharma i in. (1977) w badaniach nad 9 grzybami izolowanymi z liści pływających w zbiorniku wodnym. W cytowanej już pracy Blumenthala (1957) wykazano też znaczne, bo niemal dwukrotne, różnice zawartości chityny u różnych szczepów *Aspergillus flavus* i *A. niger*.

Tabela 1 — Table 1

Zawartość chityny w grzybni wyrażona w μg glukozoaminy na mg suchej masy po różnym czasie hodowli

Chitin content in mycelium (expressed in μg of glucosamine per mg dry mass) of different age

Czas hodowli Age of culture	μg glukozoaminy/mg grzybni μg of glucosamine/mg of mycelium		
	2 tygodnie 2 weeks	4 tygodnie 4 weeks	6 tygodni 6 weeks
	Szczep Strain		
<i>Suillus bovinus</i> 1941	30	38	40
<i>S. bovinus</i> 5382	44	nd.	52
<i>S. luteus</i> 1155	57	73	76
<i>S. luteus</i> 5382	32	nd.	44
<i>Amanita muscaria</i> 1/182	28	36	41
<i>Pisolithus tinctorius</i> 5335	76	82	89
<i>Colybia butyracea</i> 1841	67	nd.	101
MrgX I	37	35	28
MrgX II	60	47	48
<i>Cenococcum graniforme</i> 3543	30	26	19
<i>C. graniforme</i> 5259	49	nd.	39
<i>C. graniforme</i> 4947	30	nd.	28

nd. — nie oznaczano (not determined)

Jak wykazały nasze doświadczenia, ilość chityny w przeliczeniu na gram suchej masy grzybni zmienia się także wraz z wiekiem badanego organizmu (tab. 1); w większości badanych szczepów wraz z wiekiem rośnie zawartość chityny. Jedynie w grzybni obu szczepów Mrg X i dwu szczepów *C. graniforme* poziom chityny, w starszej grzybni jest wyraźnie niższy niż w młodych strzępkach. Zwraca uwagę fakt, że szczepy, u których wraz z wiekiem wzrósł poziom chityny należą do *Basidiomycetes*, podczas gdy u *C. graniforme* i Mrg X, zaliczanych do *Ascomycetes* (Heim 1957; Trappe 1971, Pachlewski, Kocoń w druku), poziom chityny z wiekiem obniża się. Ze względu na szczupłość materiału trudno wysuwać autorytatywne

wnioski. Być może jednak kierunek zmian poziomu chityny następujący z wiekiem grzybni związany jest z pozycją systematyczną danego grzyba. Zmiany zawartości chityny wraz z wiekiem grzybni były już sygnalizowane przez wielu autorów. Ten kierunek zmian dotyczył zarówno podstawczaków, jak *Hebeloma cylindrosporum* i *Suillus luteus* (Plassard i in. 1982), jak i należących do *Fungi imperfecti* — *Aspergillus* sp. (Sakuari 1977) czy *Fusarium oxysporum* (Whipps i in. 1980; Ride i in. 1971). Natomiast przytaczany już Sharma i in. (1977) badając grzyby z grupy *Moniliales* zauważył spadek zawartości chityny w grzybni wraz z wiekiem. Należy w związku z powyższym zwrócić uwagę na różnice, które mogą wyłonić się przy oznaczaniu zawartości chityny u grzybów owocujących. Zarodniki i towarzyszące im organy mogą zawierać zupełnie inną ilość chityny niż grzybnia wegetatywna. Na przykład Swift (1973) wykazał, że u *Coriolus versicolor* sporofory procentowo zawierają przeszło dziesięciokrotnie więcej chityny niż grzybnia.

Przeprowadzone przez nas hodowle na pożywkach z różnymi związkami azotu wykazały, że wszystkie użyte tu związki są dobrym źródłem azotu dla badanych grzybów mikoryzowych. Jednak zawartość chityny w grzybni zmieniała się wyraźnie w zależności od źródła N (tab. 2). Najwyższą zawartość chityny wykrywano w grzybni hodowanej na siarczanie amonu, nieco niższą, jeśli źródłem azotu był mocznik. Grzybnia hodowana na saletrze wykazywała najniższą zawartość chityny. Wyraźne obniżenie zawartości chityny w grzybni rosnącej na azotanie — w porównaniu z grzybnią, dla której źródłem azotu była jego forma amonowa — stwierdziła też Plassard i in. (1982).

Tabela 2 — Table 2

Zawartość chityny (wyrażona w μg glukozoaminy/mg suchej masy) w 6-tygodniowej grzybni hodowanej na pożywkach płynnych różniących się źródłem azotu

Chitin content (expressed in μg of glucosamine per mg dry mass) in a 6-weeks old mycelium grown in liquid media with different nitrogen sources

Źródło N w pożywce Source of N in medium	μg glukozoaminy/mg grzybni μg of glucosamine/mg of mycelium		
	NH ₄	CO/NH ₂ /2	NO ³
<i>Amanita muscaria</i> 1/182	61	53	36
<i>Suillus bovinus</i> 1941	31	29	15
MrgX I	44	40	31
<i>Cenococcum graniforme</i> 3543	40	32	32

WNIOSKI

Z istotnych stwierdzeń, nasuwających się na podstawie analizy wyników należałoby wymienić:

1. Poziom chityny w grzybni wegetatywnej grzybów mikoryzowych jest różny w zależności od gatunku, a nawet szczepu.

2. Zawartość chityny w grzybni wegetatywnej grzybów mikoryzowych zależy od wieku grzybni i rodzaju podłoża.

3. Procentowa zawartość chityny w grzybni wegetatywnej jest wyższa wówczas gdy źródłem azotu jest sól amonowa lub mocznik, a niższa, gdy azot dostarczony jest w postaci azotanu.

4. Następujący z wiekiem kierunek zmian zawartości chityny w grzybni powietrznej grzybów mikoryzowych jest różny. U wszystkich badanych grzybów z klasy *Basidiomycetes* poziom chityny podnosił się wraz z wiekiem hodowli, natomiast obniżał się u szczepów, które można zaliczyć do *Ascomycetes*.

LITERATURA

- Blumenthal H. J., Roseman G., 1957, Quantitive estimation of chitin fungi. *J. Bacteriology* 74: 222-224.
- Donald W. W., Mirocha C. J., 1977, Chitin as a measure of fungal growth in stored corn and soybean seed. *Cereal Chem.* 54: 466-474.
- Gurusiddaiah S., Blanchette R. A., Shaw C. G., 1978, A modified technique for the determination of fungal mass in decayed wood. *Can. J. For. Res.* 8: 486-490.
- Heim R., 1957, *Les champignons d'Europe*. I-II. Paris.
- Hepper H. M., 1977, A colorometric method for estimation vesicular — arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Soil Biol. Biochem.* 9: 15-18.
- Pachlewski R., Kocoń J. Ultrastruktura strzępek grzyba ektendomikoryzowego sosny. (w druku).
- Plassard C., Coll A., Mousain D., Salsac L., 1983, Dosage de la chitine fongique application à l'estimation de la masse mycélienne présente dans les racines mycorhizées du Piu maritime cultivé in vitro ou en pépinière. *C. R. Acad. Sc. Paris, ser. III*, 297: 233-236.
- Plassard C. S., Mousain D. G., Salsac L. E., 1982, Estimation of mycelial growth of *Basidiomycetes* by means of chitin determination. *Phytochemistry* 21: 345-348.
- Ride J. P., Drysdale R. B., 1971, A chemical method for estimating *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* in infected tomato plants. *Physiol. Pl. Path* 1: 409-420.
- Ride J. P., Drysdale R. B., 1972, A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Pl. Path.* 2: 7-15.
- Sakuari Y., Ho Lee T., Shieta H. 1977, On the convinient method for glucosamine estimation in koji. *Agric. Biol. Chem.* 41: 619-624.
- Sharma P. D., Fisher P. J., Webster J. 1977, Critique of the chitin assay technique for estimation of fungal biomass. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 69: 479-483.
- Swift M. J., 1973, The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. *Soil. Biol. Biochem.* 5: 321-332.
- Trappe J. M., 1971, Mycorrhiza-forming *Ascomycetes*. In: "Mycorrhizae". (E. HacsKaylo, ed), USDA Forest. Serv. Misc. Publ. 1189: 19-37.
- Whipps J. M., Lewis D. H., 1980, Methodology of a chitin assay. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 74: 116-118.
- Whipps J. M., Haselwandter K., McGee E. E. M., Lewis D. H. 1982, Use of biochemical markers to determine growth, development and biomass of fungi in infected tissues, with particular reference to antagonistic and mutualistic biotrophs. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 79: 385-400.