

Received: 08.07.2022 / Accepted: 30.08.2022

ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY

Przegląd metod długotrwałego przechowywania grzybów i Oomycetes

The review of fungi and oomycota long-term storage methods

Natalia Łukaszewska-Skrzypniak*, Katarzyna Sadowska^A, Sylwia Stępniewska-Jarosz^B,
Weronika Zenelt, Natasza Borodynko-Filas^C

Streszczenie

Grzyby są grupą organizmów bardzo zróżnicowaną i o ogromnym znaczeniu zarówno dla biosfery, jak i gospodarki. Stąd wynika potrzeba zabezpieczenia ich bioróżnorodności. Istnieje szereg metod laboratoryjnych zapewniających długotrwałe przechowywanie. Ich podstawowym zadaniem jest zapewnienie przeżywalności oraz zabezpieczenie cech biologicznych. Tradycyjne metody są proste, lecz pracochłonne, inne wymagają specjalistycznego sprzętu. Do najbardziej popularnych krioprezerwacyjnych metod należą: liofilizacja, mrożenie w glicerolu w -80°C i przechowywanie w ciekłym azocie. Obecnie za jedną z najlepszych metod przechowywania uznawana jest krioprezerwacja w ciekłym azocie, jednak nawet ona nie jest uniwersalna w stosunku do wszystkich izolatów.

Słowa kluczowe: długotrwałe przechowywanie, krioprezerwacja, ciekły azot, liofilizacja, grzyby

Abstract

Fungi are extremely diverse and beneficial organisms both for environment and industry; thus we are obliged to secure it's biodiversity. There are several laboratory methods for fungi longterm preservation. The main goal is to secure their vitality and biological properties. Some of them are simple but the same time laborious, other demand specific equipment. Among the most popular methods we find: freeze-drying, cryopreservation at -80°C and in liquide nitrogen. The most reliable is cryopreservation in liquid nitrogen. However even this method is not universal and suitable for all cultures.

Key words: long-term conservation, cryopreservation, liquide nitrogen, freeze-drying, fungi

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

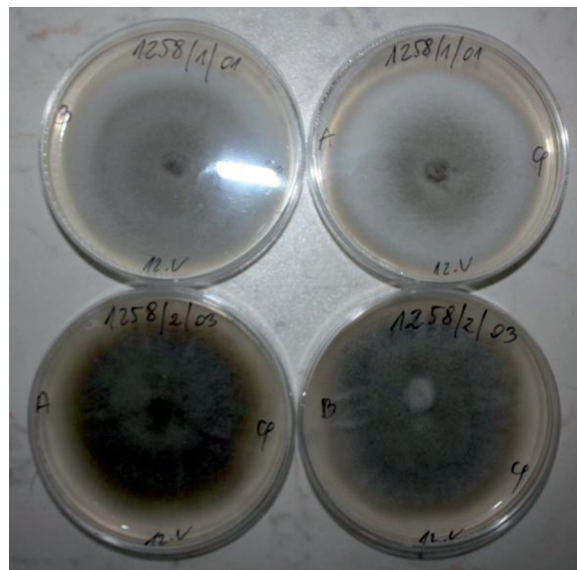
*corresponding author: n.lukaszewska@iortib.poznan.pl

ORCID: ^A0000-0003-0405-9571, ^B0000-0002-6259-4663, ^C0000-0002-4217-6421

Cele przechowywania grzybów / Purposes of mushroom storage

Na Ziemi istnieje niewiele naturalnych środowisk, w których grzyby nie występują. Ich wzajemne związki z pozostałymi organizmami biosfery odgrywają dla niej kluczową rolę. Zasadlają zarówno różnorodne substraty, jak i organizmy żywe. W relacji z roślinami mogą być ich patogenami, endofitami, symbiontami, a w końcu w stosunku do pozostałej po nich materii organicznej saprobiontami (Gupta i wsp. 2013); ponadto w środowisku występują bardzo licznie. Do tej pory opisanych zostało około 100 tysięcy gatunków, rocznie przybywa blisko tysiąc nowo opisanych i jest to tylko niewielka ich część spośród żyjących na Ziemi. Ocenia się, że z jednym gatunkiem roślin naczyniowych związanych jest wiele gatunków grzybów, co wskazywałoby na liczbę gatunków według bardzo ostrożnych szacunków znacznie przewyższającą milion (Hawksworth 2001; Mueller i Schmit 2007). Grzyby wytwarzają dużą ilość metabolitów wtórnych. Stosunkowo dobrze opisane są te z nich, których obecność przekłada się na ekonomiczne lub zdrowotne znaczenie, takie jak mikotoksyny, obecne w żywności i paszach. Choroby roślin powodowane przez grzyby wyrządzają poważne straty gospodarcze w uprawach roślin. W odpowiedzi na zapotrzebowanie rynkowe rozwinął się przemysł fitofarmaceutyczny generujący wielomiliardowe przychody i dynamicznie się rozwijający. Ze względu na powyższe, środowiskowe znaczenie, konieczna jest ochrona bioróżnorodności grzybów zarówno *in situ*, jak również *ex situ*. Za ich zachowaniem przemawiają także potrzeby naukowe, badawcze oraz przemysłowe (biotechnologiczne). Niezbędne jest zapewnienie izolatów referencyjnych, materiałów dla celów szkoleniowych i edukacyjnych. Aby sprostać tym wymaganiom, konieczne jest zapewnienie ich długotrwałego przechowywania. W przedsięwzięciach z obszaru biotechnologii oraz badań naukowych utrata ekonomicznie wartościowych, specyficznych właściwości izolatów może skutkować poważnymi stratami finansowymi lub ograniczać plany badawcze. Materiały badawcze przechowywane są zarówno w wyspecjalizowanych kolekcjach gromadzących zasoby szczepów i izolatów na potrzeby całego środowiska naukowego i przemysłu, jak i mniejszych kolekcjach zawodowych. Podstawowym celem jest dostarczenie izolatów właściwie zidentyfikowanych i opisanych oraz przechowywanych w warunkach, które zapewniają zachowanie ich biologicznych właściwości, takich jak: żywotność, cechy morfologiczne makroskopowe i mikroskopowe, charakterystyki fizjologiczne, stabilność genetyczna (Homolka 2013).

Odpowiednie warunki przechowywania powinny nie tylko zabezpieczyć żywotność organizmu, ale także zapobiegać powstającym zmianom cech morfologicznych i biochemicznych. Pierwszymi zauważalnymi zmianami są makroskopowe cechy kolonii, takie jak jej barwa, zwartość, charakter grzybni oraz dynamika jej wzrostu (fot. 1).



Fot. 1. *Colletotrichum gloeosporioides*, izolat 1258 Kolekcji Mikroorganizmów Patogenicznych dla Roślin Uprawnych Instytutu Ochrony Roślin – PIB. Zróżnicowanie morfologiczne pomiędzy różnymi próbami (N. Łukaszevska-Skrzypniak)

Photo 1. *Colletotrichum gloeosporioides*, culture 1258 of Microbial Collection of Plant Pathogens Institute of Plant Protection – NRI. Morphological differences of the same culture (N. Łukaszevska-Skrzypniak)

Długotrwałe przechowywane izolaty nabierają tendencji do pleomorfizmu. W badaniu mikroskopowym ujawniają się zmiany morfologicznych cech strzępek i zarodników. Obserwujemy trudności w tworzeniu organów rozmnażania generatywnego, obniżenie intensywności zarodnikowania konidialnego aż do jego zaniku. Dla zapewnienia stabilności kultury należy ograniczyć ilość jej transferów do niezbędnego minimum. Poważnym problemem jest utrata cech fizjologicznych, zdolności do wytwarzania specyficznych metabolitów czy utrata złożonych właściwości, takich jak patogeniczność. Może dochodzić także do zmian na poziomie genetycznym.

Metody przechowywania / Storage methods

Metody długotrwałego przechowywania są szeroko dyskutowanym tematem. Historycznie, badanie grzybów wyosobnionych w formie kultur, w warunkach laboratoryjnych wymagało zabezpieczenia tych materiałów badawczych. Podstawowym celem jest utrzymanie ich żywotności. Istnieje szereg metod wymagających minimalnych nakładów finansowych i technicznych, a ich stosowanie jest łatwe i dostępne. Jednym z najprostszych sposobów utrzymywania kultur grzybowych jest ich sukcesywne przeszczepianie na podłoża agarowe. Krótkotrwałe można w tym celu wykorzystywać płytki Petriego lub częściej probówki albo

butelki laboratoryjne wypełnione podłożem agarowym. Częstotliwość transferu zależy od gatunku oraz warunków, czasem wynosi od 2 do 4 tygodni, częściej jednak są to 2 lub 4 miesiące (von Arx i Schipper 1978; Smith i Onions 1994). Tradycyjna metoda utrzymywania kultury przeszczepianej ze starej na nową pożywkę stała nadal praktykowana jest w wielu laboratoriach. Oprócz niewątpliwych zalet wiąże się z nią także utrudnienia polegające na wysokim zagrożeniu zakażeniami mikrobiologicznymi i braku zabezpieczenia przed zmianami cech genetycznych i fizjologicznych (Onions 1971). Wymagane jest także doświadczenie personelu, który potrafi ocenić odstępstwa od standardowych cech morfologicznych. Przy tym jest bardzo pracochłonna, co każe uwzględnić ten czynnik przy kalkulacji kosztów prowadzenia kolekcji izolatów. Aby spowolnić wysychanie pożywki, skosy agarowe pokrywa się warstwą oleju mineralnego (fot. 2). Dodatkowo spowalnia to tempo rozrostu grzybnii i oddychania organizmu, co wydłuża czas kolejnego odnowienia kultury (Sharma i Smith 1999). Aby wydłużyć czas przechowywania utrzymuje się obniżoną temperaturę, która ogranicza tempo wysychania pożywki, przez co zmienia dostępność składników pokarmowych i wody. Obniżenie temperatury do 4–7°C wydłuża nawet dwukrotnie czas pomiędzy odnowieniami kultury. Metoda ma jednak negatywny wpływ na niektóre gatunki i nie jest dla nich zalecana, szczególnie dla grzybów termofilnych. Podobnie dla Oomycetes, które zaleca się przeszczepiać co 6 miesięcy. Niestety, kultury przechowywane pod olejem stopniowo adaptują się do warunków i zagraża im powstawanie spontanicznych mutacji, które mogą zdominować kulturę (Smith i Onions 1994). Od dziesięcioleci stosowane są metody nie wymagające drogich środków technicznych. Izolaty utrzymywane są nie tylko pod warstwą oleju mineralnego, także w sterylnej wodzie oraz w szeregu nośników: perlicie, bi-



Fot. 2. Kolekcja Mikroorganizmów Patogenicznych dla Roślin Uprawnych Instytutu Ochrony Roślin – PIB. Izolaty grzybów na pożywkach agarowych zabezpieczonych olejem mineralnym (A. Pukacka)

Photo 2. Microbial Collection of Plant Pathogens Institute of Plant Protection – NRI. Fungi on solid media under mineral oil (A. Pukacka)

bule, glebie lub piasku, żelu krzemionkowym i substratach organicznych: skolonizowanych ziarniakach zbóż, drewnie, słomie, organach roślinnych, porażonych owadach (Smith i Onions 1994; Nakasone i wsp. 2004; Homolka 2013).

Izolaty można przechowywać w sterylnej wodzie destylowanej w formie zawiesiny zarodników i grzybnii w pokojowej temperaturze (Castellani 1963). Borman i wsp. (2006) przedstawili wyniki przechowywania tą metodą kolekcji 176 izolatów dermatofitów należących do 45 gatunków w ciągu aż do 20 lat. Utrzymywała się u nich wysoka przeżywalność wynosząca 90%. Co ciekawe, czas przechowywania nie miał na nią decydującego wpływu. Podobne wyniki przeżywalności uzyskali inni badacze (Hartung de Capriles i wsp. 1989; Qiangqiang i wsp. 1998). Zróżnicowanie przeżywalności należy raczej przypisywać cechom gatunkowym lub indywidualnym izolatów. Może też być ono związane ze stanem fizjologicznym zależnym od wieku kultury wykorzystanej do sporządzenia inokulum. Wysokiej żywotności izolatów nie towarzyszy niestety zadowalająca stabilność cech morfologicznych obserwowana u 20% izolatów (Borman i wsp. 2006). Izolaty Oomycetes należy odnawiać co dwa lata, mimo to są narażone na utratę swoich właściwości (Smith i Onions 1994). Izolaty *Aspergillus* sp. przechowywane w destylowanej wodzie wykazywały pleomorfizm, natomiast te same izolaty w formie liofilizatu lub przechowywane w ciekłym azocie zachowały cechy wyjściowe (Borman i wsp. 2006).

Dążąc do wieloletniego zachowania kolekcji licznych izolatów bez potrzeby ich pracochłonnego odnawiania wykorzystuje się metody oparte na dehydratacji. Propagacyjne zarodniki konidialne, skleroty lub chlamydospyry są wyposażone w szereg naturalnych przystosowań, takich jak: pogrubione ściany czy wyższy udział suchej masy zapewniających przetrwanie. Ponieważ dehydratacja komórki radykalnie spowalnia metabolizm, przez dziesięciolecia korzystano więc z absorbentów. W glebie dobrze przeżywają gatunki rodzajów *Fusarium* nawet i dekadę (Windels i wsp. 1993), *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Circinella*, *Penicillium* (Smith i Onions 1994). Po ożywieniu wiele kultur nie powtarza cech wyjściowych izolatów, mimo że zachowują żywotność nawet do 20 lat. Innym desykantem jest żel krzemionkowy, w którym zarodnikujące kultury gatunków należących do Ascomycota (Clavicipiales, Diaporthales, Dothideales, Eurotiales, Heliotiales, Hypocreales, Pezizales, Sordariales, Sphaeriales) i grzybów mitosporowych (Coelomycetes, Hyphomycetes) przechowywane 7–18 lat w większości zachowały żywotność i cechy morfologiczne. Metody tej nie można zastosować dla grzybów niezarodnikujących lub posiadających delikatne zarodniki, także dla Oomycetes np. gatunków *Phytophthora* czy *Pythium* (Smith i Onions 1994).

Szczególnym problemem jest zabezpieczenie kultur Basidiomycota (z wyjątkiem drożdży), które w warunkach *in vitro* wytwarzają tylko grzybnie. Wegetatywna grzybnia wykazuje wrażliwość na warunki środowiskowe i nie moż-

na jej liofilizować (Homolka 2013). Najprostszą metodą jest więc sukcesywne jej przeszczepianie, a najwygodniejszą zamrażanie w ciekłym azocie. Patogeny drzew można zachować w kawałkach zasiedlonego drewna. Zarodniki podstawkowe zebrane w naturalnym środowisku z owocników, poddaje się liofilizacji. Również pozostałe metody przechowywania są bardziej skuteczne w odniesieniu do zarodników niż do mycelium (Smith i Onions 1994). Problematicznymi gatunkami w przechowywaniu są grzyby rdzawnikowe, będące pasożytami obligatoryjnymi. Rozwiązaniem jest ich konserwacja w ciekłym azocie w formie porażonych fragmentów rośliny lub zawiesiny zarodników. Podobnie główńiowce (*Ustilaginales*), które na sztucznych podłożach rosną bardzo słabo. Ich zarodniki można także liofilizować (Smith i Onions 1994).

Problem trwałego, długoletniego zabezpieczenia licznych izolatów rozwiązano w połowie lat 40-tych XX wieku (Raper i Alexander 1945) upowszechniając proces liofilizacji. Ta metoda również nie jest pozbawiona ograniczeń. Może być stosowana w przypadku kultur zarodnikujących, a więc poza zasięgiem pozostawia organizmy niewytwarzające zarodników w kulturach *in vitro*, takie jak *Phytophthora* czy *Pythium* oraz utrzymywane w kolekcjach *in vitro* Basidiomycota. Pobrane w sterylnych warunkach zarodniki poddaje się działaniu krioprotektanta, mrozi i w podciśnieniu dokonuje procesu sublimacji. Szczelnie zamknięty liofilizat o wilgotności 1–2% można przechowywać bardzo długo (fot. 3). Przechowywanie tak zabezpieczonych izolatów jest bardzo tanie. Liczne gatunki zachowują wysoką żywotność, często osiągającą 100%, a ich przechowywanie nie jest zagrożone zakażeniem (Smith i Onions 1994).

W naturalnych warunkach organizmy przeżywające zimę, szczególnie te z obszarów arktycznych i borealnych uaktywniają swoje przystosowanie do przetrwania temperatur poniżej 0°C. Służy temu gromadzenie w komórkach substancji, takich jak cukry, szczególnie sacharoza i trehaloza oraz poliole arabitol i glicerol (których obecność przyczynia się do obniżenia punktu krzepnięcia), lipidy i zapobiegające zamrażaniu białka AFP (Smith 1993; Robinson 2001). Temperatura jest pierwszorzędny czynnikiem warunkującym procesy metaboliczne na poziomie komórkowym. Wraz z jej obniżeniem metabolizm komórkowy może zwalniać aż do jego zatrzymania, a także przy ekstremalnie niskich temperaturach doprowadzić do śmierci komórki (Chian 2010).



Fot. 3. Ampułki zliofilizowanych kultur grzybów (A. Pukacka)
Photo 3. Fungi freeze-dried ampoules (A. Pukacka)

Procesy zachodzące w warunkach naturalnych występują także przy zastosowaniu metod kriogenicznych. Krystalizujący w komórce lód tworzy się z samej wody i w ten sposób prowadzi do zagęszczenia roztworu komórkowego. Powoduje szereg zjawisk, takich jak zmiany pH, przewodzenia ładunków elektrycznych, oddziaływania jonów, wpływa na stabilność białek, zaburza równowagę osmotyczną, co jest zjawiskiem niekorzystnym dla wewnątrzkomórkowych procesów biochemicznych. Ostatecznie, wraz ze wzrostem rozmiaru kryształów lodu pojawia się zagrożenie ich mechanicznego uszkodzenia. Zastosowanie krioprotektanta, który modyfikuje te procesy ma na celu zapobieżenie śmierci komórki. Nadal następuje zagęszczenie treści komórki, krystalizacja przebiega inaczej, gdyż obniżony jest punkt krzepnięcia, dzięki czemu komórka zyskuje większe szanse przeżycia. Do zamrożenia komórki musi dojść jeszcze przed zabójczą dehydratacją w taki sposób, aby zamarzła równomiernie cała jej treść przed związaniem wody przez krystalizujący lód. Przy wyborze krioprotektanta konieczne jest uwzględnienie jego toksyczności. Jego zadaniem jest częściowa dehydratacja komórki, której służy wstępne kondycjonowanie prób przy obniżonej temperaturze. Wśród krioprotektantów wyróżniamy substancje przenikające z łatwością przez błonę komórkową, takie jak glicerol i dwumetylosulfotlenek (DMSO) lub glikol polietylenowy. Do drugiej grupy, chroniącej protoplast z zewnątrz należą: sacharoza, laktoza, glukoza, mannitol, sorbitol, dekstran, poliwinylpiperolidon i skrobia hydroksyetylowa (Ohmasa i wsp. 1992; Chian 2010). Przy bardzo szybkim tempie obniżania temperatury, w którym nie dojdzie do nukleacji koniecznej do zainicjowania powstawania kryształów, dochodzi do zestalenia wody i jej roztworu bez krystalizacji (Chian 2010). Powyższe zjawisko witrifikacji jest jedną z nowszych, choć rzadziej stosowanych metod krioprezervacji mikroorganizmów.

Metody kriogeniczne zabezpieczają nie tylko wieloletnią przeżywalność izolatów, ale także niezmiennosc ich cech biologicznych, w tym genetycznych i fizjologicznych. Kluczowe znaczenie odgrywa w nich skala obniżenia temperatury poniżej 0°C, zwykle –20°C, –80°C (zamrażarki niskotemperaturowe) (fot. 5) lub –150°C (opary ciekłego azotu) i –196°C (ciekły azot). Podobnie jak w przypadku liofilizacji kluczowym elementem procesu jest taki dobór warunków, aby tworzące się kryształy lodu nie spowodowały mechanicznego uszkodzenia komórek. Wielkość tworzących się dwójłomnych kryształów zależy głównie od tempa zamrażania i składu soku komórkowego. Kryształy tworzą się zarówno na zewnątrz, jak i wewnątrz komórki. Rekrystalizacja lodu ustaje w temperaturze –139°C (Homolka 2013). Przechowywanie kultur w temperaturze od –20°C (w niedrogich, łatwo dostępnych zamrażarkach) do –40°C może być rozważane dla krótkotrwałego przechowywania. W dłuższych okresach zmniejsza się ich przeżywalność, a także kultura zmienia lub traci swoje charakterystyczne właściwości biologiczne. *Penicillium expansum* wykazywało zmiany morfologiczne już w pierwszym

roku przechowywania w -20°C . Podobnie izolaty rodzaju *Fusarium*, które traciły zabarwienie oraz żywotność (Smith i Onions 1994).

Podstawowym założeniem krioprezerwacji jest dążenie do zatrzymania metabolizmu, a tym samym zapobieganie zmianom zachodzącym w komórkach podczas długotrwałego przechowywania z wykorzystaniem niskich temperatur. W temperaturze około -80°C metabolizm komórkowy jest minimalny. Zdolność gatunków do zachowania żywotności w warunkach kriogenicznych jest zróżnicowana. Najtrudniejsze do utrzymania są gatunki należące do rodzajów *Brevilegnia*, *Dictyuchus*, *Phytophthora* oraz pewne gatunki *Achlya* i *Saprolegnia*. Niektóre gatunki, których żywotność badana wkrótce po zamrożeniu jest zachowana, tracą ją gwałtownie po kilku, zwykle 5–7 latach przechowywania. Należą do nich liczne Basidiomycota, a także *Rhizoctonia solani* (Ozerskaya i wsp. 2013). Gatunki rodzaju *Saprolegnia* (Oomycetes): *S. parasitica*, *S. australis*, *S. ferax* przechowywane na nasionach konopi i krążkach stałej pożywki do 12 miesięcy w temperaturze -80°C zachowały żywotność dla nie mniej niż dwóch trzecich prób. Ich przeżywalność była zróżnicowana w zależności od gatunku i spadała wraz z wydłużaniem okresu przechowania (Eszterbauer i wsp. 2020). Wykazano, że dla optymalnego przechowania Oomycetes (*Phytophthora*, *Pythium*) i niezarodnikujących grzybów rodzajów *Sclerotinia* i *Rhizoctonia* najlepsze warunki stwarza wstępne kondycjonowanie prób w 4°C przed ich mrożeniem w -80°C . Próby przechowywano do 12 miesięcy i w tym czasie ich przeżywalność wynosiła minimum 70%. Dla ożywiania prób najlepsze warunki stwarzała temperatura 37°C (Juarros i wsp. 1993). Po 5 latach przechowywania w -80°C na koralikach Microbank beads *Rhizoctonia*, *Waitea* i *Ceratobasidium* zachowały żywotność, podczas gdy te same izolaty w 4°C utraciły żywotność już po 24 miesiącach, podobnie jak te przechowywane także w -80°C jednak na agarowych krążkach (Lakshman i wsp. 2018). Gatunki pochodzące z rejonów tropikalnych i subtropikalnych źle przeżywają w metodach kriogenicznych np. *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Elliott 2005). W innym doświadczeniu spośród Oomycetes, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota oraz grzybów mitosporowych, przechowywanych na trocinach w 10% glicerolu po gwałtownym zamrożeniu do -85°C po 21 miesiącach odzyskano ponad 90% żywych izolatów, a większość z nich przeżyła także 5-letni okres (Kitamoto i wsp. 2002). Ito i Nakagiri (1996) odzyskali 88% żywych izolatów po 15-letnim okresie przechowania. W trakcie wieloletnich badań prowadzonych w Kolekcji Organizmów Patogenicznych Instytutu Ochrony Roślin – PIB zaobserwowano dobrą przeżywalność na przestrzeni 10 lat licznych gatunków Ascomycetes (Łukaszewska-Skrzypniak i wsp. 2012). Stwierdzono także zachowanie patogeniczności po 8 latach przechowywania w -80°C gatunków *Alternaria radicina* i *Colletotrichum gloeosporioides* (fot. 4) (Łukaszewska-Skrzypniak i wsp. 2014).



Fot. 4. Kultury *Colletotrichum gloeosporioides* i *Alternaria radicina* wykazujące patogeniczność po 8 latach przechowywania w -80°C (N. Łukaszewska-Skrzypniak)

Photo 4. *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria radicina* cultures retaining their pathogenicity after 8 years cryopreservation at -80°C (N. Łukaszewska-Skrzypniak)



Fot. 5. Próby przechowywane w temperaturze -80°C (A. Pukacka)

Photo 5. Cryostorage of samples at -80°C (A. Pukacka)

Jak wspomniano powyżej, w przechowywaniu grzybów niewytwarzających zarodników w warunkach *in vitro* wiele metod jest zawodnych, także u Basidiomycota. Ze względu na inaktywację metabolizmu u grzybów podstawkowych najlepsze wyniki daje krioprezerwacja (Hubálek 2003). Hodowlę mycelium z sukcesem prowadzi się na podłożach, takich jak perlit lub ziarniak z bóż i w takiej formie, na skolonizowanym podłożu są zamrażane. W grupie 21 izolatów – 13 *Agaricus* spp. i 8 innych gatunków (*Lentinula*, *Lentinus*, *Macrocybe*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*), na zaszczerpionych ziarniakach pszenicy, zamrożonych w temperaturze -80°C i przechowywanych w okresie 2 i 5 lat, badano przeżywalność porównując skuteczność przy zastosowaniu krioprotektanta (4% glukoza) i bez niego. Przeżywalność była wysoka, średnio na poziomie 80%, jednak w trzech przypadkach spadła do zaledwie 7%, wszystkie znajdowały się w grupie dłuższego, 5-letniego przechowywania (Zaghi Junior i wsp. 2020).

Działanie temperatury ciekłego azotu może przyczynić się zarówno do zniszczenia żywej komórki w przeciągu sekund, jak i jej utrwalenia na lata, a możliwe, że i na setki lat (Chian 2010). W temperaturze -139°C metabolizm ustaje, a więc ustępuje przyczyna sprawcza zmienności cech organizmu. Przyjmując to założenie, dla większości kultur czas

przechowywania nie powinien mieć praktycznie żadnego wpływu. Przeżywalność i stabilność cech izolatów przechowywanych w kolekcjach w ciekłym azocie lub jego oparach jest bardzo wysoka (fot. 6). Dla bardzo wielu gatunków jest zbliżona do 100%, szczególnie należących do Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota (Smith i Onions 1994). Webb i wsp. (2011) zbadali przeżywalność i patogeniczność 106 izolatów *Rhizoctonia solani* przechowywanych aż do 10 lat na ziarniakach jęczmienia w oparach ciekłego azotu. Z czasem przeżywalność się pogarszała, natomiast wirulencja utrzymywała się na wyjściowym poziomie.



Fot. 6. Naczynia Dewara z próbkami przechowanymi w ciekłym azocie (N. Łukaszevska-Skrzypniak)

Photo 6. Dewar vessel with samples in liquide nitrogen (N. Łukaszevska-Skrzypniak)

W naturalnych ekosystemach, szczególnie leśnych, dla interakcji pomiędzy rośliną a glebą kluczową rolę odgrywają grzyby mikoryzowe. Polega ona na udostępnianiu roślinie glebowych składników pokarmowych w czym pośredniczą strzępki grzybni (Smith i Read 2008). Również w procesach biotechnologicznych znalazły zastosowanie grzyby tworzące ektomikoryzę. Zachowanie ciągłości badań wymaga opracowania metod ich przechowywania. Właśnie ta grupa spośród wszystkich Basidiomycetes wykazuje najniższą żywotność podczas krioprezerwacji (Tan i van Ingen 2004). Nie tworzą one konidiów, a na sztucznych podłożach sporadycznie wytwarzają organy rozmnażania. Wegetatywne strzępki są bardziej od zarodników wrażliwe na warunki zamrażania (Tan i wsp. 1991; Smith 1993). Zróżnicowane gatunki tych grzybów badane pod kątem żywotności mrożono w temperaturze -139°C , aby przechowywać je w okresie do 6 miesięcy. Porównano dwie metody, w pierwszej grzybnie hodowano bezpośrednio w krioprobówkach na zmodyfikowanej pożywce Friesa, w drugiej pobierana była do słomek. W charakterze krioprotektanta zastosowano 10% glicerol. Dla niemal wszystkich gatunków wyższą żywotność uzyskano dla wariantu bez słomek. Ich żywotność była zróżnicowana, spośród 98 izolatów, 66 wykazało 100%, a tylko

5 nie przeżyło (Crahay i wsp. 2013). W toku koewolucji wytworzyły się złożone relacje pomiędzy organizmami. Do ciekawszych należy zależność zdolności kiełkowania nasion storczyków od występowania grzybów mikoryzowych. Obecnie, gdy wiele gatunków storczyków zagrożonych jest wyginięciem w swoich naturalnych siedliskach zabezpieczenie zasobu ich nasion musi uwzględniać ten wysublimowany mechanizm. Najtrwalsze efekty daje ich mrożenie w ciekłym azocie (Batty i wsp. 2001).

Badania naukowe prowadzone nad patogenami obligatornymi zyskałyby techniczne ułatwienie, gdyby można było uniknąć transferowania ich kolejno na żywe rośliny lub ich organy. Problem ten dotyczy organizmów biotroficznych głównie powodujących takie choroby, jak rdze, mączniaki prawdziwe, śniecie i głownie. Tradycyjnie przechowuje się je w postaci zarodników odtwarzając warunki im sprzyjające, takie jak w naturalnym środowisku. Z czasem jednak ich żywotność zanika, tymczasem dla celów naukowych i konserwacji *ex situ* wskazane byłoby wydłużenie tego okresu. Czynnikiem sprzyjającym jest obniżenie temperatury do -80°C lub poniżej -140°C (Smith i Onions 1994). Grzyby rdzawnikowe wytwarzają trzy typy zarodników: uredinospory, teliospory i bazydiospory, z których tylko uredinospory dosyć łatwo poddają się krioprezerwacji w ciekłym azocie bez krioprotektanta. Metodę przechowywania uredinospor wykorzystującą niskie temperatury do zaindukowania fazy spoczynkowej opracowali Loegeering i Harmon (1961). Dla *Puccinia psidii* krioprezerwacja wydłużyła żywotność części uredinospor do 150 dni, podczas gdy bez ingerencji w ciągu 30 dni spada ona do 1–2% (Salustiano i wsp. 2008).

Zarodniki niektórych gatunków np. *Puccinia graminis* są wrażliwe na zawilgocenie i przed mrożeniem należy poddać je osuszeniu przez usunięcie wilgoci w podciśnieniu (Cunningham 1973). Ze względu na wysoką specjalizację grzybów rdzawnikowych względem gospodarza są one rozpatrywane jako potencjalny środek ochrony biologicznej, szczególnie w stosunku do ekspansywnych chwastów będących gatunkami inwazyjnymi. Przykładem służy *Puccinia spegazzinii* (Basidiomycota, Uredinales) porażająca *Mikania micrantha* (Asteraceae), wyjątkowo uciążliwe pnącze pochodzące z Ameryki, które stanowi zagrożenie dla naturalnych i rolniczych ekosystemów tropikalnych rejonów południowo-wschodniej Azji. W przeciwieństwie do innych rdzy, nie wytwarza ona uredinospor, mimo to podjęto badania nad krioprezerwacją w oparach ciekłego azotu teliospor i bazydiospor z wykorzystaniem 10% glicerolu w roli protektanta. Nie zdołano utrzymać patogeniczności zarodników, a w większości przypadków także ich żywotności. Jednakże przy zastosowaniu powolnego mrożenia w tempie $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rewitalizowane uredinospory wytwarzały sterigmy i bazydiospory, a więc były żywotne, co już jest sukcesem (Ryan i Ellison 2003). Grzyby śnieciowate również zaliczamy do patogenów bezwzględnych, choć jest możli-

we uzyskanie grzybni na laboratoryjnych pożywkach, jednak zarodnikowanie poza żywym gospodarzem należy do rzadkości (Hoffmann 1982). Na roślinach zbóż w miejscu ziarniaka powstają sorusy wypełnione teliosporami. Można je mrozić w ciekłym azocie zabezpieczone 10% roztworem glicerolu. Tak przechowana *Tilletia caries* zachowuje patogeniczność do kolejnego sezonu wegetacyjnego. Kontrolna kombinacja z zarodnikami przechowanymi w temperaturze pokojowej dawała większy udział porażonych kłosów, jednak takie zarodniki tracą z czasem zdolności infekcyjne (Kubiak i wsp. 2011).

Nawet w obrębie dobrze reagujących gatunków istnieją izolaty tzw. „recalcitrant”, które tracą żywotność w trakcie przechowywania. Dla niektórych taksonów mrożenie w ciekłym azocie, które jest bardzo dobrą metodą, nie jest wystarczające np. dla Oomycetes, Chytridiomycetes (Smith i Onions 1994). Do uszkodzeń komórkowych dochodzi także w trakcie rewitalizacji kultury. Wraz ze wzrostem temperatury zachodzi rekryształizacja lodu (Smith i Onions 1994). Woda przechodząc w stan ciekły zmienia gwałtownie stężenie soku komórkowego ze wszystkimi tego negatywnymi konsekwencjami. Raz rozmrożonych prób nie zaleca się mrozić ponownie, gdyż ich żywotność znacząco pogarsza się (Nakasone i wsp. 2004).

Mimo licznych metod przechowywania, żadnej z nich nie możemy wskazać jako najlepszej. Metoda wykorzystująca ciekły azot posiada bardzo liczne zalety: nie jest ograniczona czasem, zabezpieczenie własności biologicznych jest najlepsze, większość gatunków dobrze przeżywa niezależnie od tego, czy izolat zarodkuje, jednak nie jest to metoda uniwersalna. Ogromna liczebność gatunków grzybów przekłada się na zróżnicowanie ich cech i dalej na techniczne trudności w doborze metody. Wybór ten ogromnie ułatwia klucz właściwego doboru protokołu dla przechowywania

grzybów, także drożdży. Uwzględnia on kryteria podejmowania decyzji podzielone na 2 grupy: o charakterze gatunkowym (zdolność do wytwarzania zarodników konidialnych w warunkach *in vitro* czy struktur generatywnych, przynależność do grupy grzybów mikoryzowych, zdolność do wzrostu na syntetycznych podłożach lub naturalnych substratach) oraz o charakterze techniczno-ekonomicznym (okres przechowywania, znaczenie ekonomiczne izolatu, dostępność wyposażenia technicznego) (Ryan i wsp. 2000). Warto każdy z izolatów zabezpieczać kilkoma różnymi metodami, a przynajmniej dwiema, kierując się takimi kryteriami, jak pracochłonność, koszt, zachowanie cech biologicznych.

Przy tak dużym biologicznym zróżnicowaniu organizmów patogenicznych zabezpieczenie dobrze opisanych materiałów dla celów badawczych wymusza tworzenie wyspecjalizowanych kolekcji. Zróżnicowanie licznych gatunków występuje nie tylko na poziomie stref klimatycznych, ale także regionów. W 1996 roku w Instytucie Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu ufundowana została przez ówczesne Ministerstwo Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej Kolekcja Mikroorganizmów Patogenicznych dla Roślin Uprawnych. Gromadzi ona głównie organizmy patogeniczne pochodzące z terenu Polski, które zabezpieczane są dwiema uzupełniającymi się metodami. Obecnie poza bakteriami przechowywanych jest około 2000 izolatów grzybowych, które zostały pozyskane bądź w ramach prac własnych Kolekcji lub prac Kliniki Chorób Roślin, bądź pozyskanych od zewnętrznych depozytariuszy. Kolekcja przyjmuje do swoich zasobów izolaty na zasadach depozytu, wymiany oraz współpracy komercyjnej. Jednostka prowadzi także badania nad długotrwałym przechowywaniem mikroorganizmów ze szczególnym uwzględnieniem metod kriogenicznych (Sadowska i wsp. 2011).

Literatura / References

- Batty A.L., Dixon K.W., Brundrett M.C., Sivasithamparan K. 2001. Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany* 49 (5): 619–628. DOI: 10.1071/BT01029
- Borman A.M., Szekely A., Campbell C.K., Johnson E.M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 161 (6): 361–368. DOI: 10.1007/s11046-006-0023-z
- Castellani A. 1963. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 20: 1–6. DOI: 10.1007/BF02054872
- Chian R.-C. 2010. Cryobiology: an overview. s. 1–9. W: *Fertility Cryopreservation* (R.-C. Chian, P. Quinn, red.). Cambridge University Press, 38 ss. DOI: 10.1017/CBO9780511730207.002
- Crahay C., Declerck S., Colpaert J.V., Pigeon M., Munaut F. 2013. Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. *Fungal Biology* 117: 103–111. DOI: 10.1016/j.funbio.2012.12.003
- Cunningham J.L. 1973. Preservation of rust fungi in liquid nitrogen. *Cryobiology* 10 (5): 361–363. DOI: 10.1016/0011-2240-(73)90058-8
- Elliott M.L. 2005. Survival, growth and pathogenicity of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* with different methods of long-term storage. *Mycologia* 97 (4): 901–907. DOI: 10.3852/mycologia.97.4.901
- Eszterbauer E., Hardy T., Rónai Z., Sipos D., Zsigmond G. 2020. Cryopreservation of three *Saprolegnia* species (Oomycota): Preliminary evidence for the long-term archiving of water mould species. *Fungal Biology* 124 (7): 682–687. DOI: 10.1016/j.funbio.2020.04.005

- Gupta V.K., Tuohy M.G., Ayyachamy M., Turner K.M., O'Donovan A. (red.) 2013. Laboratory Protocols in Fungal Biology. Current Methods in Fungal Biology. Springer, New York, 629 ss. ISBN 978-1461423553. DOI: 10.1007/978-1-4614-2356-0
- Hartung de Capriles C., Mata S., Middelveen M. 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. Mycopathologia 106 (2): 73–79. DOI: 10.1007/BF00437084
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research 105 (12): 1422–1432. DOI: 10.1017/S0953756201004725
- Hoffmann J.A. 1982. Bunt of wheat. USDA-ARS Crops Research Laboratory, Logan, UT. Plant Disease 66: 979. DOI: 10.1094/PD-66-979
- Homolka L. 2013. Methods of cryopreservation in fungi. s. 9–16. W: Laboratory Protocols in Fungal Biology. Current Methods in Fungal Biology (V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy, K.M. Turner, A. O'Donovan, red.). Springer, New York, 629 ss. ISBN 978-1461423553. DOI: 10.1007/978-1-4614-2356-0
- Hubálek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 46 (3): 205–229. DOI: 10.1016/s0011-2240(03)00046-4
- Ito T., Nakagiri A. 1996. Viability of frozen cultures of basidiomycetes after fifteen-year storage. Microbiology and Culture Collections 12 (2): 67–78.
- Juarros E., Tortajada C., García M.D., Uruburu F. 1993. Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80 degrees C: effects of different freezing-thawing methods. Microbiologia 9 (1): 28–33.
- Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S., Yamanaka K. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. Mycoscience 43: 0143–0149. DOI: 10.1007/s102670200021
- Kubiak K., Pukacka A., Rataj-Guranowska M. 2011. Przechowywanie w ciekłym azocie baloników pszenicy wypełnionych teliosporami *Tilletia caries* (DC.) Tul. w kolekcji mikroorganizmów patogenicznych dla roślin. [Liquid nitrogen storage of wheat sori with teliospores of *Tilletia caries* (DC.) Tul. in plant pathogens collection]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 51 (1): 58–61.
- Lakshman D.K., Singh V., Camacho M.E. 2018. Long-term cryopreservation of non-spore-forming fungi in Microbank™ beads for plant pathological investigations. Journal of Microbiological Methods 148: 120–126. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.04.007
- Loegering W.Q., Harmon D.L. 1961. A long term experiment for preservation of urediniospores of *Puccinia ramis tritici* in liquid nitrogen. Plant Disease Reporter 45: 284–385.
- Łukaszewska-Skrzypniak N., Pukacka A., Sadowska K., Stępniewska-Jarosz S., Tyrakowska M., Rataj-Guranowska M. 2014. Biological features of selected *Alternaria* and *Colletotrichum* species after 8 years of cryopreservation at -80°C. W: Book of abstracts. 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology “Healthy plants – healthy people”. Kraków, 8–13 September 2014: 203.
- Łukaszewska-Skrzypniak N., Pukacka A., Sadowska K., Tyrakowska M., Rataj-Guranowska M. 2012. Przeżywalność wybranych gatunków grzybów w warunkach długotrwałego przechowywania w -80°C. Streszczenia 52. Sesji Naukowej IOR – PIB, Poznań, 9–10 lutego 2012: 389.
- Mueller G.M., Schmit J.P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? Biodiversity and Conservation 16: 1–5. DOI: 10.1007/s10531-006-9117-7
- Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S.C. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. s. 37–47. W: Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods (G.M. Muller, G. Bills, M.S. Foster, red.). Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Ohmasa M., Abe Y., Babasaki K., Hiraide M., Okabe K. 1992. Preservation of cultures of mushrooms by freezing. Transactions of the Mycological Society of Japan 33 (4): 467–479.
- Onions A.H.S. 1971. Preservation of fungi. s. 113–115. W: Methods in Microbiology (4) (C. Booth, red.). Academic Press, New York, London, 794 ss. ISBN 9780080860305.
- Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Eremina S.S., Vasilenko A.N., Chigineva N.I. 2013. Long-term preservation of fungal cultures in all-russian collection of microorganisms (VKM): protocols and results. s. 17–65. W: Laboratory Protocols in Fungal Biology. Current Methods in Fungal Biology (V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy, K.M. Turner, A. O'Donovan, red.). Springer, New York, 629 ss. ISBN 978-1461423553. DOI: 10.1007/978-1-4614-2356-0
- Qiangqiang Z., Jiajun W., Li L. 1998. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. Mycoses 41 (5–6): 255–257. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1998.tb00334.x
- Raper K.B., Alexander D.F. 1945. Preservation of molds by the lyophil process. Mycologia 37 (4): 499–525. DOI: 10.1080/00275514.1945.12024010
- Robinson C.H. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. New Phytologist 151 (2): 341–353. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00177.x
- Ryan M.J., Ellison C.A. 2003. Development of a cryopreservation protocol for the microcyclic rust-fungus *Puccinia spegazzinii*. CryoLetters 24 (1): 43–48.
- Ryan M.J., Smith D., Jeffries P. 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16: 183–186. DOI: 10.1023/A:1008910006419
- Sadowska K., Pukacka A., Łukaszewska-Skrzypniak N., Rataj-Guranowska M. 2011. Metody krioprezewacji bakterii i grzybów stosowane w Banku Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności. Streszczenia Sympozjum Naukowego „Fitopatologia: zdrowe rośliny – zdrowi ludzie”. Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne, Bydgoszcz, 20–22 września 2011: 117.
- Salustiano M.E., Pozza E.A., Ferraz Filho A.C., Castro H.A. 2008. Viability of *Puccinia psidii* urediniospores stored in different environments. Tropical Plant Pathology 33 (4): 313–316. DOI: 10.1590/S1982-56762008000400009
- Sharma B., Smith D. 1999. Recovery of fungi after storage for over a quarter of a century. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15: 517–519. DOI: 10.1023/A:1008959521962
- Smith D. 1993. Tolerance to freezing and thawing. s. 145–171. W: Stress Tolerance of Fungi (D.H. Jennings, red.). Marcel Dekker Inc., New York, 360 ss. ISBN 978-0824790615.
- Smith D., Onions A.H.S. 1994. Preservation and Maintenance of Living Fungi. International Mycological Institute, UK. CABI Publishing, 132 ss. ISBN 978-0851989020.

- Smith S.E., Read D.J. 2008. Fungal symbioses in lower land plants. s. 507–521. W: Mycorrhizal Symbiosis 3 ed. Academic Press, London. DOI: 10.1016/B978-012370526-6.50016-7
- Tan C.S., Stalpers J.A., van Ingen C.W. 1991. Freeze-drying of fungal hyphae. *Mycologia* 83 (5): 654–657. DOI: 10.1080/00275514.1991.12026065
- Tan C.S., van Ingen C.W. 2004. Preservation of fungi and yeasts. s. 277–297. W: Life in the Frozen State (B. Fuller, N. Lane, E. Benson, red.). CRC Press, Boca Raton. DOI: 10.1201/9780203647073.ch8
- von Arx J.A., Schipper M.A.A. 1978. The CBS fungus collection. *Advances in Applied Microbiology* 24: 215–236. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70641-5
- Webb K.M., Hill A.L., Laufmann J., Hanson L.E., Panella L. 2011. Long-term preservation of a collection of *Rhizoctonia solani* using cryogenic storage. *Annals of Applied Biology* 158 (3): 297–304. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2011.00464.x
- Windels C.E., Burnes P.M., Kommedahl T. 1993. *Fusarium* species stored on silica gel and soil for ten years. *Mycologia* 85 (1): 21–23. DOI: 10.2307/3760472
- Zaghi Junior L.L.Z., Bertéli M.B.D., de Freitas J.D.S., de Oliveira Filho O.B.Q., Lopes A.D., Ruiz S.P., do Valle J.S., Linde G.A., Colauto N.B. 2020. Five-year cryopreservation at –80°C of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique. *Journal of Microbiological Methods* 176: 106030. DOI: 10.1016/j.mimet.2020.106030