

Grzyby drożdżoidalne występujące na ziarniakach pszenicy. IV.

Studium taksonomiczne szczepów *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) Skinner var. *laurentii* i var. *flavescens* (Saito) Lodder et Kreger-van Rij

ZOFIA MACIEJOWSKA-POKACKA

Instytut Ochrony Roślin, Poznań

Maciejowska-Pokacka Z.: (Institute of Plant Protection, Poznań, Miczurina 20, Poland). *Yeasts occurring on wheat seeds. IV. A taxonomic study of strains of Cryptococcus laurentii (Kuff.) Skinner var. laurentii and var. flavescens (Saito) Lodder et Kreger-van Rij.* Acta Mycol. 13(1): 3-9, 1977.

Morphology and physiology of strains of *Cryptococcus laurentii* var. *laurentii* and var. *flavescens* was studied. Morphological features found in var. *laurentii* suggested a close relation to *Sporobolomycetaceae*, and in particular to *Bullera alba* (Hanna) Derx.

WSTĘP

W dotychczasowych badaniach mikoflory ziarna zbóż rzadko uwzględniano różnicowanie gatunkowe grzybów drożdżoidalnych, a czasem pomijano tę grupę całkowicie. O pospolitym występowaniu grzybów z gatunku *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) Skinner na ziarnie pszenicy doniósł po raz pierwszy Kurtzman i wsp. (1970). Maciejowska-Pokacka (1976 b) badając różnicowanie gatunkowe i odmianowe grzybów wyosobnionych z ziarniaków pszenicy i należących do tego rodzaju stwierdziła, że jedną z najpospolitszych była odmiana *C. laurentii* (Kuff.) Skinner var. *magnus* Lodder et Kreger-van Rij. Dalsze badania wykazały, że na ziarnie pszenicy jeszcze liczniej występowała odmiana *C. laurentii* (Kuff.) Skinner var. *laurentii*. Natomiast odmiana *C. laurentii* (Kuff.) Skinner var. *flavescens* (Saito) Lodder et Kreger-van Rij, która nie była dotychczas wyosobniona z ziarniaków zbóż, występowała na badanym przez autorkę materiale sporadycznie.

Lodder i Kreger-van Rij (1952) określając odmiany *C. laurentii* posługiwały się kryteriami morfologicznymi, a mianowicie var. *magnus* różniła się ich zdaniem od typowego szczepu *C. laurentii* obec-

nością kulistych i większych komórek vegetatywnych, podczas gdy var. *flavescens* wytwarzała komórki o nieregularnym kształcie. Phaff i Fell (1970) podają z kolei, że odmiany *C. laurentii* można rozpoznać badając zróżnicowanie zdolności asymilacji niektórych składników pokarmowych. Badane przez nich szczepy var. *laurentii* wykazywały bowiem zdolność pobierania erytrytu i melibiozy, szczepy var. *magnus* nie pobierały tych składników, a szczepy var. *flavescens* asymilowały melibiozę, lecz nie zużywały erytrytu.

Do gatunku *C. laurentii* są zaliczane szczepy o określonych właściwościach fizjologicznych i o białawej, kremowej, żółtawej lub różowawej barwie kolonii. Ich mikroskopowe cechy morfologiczne są mało specyficzne. Faza vegetatywna składa się tu głównie, podobnie jak u wielu innych gatunków i rodzajów grzybów drożdżoidalnych, z owalnych lub kulistych komórek pączkujących, a wytwarzanie prymitywnej nibygrzybni i grzybni, którą ostatnio stwierdził Kurtzman (1973), jest zjawiskiem rzadkim. Poza tym kultury szczepów tej samej odmiany mogą być gładkie lub szorstkie, pastowate lub śluzowate.

Szczepy var. *laurentii* występują pospolicie na różnych nadziemnych częściach roślin, a ponadto w wodach słodkich i słonych, winie, piwie, gumach roślinnych, ciele bezkręgowców, m.in. organizmach planktonowych, owadach oraz w powietrzu. W sporadycznych przypadkach wyosobniono je także z innych źródeł, na przykład z tchawicy ludzkiej. Natomiast obecność *C. laurentii* var. *flavescens* stwierdzono w powietrzu; według dotychczasowych opinii odmiana ta należy do organizmów rzadkich (Phaff, Fell 1970).

MATERIAŁ I METODY

Dane dotyczące materiału i stosowanych metod badawczych podano w poprzedniej publikacji (Maciejowska-Pokacka 1976 a). Badania taksonomiczne, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy, przeprowadzono na 50 szczepach *C. laurentii* var. *laurentii* i 8 szczepach var. *flavescens*, wyosobnionych z ziarniaków pszenicy w latach 1971-1974.

WYNIKI I DYSKUSJA

Liczebność występowania oraz cechy fizjologiczne obu badanych odmian podano w tabelach 1 i 2. Jak widać (tab. 1) szczepy *C. laurentii* var. *laurentii* występowały głównie na ziarniakach nie odkażonych, podobnie jak szczepy *C. laurentii* var. *magnus* (Maciejowska-Pokacka 1976 b). Na ziarniakach zebranych 5, 6 i 7 dni przed żniwami liczba szczepów tej odmiany była nieco wyższa, niż na ziarniakach o pełnej

Tabela 1 — Table 1

Cryptococcus laurentii var. *laurentii* i var. *flavescens*Liczebność szczepów w mikoflorze wyosobnionej z ziarniaków pszenicy
Number of strains in mycoflora isolated from wheat seeds

Materiał używany do izolacji Material used for isolation	Średnia liczba kolonii wyosobnionych z 1 g ziarna (0-4 miesiące po zbiorze) Mean number of colonies isolated from 1 g of seeds (0-4 months after harvest)			
	grzyby ogółem fungi total	grzyby drożdżoidalne yeasts	var. <i>laurentii</i>	var. <i>flavescens</i>
Ziarniaki nie odkażane Non-sterilized seeds	36 400	2 900	720	< 1
Ziarniaki odkażane Sterilized seeds	2 830	302	8	0

dojrzałości. Podobną zależność stwierdzono pomiędzy stopniem dojrzałości ziarna i występowaniem gatunków z rodzaju *Sporobolomyces* Kluver et van Niel (Maciejowska-Pokacka 1976 c). Wszystkie szczepy tej odmiany wytwarzały kolonie o zabarwieniu kremowym lub bladoróżowym, z wiekiem szarzejącym. Kolonie tych szczepów były gładkie lub nieco szorstkie, pastowate lub śluzowate, ale nie wodniste jak np. kolonie szczepów *C. laurentii* var. *magnus*. Z nieodkażonych ziarniaków wyosobniono ponadto 8 szczepów *C. laurentii* var. *flavescens*. Kolonie tych izolatów były kremowe lub żółtawe, gładkie i pastowate.

Szczepy *C. laurentii* var. *laurentii* różniły się między sobą nie tylko cechami makroskopowymi kultur, ale również pod względem mikroskopowym ilościową proporcją komórek małych i dużych. Porównując natomiast strukturę mikroskopową kultur var. *laurentii* i var. *magnus* (Maciejowska-Pokacka 1976 b) stwierdzono pomiędzy nimi wyraźne różnice morfologiczne. U szczepów var. *laurentii* występowały kuliste komórki o wymiarach $4,1-12,2 \times 4,1-9,8 \mu\text{m}$, wytwarzające wydłużone pączki (ryc. 12). Na jednym biegunie komórki mogło powstawać sukcesywnie kilka pączków; niekiedy pączki powstawały również w innych miejscach. W wielu przypadkach pączek powstawał na trzonku podobnym do strzępki kielkowej lub do sterygmy (ryc. 6, 7, 14). Czasem trzonek ten pęczniał i przekształcał się w owalną komórkę (ryc. 8, 13). Pomimo pewnego podobieństwa opisanego tutaj pączkowania przypominającego stadium doskonałe *Aessosporon* van der Walt (1970) wydaje się, że w tym przypadku była to forma rozwoju wegetatywnego. W kulturach szczepów var. *laurentii* nie spotykano poza tym tak dobrze wy-

Tabela 2 — Table 2

Cryptococcus laurentii var. *laurentii* i var. *flavescens*

Charakterystyka fizjologiczna szczepów wyisobnionych z ziarniaków pszenicy

Physiological characteristics of strains isolated from wheat seeds

Właściwości fizjologiczne Physiological characteristics	<i>C. laurentii</i>		Właściwości fizjologiczne Physiological characteristics	<i>C. laurentii</i>	
	var. <i>laurentii</i>	var. <i>flavescens</i>		var. <i>laurentii</i>	var. <i>flavescens</i>
Asymilacja Assimilation			Asymilacja Assimilation		
Glukoza Glucose	+	+	Glicerol Glycerol	-	+; -
Galaktoza Galactose	+	+	Erytryt Erythritol	+	-
L-sorboza L-sorbose	+	+	Ribitol Ribitol	+; -	±; -
Sacharoza Saccharose	+	+	Dulcyt Galactitol	+	+
Maltoza Maltose	+	+	Mannit Mannitol	+	+
Celobioza Cellobiose	+	+	Glucitol Glucitol	+	+
Trehaloza Trehalose	+	+	α -metyl-D-glukozyd α -methyl-D-glucoside	+	+
Laktoza Lactose	+	+	Salicyna Salicin	+	+
Melibioza Melibiose	+	+	DL-kwas mlekowy DL-lactic acid	-	-
Rafinoza Raffinose	+	+	Kwas bursztynowy Succinic acid	±	+
Melezytoza Melesitose	+	+	Kwas cytrynowy Citric acid	±	±
Inulina Inulin	-	±	Inozytol Inositol	+	+
Skrobia rozpuszczalna Soluble starch	±	±	Wzrost na pożywce bez witamin	-	-
D-ksyloza D-xylose	+	+	Growth in vitamin-free medium		
L-arabinoza L-arabinose	+	+	Azotan potasu Potassium nitrate	-	-
D-arabinoza D-arabinose	+	±	Azotyn potasu Potassium nitrite	-	-
D-riboza D-ribose	+	+	Wytwarzanie związków skrobiopodobnych	+	+
L-ramnoza L-rhamnose	+	+	Formation of starch-like compounds		
Etanol Ethanol	±	±	Rozpuszczanie żelatyny Gelatin liquefaction	-	-

kształconych, jak u szczepów var. *magnus*, trójkomórkowych i trójdzielnych elementów (Maciejowska-Pokacka 1976 b). Występował tu natomiast inny, charakterystyczny element morfologiczny, mianowicie komórki o kształcie zbliżonym do wrzecionowatego (ryc. 4) i o wymiarach $5,1-14,7 \times 2,0-4,5 \mu\text{m}$, które mogły pączkować na obydwóch lub na jednym biegunie. Podobne komórki spotykano u grzybów z rodzaju *Sporobolomyces* (Maciejowska-Pokacka 1976 c). Większość komórek wykazywała jednak prosty, jednobiegunowy typ pączkowania.

W kulturach szczepów *C. laurentii* var. *laurentii* wyróżniono 2 generacje komórek: małe, wydłużone komórki o wymiarach $1,9-7,3 \times 1,1-3,2 \mu\text{m}$, przypuszczalnie w stadium haplofazy (ryc. 1, 2, 3, 10) oraz większe komórki o kształcie owalnym lub zbliżonym do kulistego, o wymiarach $3,3-14,8 \times 3,1-12,9 \mu\text{m}$, przypuszczalnie w stadium diplofazy (ryc. 2, 3). Duże komórki powstawały z komórek małych, podobnie jak u szczepów *Sporobolomyces* (Maciejowska-Pokacka 1976 c). Proces ten był prawdopodobnie wynikiem somatycznej autogamii, ponieważ nie obserwowano konjugacji dwóch niezależnych komórek. Ponadto w kulturach szczepów *C. laurentii* var. *laurentii* występowały elementy prymitywnej nibygrzybni i chlamydospory (ryc. 11).

Powstawanie zarodników na trzonkach przypominających sterygmy wskazuje na pokrewieństwo szczepów *C. laurentii* var. *laurentii* z grzybami z rodziny *Sporobolomycetaceae*, a zwłaszcza z rodzajem *Bullera* Derx. Wskazują na to również identyczne właściwości fizjologiczne trzech odmian *C. laurentii* i gatunku *Bullera alba* (Hanna) Derx (Phaff 1970; Phaff, Fell 1970). Ponieważ zdolność wytwarzania balistospor u szczepów *Bullera* może zanikać, brak jest w takim przypadku kryteriów, na podstawie których można by odróżnić je od szczepów *C. laurentii* (Phaff 1970). Ponadto oryginalne szczepy *Bullera alba* zostały wyosobnione ze słomy pszennej i owsianej porażonej rdzą. Obydwa gatunki występują więc w tym samym środowisku naturalnym, co stanowi dodatkowy argument pozwalający na przypuszczenie, że szczepy *C. laurentii* var. *laurentii* opisane w niniejszej pracy są w rzeczywistości szczepami *Bullera alba* pozbawionymi zdolności wytwarzania balistospor.

Kultury badanych szczepów *C. laurentii* var. *flavescens* składały się przeważnie z mniej lub bardziej wydłużonych komórek owalnych. Charakterystycznym elementem tych kultur były jednak komórki o nieregularnych kształtach i komórki kolankowate (ryc. 18-21, 23-26). Wszystkie te formy reprezentowały różny stopień i różny kierunek rozwoju potrójnych elementów, typowych dla *C. laurentii* var. *magnus* i *C. albidus* var. *albidus* (Maciejowska-Pokacka 1976 b). W kulturach *C. laurentii* var. *flavescens* niekiedy znajdowano również komórki wytwarzające pączki na trzonku podobnym do sterygmy (ryc. 22). Zwykle jednak za-

miast trzonka powstawała bazypetalnie druga komórka (ryc. 32). Te dwie komórki najczęściej nie rozdzielały się, lecz łączyły, a formą pośrednią była komórka bliźniacza (ryc. 29, 32). W starszych kulturach *C. laurentii* var. *flavescens* występowały charakterystyczne komórki owalne lub gruszkowate o gęstej cytoplazmie (ryc. 28, 30). Niezależnie od wieku w kulturach tej odmiany powstawały komórki olbrzymie (ryc. 17). Zasadniczym sposobem pączkowania było pączkowanie proste, jednobiegunowe (ryc. 16, 33), podobnie jak u szczepów var. *laurentii*. Szczepy var. *flavescens* wytwarzały także elementy prymitywnej nibygrzybni (ryc. 23, 27, 31). W kulturach wyróżniono 2 generacje komórek: małe, owalne komórki o wymiarach $2,8-7,3 \times 1,6-3,5 \mu\text{m}$ przypuszczalnie w stadium haplofazy (ryc. 16) i wydłużone lub owalne, większe komórki o wymiarach $4,4-15,0 \times 1,7-12,0 \mu\text{m}$ przypuszczalnie w stadium diplofazy (ryc. 16, 19).

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski: 1) badane szczepy *C. laurentii* var. *laurentii* różniły się wyraźnie pod względem cech morfologicznych od szczepów *C. laurentii* var. *magnus* i var. *flavescens*; 2) szczepy *C. laurentii* var. *laurentii* miały cechy morfologiczne i fizjologiczne wskazujące na bliskie pokrewieństwo z grzybami z rodziny *Sporobolomycetaceae*, a zwłaszcza z *Bullera alba*; 3) badane szczepy *C. laurentii* var. *flavescens* wytwarzały charakterystyczne komórki o nieregularnych kształtach oraz komórki kolankowate. Na podstawie ostatnich cech można było je łatwo odróżnić od szczepów dwóch pozostałych odmian *C. laurentii*.

Autorka dziękuje dr N. J. W. Kreger-van Rij z Laboratorium voor Medische Microbiologie Rijks Universiteit, Groningen, Holandia za sprawdzenie poprawności oznaczenia szczepu nr 55 *C. laurentii* var. *laurentii*.

Tablica I — Plate I

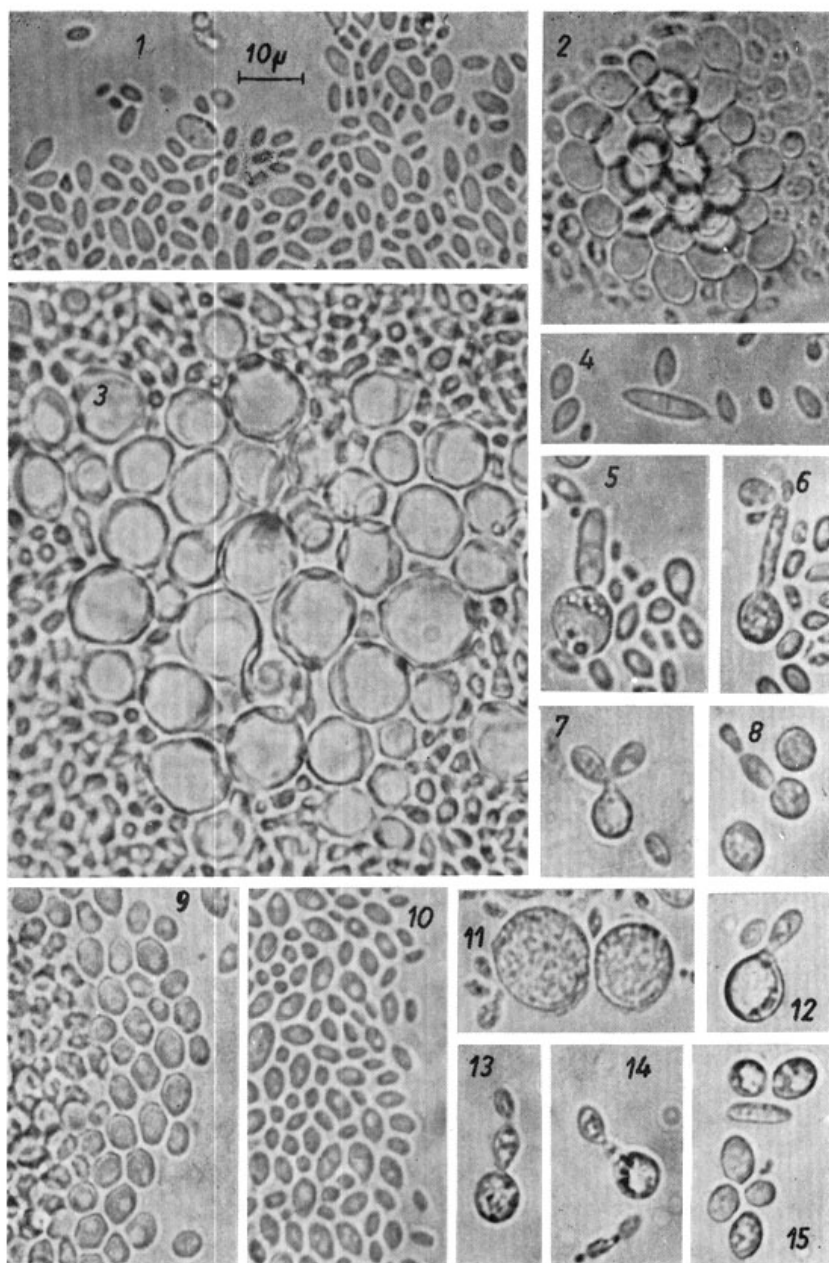
Cryptococcus laurentii (Kuff.) Skinner var. *laurentii*

szczep nr 55: 1, 4, 5 — fragmenty kultur na agarze kukurydzianym po 4 dniach; 2, 3 — fragmenty kultur na agarze ziemniaczanym z glukozą po 4 i 5 dniach; 5-8 — powstawanie pączków na niektórych komórkach w stadium domniemanej diplofazy; szczep nr 126: 9 — fragment kultury na agarze ziemniaczanym z glukozą po 3 dniach; 10, 15 — fragmenty kultur na agarze kukurydzianym po 3 dniach; 11 — chlamydospory; 12-14 — powstawanie pączków na niektórych komórkach w stadium domniemanej diplofazy

strain No. 55: 1, 4, 5 — fragments of cultures on cornmeal agar after 4 days; 2, 3 — fragments of cultures on PDA after 4 and 5 days; 5-8 — formation of buds on some cells of presumed diplophase;

strain No. 126: 9 — fragment of a culture on PDA after 3 days; 10, 15 — fragments of cultures on cornmeal agar after 3 days; 11 — chlamydospores; 12-14 — formation of buds on some cells of presumed diplophase

Tablica I — Plate I



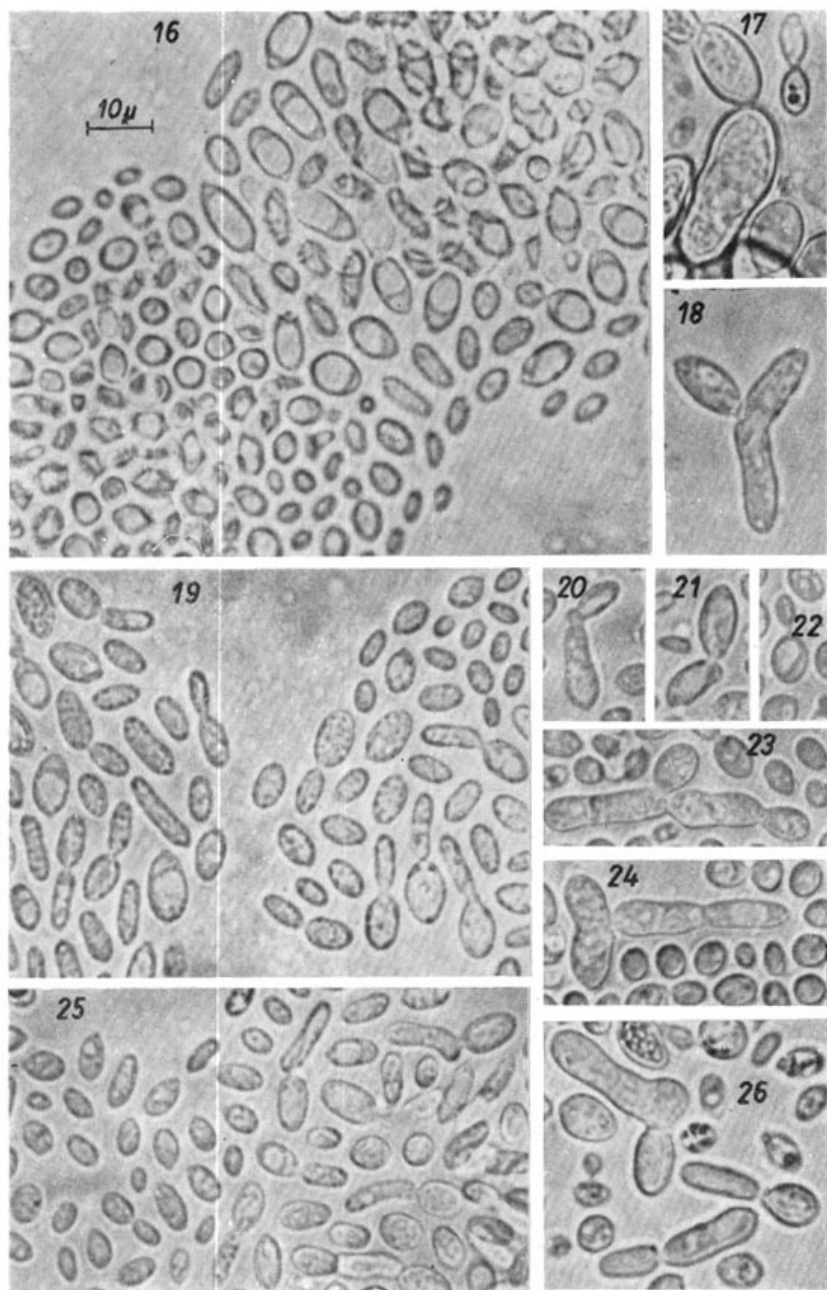
Tablica II — Plate II

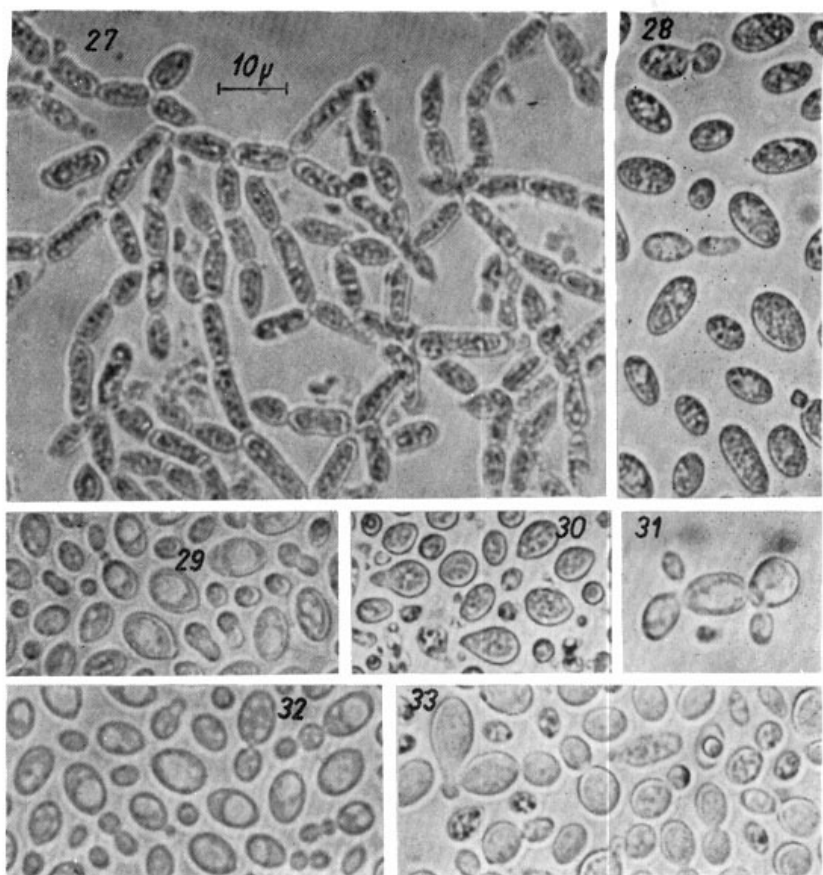
Cryptococcus laurentii (Kuff.) Skinner var. *flavescens* (Saito) Lodder et Kreger-van
Rij

szczep nr 121: 16, 18-21, 23-26 — fragmenty kultur na agarze kukurydzianym, z komórkami o nieregularnym kształcie reprezentującymi różne stadia rozwoju elementów trójdzielných; 17 — komórka olbrzymia w kulturze na agarze ziemniaczanym z glukozą; 22 — powstawanie pączka na trzonku podobnym do sterygmy;

strain No. 121: 16, 18-21, 23-26 — fragments of cultures on cornmeal agar with cells of irregular shape representing various stages of development of triple elements; 17 — a giant cell in a culture on PDA; 22 — formation of a bud on a sterigma-like stalk

Tablica II — Plate II





Cryptococcus laurentii (Kuff.) Skinner var. *flavescens* (Saito) Lodder et Kreger-van Rij

szczep nr 121: 27 — fragment kultury w mineralnej pożywce płynnej z maltozą po 3 tygodniach; 28, 30 — owalne i gruszkowate komórki w starej kulturze na agarze ziemniaczanym z glukozą; 29, 31-33 — fragmenty 4-dniowych kultur na agarze kukurydzianym; na ryc. 29 i 32 widać różne stadia rozwoju dwóch kolejnych pączków powstających na większych, owalnych komórkach

strain No. 121: 27 — fragment of a culture in a liquid mineral medium with maltose after 3 weeks; 28, 30 — oval and pear-shaped cells in an old culture on PDA; 29, 31-33 — fragments of 4-day-old cultures on cornmeal agar; on figs. 29 and 32 are seen various stages of development of two successive buds formed on larger oval cells

SUMMARY

The paper is concerned with the morphology and physiology of strains of *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) Skinner var. *laurentii* and var. *flavescens* (Saito) Lodder et Kreger-van Rij isolated in the years 1971-1974 from 5 varieties of winter wheat seeds and from 4 regions of Poland. Morphological characters found in strains of *C. laurentii* var. *laurentii* indicated that they were related to *Sporobolomycetaceae*, and especially to *Bullera alba* (Hanna) Derx. In strains *Cryptococcus laurentii* var. *flavescens* irregular, polymorph and knee-shaped cells were found this feature was highly characteristic for the variety *flavescens*.

LITERATURA

- Kurtzman C. P., 1973, Formation of hyphae and chlamydo-spores by *Cryptococcus laurentii*, Mycologia. 65: 388-395.
- Kurtzman C. P., Wickerham L. J., Hessletine C. W., 1970, Yeasts from wheat and flour, Mycologia. 62: 542-547.
- Lodder J., Kreger-van Rij N. J. W., 1952, The yeasts. Amsterdam-London.
- Maciejowska-Pokacka Z., 1976a, Grzyby drożdżoidalne występujące na ziarniakach pszenicy. I. Studium taksonomiczne szczepów *Candida albicans* (Robin) Berkhout i *C. tropicalis* (Cast.) Berkhout, Acta Mycol. 12 (1): 113-122.
- Maciejowska-Pokacka Z., 1976 b, Grzyby drożdżoidalne występujące na ziarniakach pszenicy. II. Studium taksonomiczne szczepów *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) Skinner var. *magnus* Lodder et Kreger-van Rij i *C. albidus* (Saito) Skinner var. *albidus*, Acta Mycol. 12 (2): 195-202.
- Maciejowska-Pokacka Z., 1976 c, Grzyby drożdżoidalne występujące na ziarniakach pszenicy. III. Studium taksonomiczne szczepów *Sporobolomyces roseus* Kluyver et van Niel. i *S. pararoseus* Olson et Hammer. Acta Mycol. 12 (2): 203-210.
- Phaff H. J., 1970, *Bullera* Derx, [in:] Lodder J., ed., The yeasts, Amsterdam-London.
- Phaff H. J., Fell J. W., 1970, *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff et Spencer, [in:] Lodder J., ed., The yeasts, Amsterdam-London.
- Walt P. J., van der, 1970, The perfect and imperfect states of *Sporobolomyces salmonicolor*, Antonie van Leeuwenhoek, 36: 49-55.