

Nowy gatunek *Metarrhizium*

Metarrhizium velutinum, a new hyphomycete

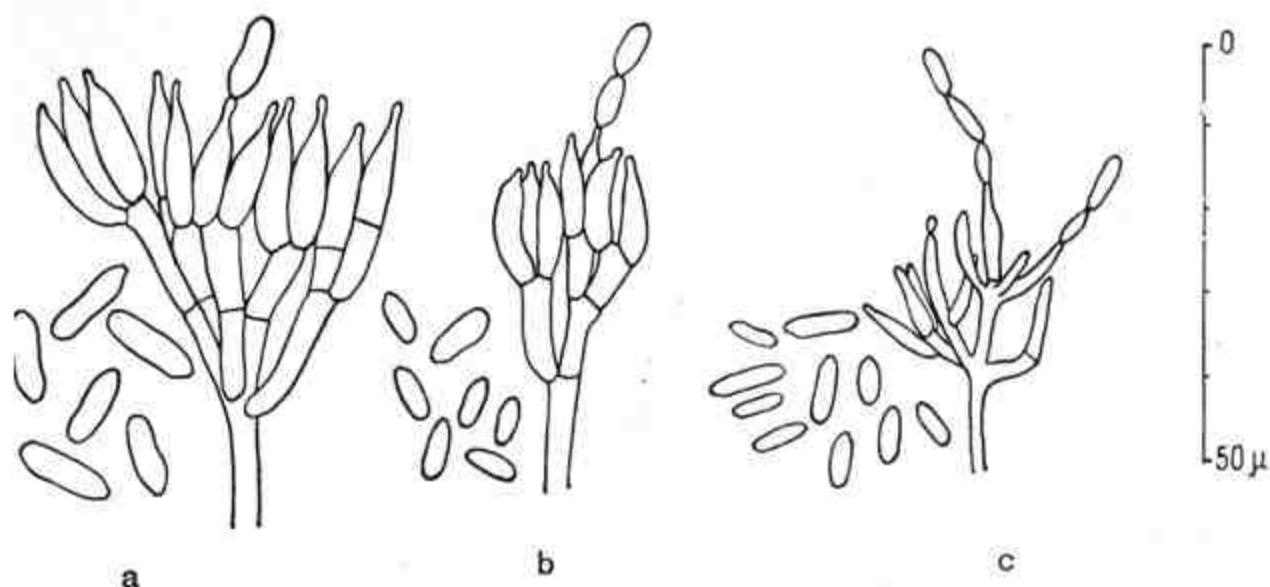
A. BOROWSKA, J. COLONKOWA, W. KOTULOWA

W pracowni Mikrobiologii Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie wyizolowano z gleby grzyb należący niewątpliwie do rodzaju *Metarrhizium*, ale zdecydowanie różny od dotychczas znanych gatunków z tego rodzaju. W literaturze mikologicznej podane są opisy trzech gatunków: *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin 1879, *M. album* Petch 1931 oraz *M. brunneum* Petch 1935. Warto zaznaczyć, że *M. glutinosum* (Alb. et Schwein.) Dittmar jest synonimem *Myrothecium verrucaria* Pope (Gilman 1957). Wymienione gatunki wyizolowane zostały z martwych owadów i opisywane są najczęściej na podstawie cech, jakie wykazują właśnie na tym podłożu. Bardzo nieliczne są dokładniejsze doniesienia uwzględniające ich cechy morfologiczne na podłożach sztucznych. Dlatego wydaje się celowe podanie dostępnych nam informacji i danych dotyczących cech tych gatunków w hodowlach na pożywkach agarowych.

Metarrhizium album na agarze owsianym tworzy (Petch 1931) puszystą stronę o różowobeżowym zabarwieniu, która w miarę wzrostu grzyba przybiera wyraźnie płowy odcień. Agar początkowo brązowożółty, w starych kulturach ma barwę zielonożółtą. Fialidy o wymiarach $8-10 \times 1,75 \mu\text{m}$; fialospory $3-4 \times 1,75 \mu\text{m}$.

M. brunneum (szczep z CBS Baarn) na pożywce Czapek-Doxa tworzy kolonie początkowo białe, w miarę wzrostu żółtawokremowe, bardzo puszyste, z przewagą płonnych strzępek powietrznych; odwrotna strona pożywki bezbarwna, później jasno-cytrynowo-żółta. Pseudosporodochia najczęściej $150-200 \times 30-40 \mu\text{m}$, tworzą się rzadko. Fialidy $9-12 \times 2-3 \mu\text{m}$ (ryc. 1c); fialospory $5-8 \times 2 \mu\text{m}$ (Petch 1935: $4-8 \times 1,5-2 \mu\text{m}$). Cechy jakie wykazuje ten grzyb na innych podłożach podano w tabeli 1.

Najczęściej występującym gatunkiem z rodzaju *Metarrhizium* jest *M. anisopliae*. Jest to często spotykany pasożyt owadów, m. in. kilku ważnych gospodarczo szkodników roślin uprawnych. Wielokrotnie były opisane jego szczepy z różnych owadów oraz izolaty z różnych owadów



Ryc. 1. Konidiofory i konidia

Conidiofores and conidia:

a — *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, WSR Szczecin; b — *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, CBS Baarn; c — *M. brunneum* Petch, CBS Baarn

na kilku pożywkach (Sorokin 1879; Pettit 1895 — wg Petcha 1931; Friederichs 1920; Petch 1931; Siemaszko 1937; Madelin 1963; Majchrowicz 1965). Mniej liczne są doniesienia na temat cech, jakie wykazuje ten grzyb w kulturach z gleby. Miller et al. (1957) pierwsi wyizolowali *M. anisopliae* z gleb leśnych USA i podali, że kolonie tego grzyba na agarze maltowym oraz na pożywce Czapek-Doxa nie różnią się od kolonii szczepów wyizolowanych z owadów. Wymiary konidiów były takie same, jak podawał Petch (1931), tzn. $5-7 \times 2-2,5 \mu\text{m}$ oraz $10-14 \times 3,4 \mu\text{m}$. Hodges (1963) i Goos (1963) stwierdzili występowanie tego grzyba również w glebach uprawnych.

W oparciu o dostępne kultury *M. anisopliae* z CBS Baarn oraz z WSR w Szczecinie, przeprowadzono szczegółowe porównanie ich oraz gatunku przez nas wyizolowanego. Grzyby hodowano na trzech podłożach (Czapek-Doxa, agar owsiany i ziemniaczany) w wielokrotnych powtórzeniach, w temperaturze 28°C i w pokojowej.

Oba szczepy *M. anisopliae*, poza różnicą w wymiarach fialid (CBS $10-12 \times 3-3,5 \mu\text{m}$, a WSR $13-16 \times 3-4 \mu\text{m}$) oraz fialospor (CBS $5-8 \times 2-3 \mu\text{m}$ a WSR $10-15 \times 3-4 \mu\text{m}$), nie wykazują istotniejszych różnic (ryc. 1a, b). Na pożywce Czapek-Doxa grzyb tworzy kolonie czarno-zielono-oliwkowe (ryc. 3a), pseudosporodochia wytwarzają się obficie i wyrastają blisko siebie, co sprawia, że kolonie mają jednolicie

szorstką powierzchnię; rewers kolonii żółtooliwkowy. Na agarze owsianym (ryc. 3b) kolonie grzyba po 3 tygodniach stają się czarno-zielono-oliwkowe, luźne, złożone ze sporodochiów, a właściwie z pseudosporodochiów (ponieważ nie tworzy się wyraźna stroma), nierównomiernie rozproszonych bądź wyrastających koncentrycznie lub promieniście.

Tabela 1 - Table 1

Zestawienie cech charakterystycznych *Metarrhizium anisopliae*, *M. velutinum* i *M. brunneum*
Comparative characteristics of *Metarrhizium anisopliae*, *M. velutinum* and *M. brunneum*

	Podłyka Czapek-Daxa Czapek-Dox agar	Podłyka z mączką ziemniaczaną Potato agar	Podłyka owsiana Oatmeal agar	
<i>M. anisopliae</i>	Kolonie /14 dn./ Colonies /14-day-old/	czarno-zielono-oliwkowe, prawie skorupiate olivaceous green-black, nearly crustaceous	czarno-zielono-oliwkowe, zwarte /WSR/, bądź z obfitą białą płoną grzybnia powietrzną /CBS/ olivaceous green-black, compact /WSR/, or with abundant white sterile aerial hyphae /CBS/	czarno-zielono-oliwkowe, luźne /WSR/ lub z obfitą białą grzybnia powietrzną /CBS/ olivaceous green-black, loose /WSR/ or with abundant sterile aerial hyphae /CBS/
	Rewers kolonii Reverse of colonies	bezbarwny /WSR/ lub żółto-oliwkowy /CBS/ colourless /WSR/ or olive-yellow /CBS/	bezbarwny /WSR/, brązowy /CBS/ colourless /WSR/, brownish /CBS/	bezbarwny /WSR/ lub żółtawy /CBS/ colourless /WSR/ or whitish /CBS/
	Pseudosporodochia	wyprostowane, zrastające się z sobą, 100-250 x 50-100 μm upright, grown together	100-200 x 100-150 μm /WSR/ 100-150 x 80-100 μm /CBS/	150-250 x 80-100 μm /WSR/ 100-150 x 80-100 μm /CBS/
	Fialidy Phialides	15-20 x 3-4 μm /WSR/ 10-12 x 3-3,5 μm /CBS/	17,5-20 x 3-4 μm /WSR/ 10-13 x 2,5-3,5 μm /CBS/	15-20 x 2,5-3,7 μm /WSR/ 8-15 x 2,5-3,5 μm /CBS/
	Fialospory Phialospores	długowalne, fasolkowate, elipsoidalne, elongate-ovoid, bean-shaped or ellipsoid, 10-16 x 3-4 μm /WSR/ 5-8 x 2-3 μm /CBS/	10-12,5 x 2,5-3,5 μm /WSR/ 5-7,5 x 2-2,5 μm /CBS/	10-15 x 2,5-3 μm /WSR/ 4,5-7,5 x 2-2,5 μm /CBS/
<i>M. velutinum</i>	Kolonie /14 dn./ Colonies /14-day-old/	zielonoszare z żółtym marginesem, aksamitne green-gray with yellow margins velvety	zielonoszare z odcieniem oliwkowym, jaśniejszy margines, lekko puszyste green-gray with olivaceous shade, light margins, light downy	jasno-zielono-szare z jaśniejszym marginesem, welwetowe light green-gray with lighter margins, velvety
	Rewers kolonii Reverse of colonies	jaszkrawożółty do żółtooliwkowego yellow to olive-yellow	żółtawy lub z odcieniem oliwkowym w centrum yellowish or with olivaceous shade in centre	bezbarwny lub żółtawy colourless or yellowish
	Pseudosporodochia	lekko wygięte lub proste, oddzielne slightly curved or upright, separate, 150-300 x 30-50 μm	100-350 x 50-70 μm	150-400 x 50-60 μm
	Fialidy Phialides	7,5-14 x 2-2,5 μm	10-15 x 2,5-3 μm	12,5-16 x 2,5-3,8 μm
	Fialospory Phialospores	długowalne, cylindryczne elongate-ovoid, cylindrical, 6-8 x 2,5-3 μm	6-8 x 2,8-3 μm	6-8/10/ x 2,5-3,5 μm
<i>M. brunneum</i>	Kolonie /14 dn./ Colonies /14-day-old/	żółtawokremowe, z przewagą puszystej, pionnej grzybni powietrznej cream-yellow with predominating sterile aerial hyphae	białożółtawe, obfita biała płonna grzybni powietrzna whitish with predominating sterile aerial hyphae	białożółtawe /wzrost bardzo słaby/ whitish
	Rewers kolonii Reverse of colonies	bezbarwny lub cytrynowożółty colourless or lemon	żółtawobrązowy slightly yellowish-brown	bezbarwny lub lekko żółtawy colourless or very pale yellow
	Pseudosporodochia	tworzą się sporadycznie, sporadical, 150-200 x 20-40 μm	nieliczne in small numbers, 70x50 μm	nieliczne in small numbers, 100x50 μm
	Fialidy Phialides	9-12 x 2-3 μm	12,5-15 x 2,5-3 μm	12-17 x 2,5-3,5 μm
	Fialospory Phialospores	długowalne, cylindryczne elongate-ovoid, cylindrical, 5-8 x 2-2,5 μm	6-13,5 x 2,5-3 μm	6-10 x 2,5 μm

Legenda: WSR - szczep ze Szczecina /strain from Szczecin, Poland/
CBS - szczep z Baarn, /strain from Baarn, Holland/

Rewers pożywki bezbarwny lub żółtawy. Często obserwuje się przerost białej powietrznej grzybni w centrum kolonii. Na agarze ziemniaczanym kolonie są tej samej barwy (ryc. 3b). Pseudosporodochia wyrastają bardzo blisko siebie, prawie zrastają się. Szczegóły budowy mikroskopowej *M. anisopliae* podano w tabeli 1 oraz na rycinach 1a i b.

M. anisopliae (o małych wymiarach fialospor) jest gatunkiem najbardziej zbliżonym do wyizolowanego przez nas. Różni się od niego zabarwieniem i strukturą kolonii, wymiarami fialid oraz kształtem i wymiarami fialospor. Dlatego też uznano, że grzyb ten reprezentuje nowy gatunek z rodzaju *Matarrhizium*, który opisujemy jako:

Matarrhizium velutinum sp. n.

Diagnosis: Mycelium in agar Czapek-Dox griseo-virides cum margine luteo, velutinae, rapide crescentes. Pariet internus pallidus vel luteus. Mycelium hyalinum; hyphae undulatae, septatae, ex cellulis 12,5—17,5 × 2,5—5 μm compositae. Pseudosporodochia erecta, recta vel falcata, 150—300 × 3—50 μm. Conidiophora erecta, hyalina, simplices, sympodice ramosa vel penicillioidea, 50 μm longa. Phialides cylindricae, apice attenuatae, 7,5—14 × 2—2,5 μm. Phialosporae hyalinae, unicellulares, cum membrana levi, oblonge ovaes, cylindricae, basi truncatae, apice rotundae, 6—8 × 2,5—3 μm, catenulatae.

Hab.: in terra hortensia, Varsovia Poloniae, 17.XII.1960.

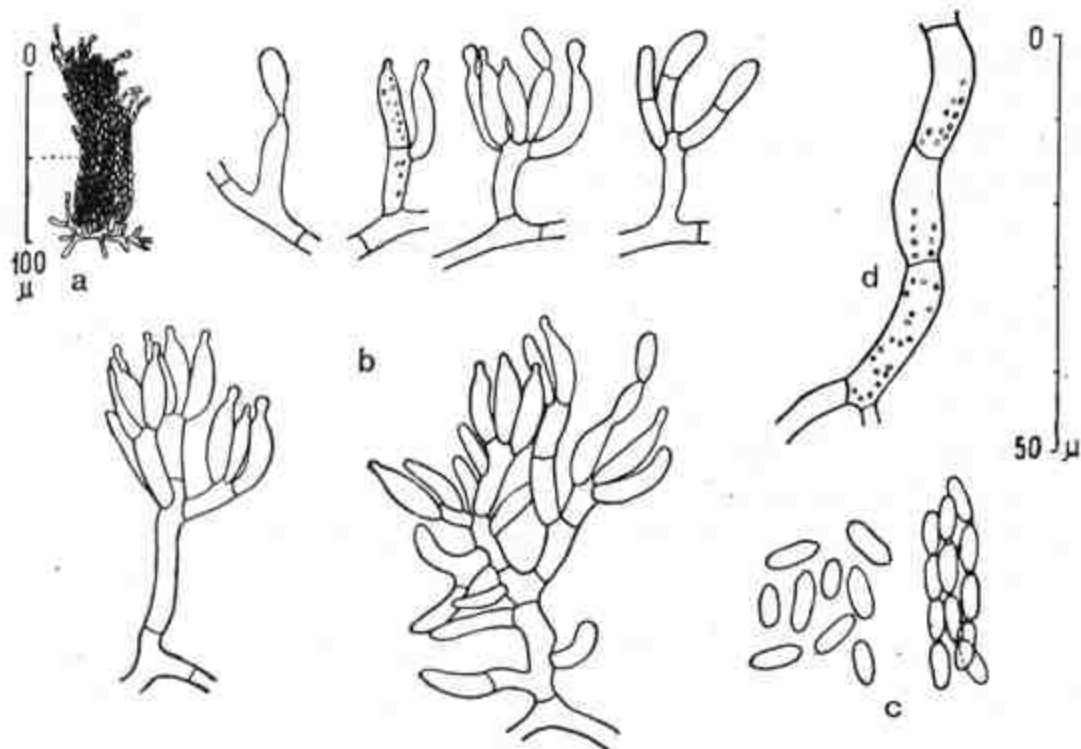
Typus: cultura exsiccata in agar Czapek-Dox, numerus 16463, in Instituto Botanico Universitatis Varsoviensis et figure 2.

Paratypus: cultura viva in Instituto Farmaceutico, Varsovia (Polonia) et in CBS Baarn (Neerlandia).

Diagnoza: Kolonie na pożywce Czapek-Doxa początkowo białe, po 12 dniach zielonoszare z jaśniejszym żółtawym marginesem, niskie o aksamitnej powierzchni; w centrum kolonii tylko czasami sterczy kłaczek płonnej grzybni; po 12 dniach kolonie osiągają średnicę 4 cm (ryc. 3a). Odwrotna strona pożywki początkowo bezbarwna wkrótce przybiera jaskrawożółte lub żółtooliwkowe zabarwienie. W starszych kulturach kolonie mają zabarwienie intensywnie zielonoszare.

Grzybnia wegetatywna złożona z bezbarwnych, falistych strzępek ze zgrubieniami (ryc. 2d). Komórki jej o wymiarach 12,5—17,5 × 2,5—5 μm zawierają liczne krople tłuszczu.

Konidiofory wyrastają pojedynczo lub w skupieniach tworząc pędzlowate pseudosporodochia; konidiofory pojedyncze są nierozgałęzione, wyprostowane, 7,5—14 × 2—2,5 μm, często tuż pod szczytem lekko rozszerzone, bez przegrody lub z jedną przegrodą poprzeczną; często spotykane, nierozgałęzione, dźwigają na szczycie 2—6 fialid. Występują również konidiofory typu *Penicillium* z fialidami I i II rzędu, położonymi

Ryc. 2. *Metarrhizium velutinum* sp. n.

a — młode pseudosporodochium (young pseudosporodochium); b — konidiofory (conidiofores); c — fialospory (phialospores); d — fragment strzępki wegetatywnej (fragment of mycelium)

okółkowo, bądź konidiofory kilkakrotnie rozgałęzione, do 50 μm wysokie (ryc. 2b).

Pseudosporodochia (ryc. 2a), 150—300 \times 30—50 μm , tworzą się wskutek wyrastania ściśle obok siebie kilku obficie rozgałęzionych konidioforów. Szczytowe fialidy tych konidioforów, o wymiarach 9,5—12,5 \times 2,5 μm , wyrastają blisko siebie i skierowane są pionowo ku górze. Tworzące się na ich szczycie długie łańcuchy fialospor położone są równoległe i ściśle do siebie przylegają.

Fialospory początkowo bezbarwne, w starszych kulturach w masie zielonawe, jednokomórkowe, cienkościenne, gładkie, 6—7 \times 2,5—3 μm (wyjątkowo 8 \times 3 μm), podłużnoowalne do cylindrycznych, z zaokrąglonymi końcami, bądź o zwężonym i ściętym jednym końcu, niekiedy lekko wygięte. Połączone są dyzjunkctorem i tworzą długie łańcuchy, które nie rozpadają się nawet w bardzo starych kulturach (ryc. 2c).

M. velutinum na agarze owsianym tworzy kolonie szybko rosnące, które po 12 dniach osiągają średnicę 5 cm (ryc. 3b), luźniejsze o bardziej skąpej grzybni niż na pożywce Czapek-Doxa. Zabarwienie kolonii jasnozielono-szare, a jej rewers jest bezbarwny lub żółtawy. Pseudosporodochia najczęściej 300 \times 60 μm . Fialospory o wymiarach 6—10 \times

× 2,5—3,5 μm. Na agarze ziemniaczanym *M. velutinum* wytwarza kolonie o średnicy 5,5 cm (po 12 dniach), zielonoszare z odcieniem oliwkowym, środek kolonii często bywa bardziej wzniesiony i intensywniej zabarwiony (ryc. 3b). Fialospory o wymiarach 6—8 × 2,8—3 μm.

M. velutinum można inkubować w temperaturze 21—31°C, najszybszy wzrost osiąga w temperaturze 28—30°. Nie wykazuje zdolności rozkładu celulozy.

Grzyb wyizolowano z gleby ogrodowej w Warszawie dnia 17.XII. 1960 roku.

Typ: okaz zielnikowy Nr 16463 (na pożywce Czapek-Doxa) złożono w Zielniku Zakładu Systematyki i Geografii Roślin I.B. U.W. (ryc. 2).

Paratyp: kultura szczepu przechowywana w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie oraz zdeponowana w CBS Baarn.

Serdecznie dziękujemy Pani Prof. dr Alinie Skirgiello za cenne rady i konsultacje w czasie pisania pracy. Pani dr Irenie Majchrowicz dziękujemy za udostępnienie szczepów *M. anisopliae*.

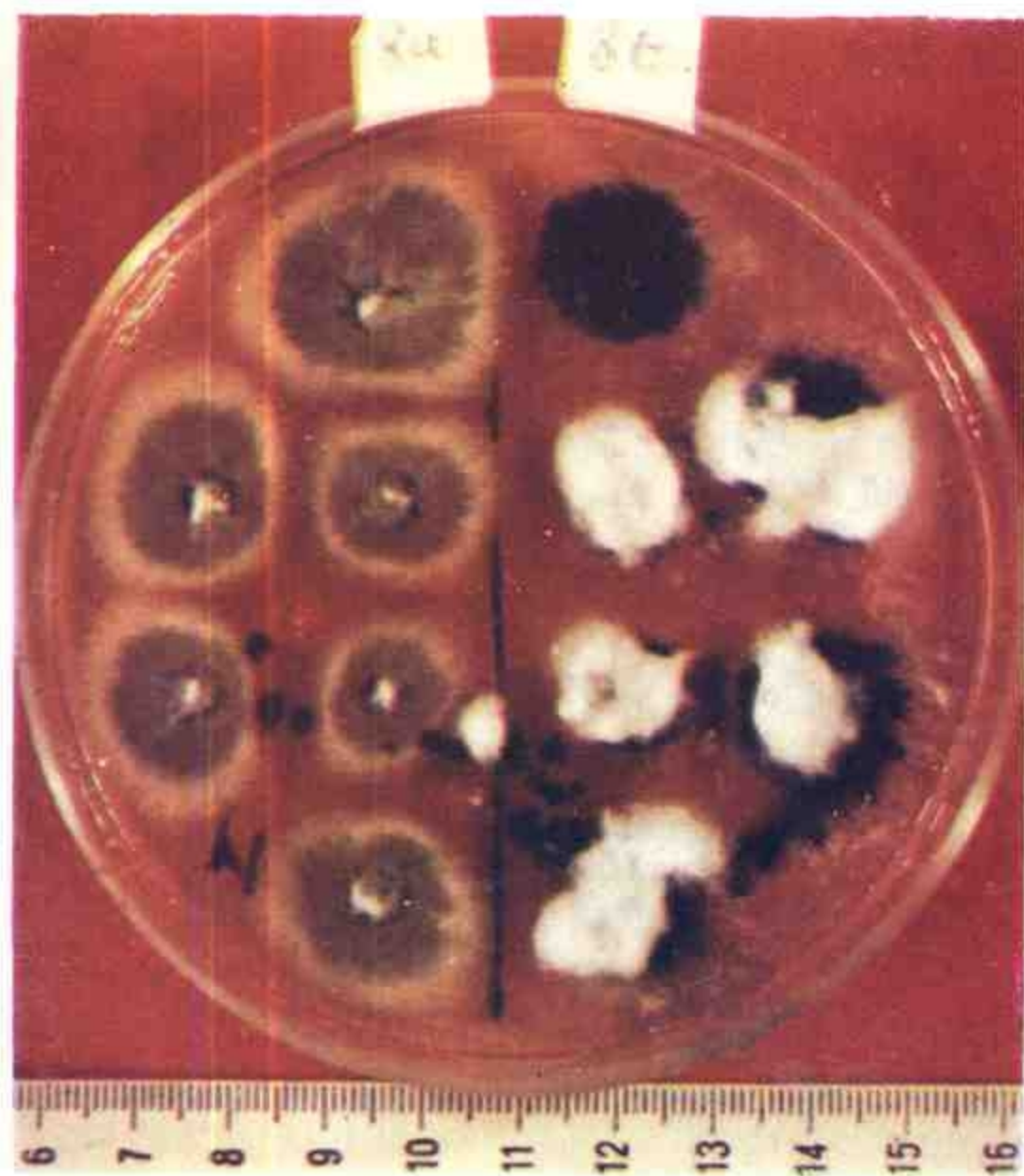
Instytut Botaniki Uniwersytetu Warszawskiego
Instytut Farmaceutyczny w Warszawie

SUMMARY

The authors describe a new species of *Metarrhizium* isolated from a sample of garden soil in Warsaw city. *M. velutinum* is a species most closely related to *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin (strains with small spore dimensions), and less closely with *M. brunneum*. The differences between these three species are discussed.

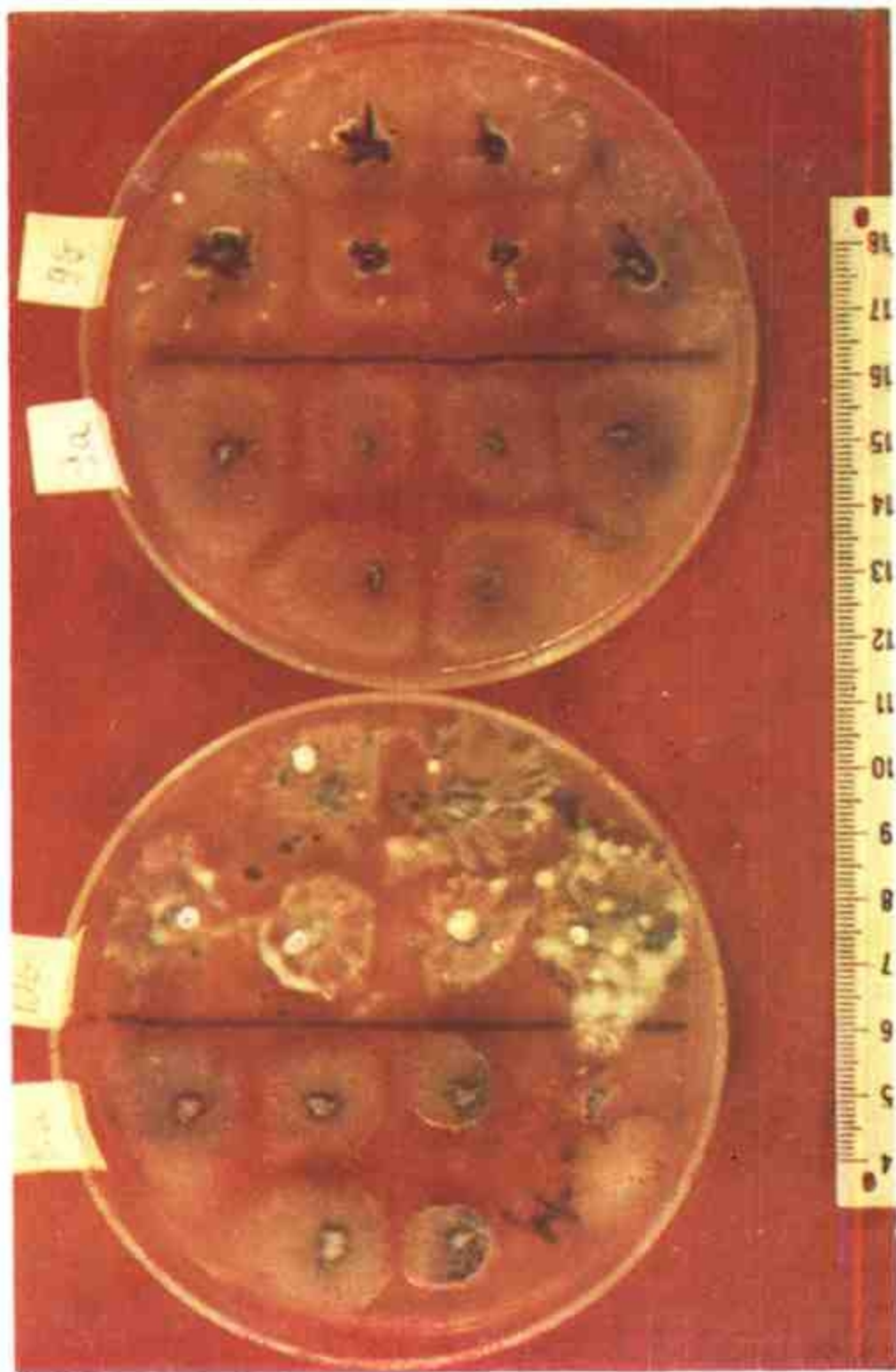
LITERATURA

- Friederichs K., 1920, Über die Pleophagie des Insectenpilzes *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., Centr. Bakteriolog. Parasitenk., 50: 335—356.
- Gilman J. C., 1957, A Manual of soil fungi, Iowa State.
- Glaser R. W., 1926, The green muscardine disease in silkworms and its control, Ann. Entomol. Amer. 19: 180—192.
- Goos R. D., 1963, Further observations on soil fungi in Honduras, Mycologia 55 (2): 144—145.
- Hodges C. S., 1962, Fungi isolated from southern forest tree nursery, soils, Mycologia 54: 225.
- Madelin M. F., 1963, Diseases caused by Hyphomycetous Fungi in Steinhaus Insect Pathology, 2: 233—271, New York and London.
- Majchrowicz I., 1965, Studia nad grzybami glebowymi towarzyszącymi obumie-



A

B



Ryc. 3. Kolonie (14-dniowe) *Metarrhizium velutinum* i *M. anisopliae* na różnych pożywkach

14-day-old colonies on different medium

A — *M. velutinum* (Ba), *M. anisopliae* (Bb) na pożywce Czapek-Doxa (on Czapek-Doxa agar)
B — *M. velutinum* (Ba), *M. anisopliae* (Bb) na pożywce ziemniaczanej (on potato agar); *M. velutinum* (Ba), *M. anisopliae* (Bb) na pożywce owsianej (on oatmeal agar)

raniu owadów w glebie, ze szczególnym uwzględnieniem stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata* Say), Soc. Sci. Stet., Wydz. Nauk Przyr.-Rol. 25 (1): 33—35.

Miller J. H., Giddens J. E., Foster A. A., 1957, A survey of the fungi of forest and cultivated soils of Georgia, *Mycologia* 49 (6): 786—804.

Petch T., 1931, Notes on entomogenous fungi, *Trans. Brit. Myc. Soc.* 16: 55—75.

Petch T., 1935, Notes on entomogenous fungi, *Trans. Brit. Myc. Soc.* 19: 161—194.

Pope S., 1944, A new species of *Metarrhizium* active in decomposing cellulose, *Mycologia* 36: 343—350.

Siemaszko W., 1937, Studia nad grzybami owadobójczymi Polski, *Archiw. Nauk. Biol. Tow. Nauk. Warsz.* 4 (1): 61—62.