

Undersøgelser over goldfodsygesvampen *Ophiobolus graminis* Sacc.

II. Undersøgelser over svampens cellulolytiske og proteolytiske evne

Ved B. Dam Christensen

807. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende undersøgelse er et led i en forsøgsrække over *Ophiobolus graminis* foretaget ved Statens plantepatologiske Forsøg, Lyngby i årene 1965-67.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Indledning

I fortsættelse af tidligere refereret undersøgelse over *Ophiobolus graminis*' virulens over for korn (Christensen, 1967) er nærværende undersøgelse foretaget for at konstatere, om der sker nogen ændring med *O. graminis* isolaternes cellulose- og proteinnedbrydende evne, når disse dyrkes på gær-agar gennem længere tid.

Materialer og metoder

Til undersøgelsen over *O. graminis*' cellulolytiske evne anvendtes 50 forskellige isolater af svampen isoleret fra stråprøver indsendt til Statens plantepatologiske Forsøg, Lyngby, til bedømmelse for angrebsgrad af fodsyge. Efter rencydning af *O. graminis* isolaterne opbevarede disse som stamkulturer på gær-agar.

Sammensætning af gær-agar:

Afkog af 200 g kartofler

20 g glucose

20 g agar

3 g gær-ekstrakt

Vand til 1000 ml.

Teknik, anvendt ved isolering samt opbevaringsforhold, er tidligere beskrevet (Christensen, 1967).

Isolaternes alder varierede fra 0 til 60 mdr., og disse var tilfældigt udvalgte inden for hver aldersgruppe fra en større isolatsamling.

Metoden til bestemmelse af isolaternes cellulolytiske evne var en modifikation af en metode, tidligere beskrevet af Garrett (1966).

Undersøgelsen blev foretaget ved at sammenrulle et stykke filterpapir af mærket »Struers Filtre« med en diameter på 12,5 cm i »kræmmerhusform« og anbringe dette med spidsen nedad i et rørglas.

Derefter tilsattes 6,5 ml saltopløsning tilsat B-vitaminer pr. rørglas.

Saltopløsningen, der var fremstillet omtrent efter Garretts anvisning (1966), var sammensat således:

5 g NaNO_3

1 g K_2HPO_4

0,5 g MgSO_4 , 7 H_2O

1 mg Ferriammoniumcitrat

0,1 mg Thiamin

0,01 mg Biotin

0,05 mg gærekstrakt (ikke tilsat i Garretts forsøg)

Alt opløses i afioniseret vand så der i alt er 1 liter.

Efter påfyldning af saltopløsningen og tilpropning af rørglassene autoklaveredes disse i 45 min. ved 1,5 atm.

Det nu færdige substrat podedes under sterile forhold ved at overføre et stykke (20 mm²) af stamkulturen og anbringe dette foroven inde i »kræmmerhuset«.

Reagensglasset så nu ud som vist i fig. 1:

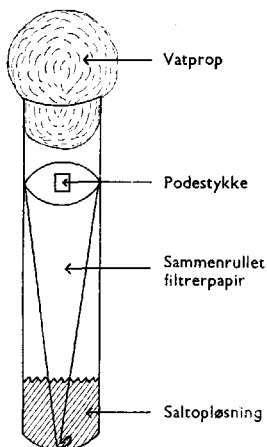


Fig. 1.

Der dannedes tre gentagelser af hvert isolat, og reagensglassene anbragtes ved 11° C.

Efter henholdsvis én, to og tre mdr.'s forløb blev én af gentagelserne udtaget. Filtrepapiret eller resterne deraf + podestykke og mycelium blev forsigtigt fjernet fra glassene og anbragt i et stativ til tørring i varmeskab i 2 timer ved 120° C.

Efter tørringen vejedes filtrepapir, podestykke og mycelium, og vægttabet beregnedes.

Der blev i undersøgelsen ikke gjort forsøg på at fradrage vægt af mycelium. Filtrepapirets reelle vægttab må derfor have ligget højere end angivet senere i beretningen (fig. 2).

Undersøgelsen over *O. graminis* isolaternes proteolytiske evne blev foretaget ved at pøde 60 tilfældigt udvalgte isolater fra samme samling som isolaterne anvendt ved undersøgelsen over *O. graminis*' cellulolytiske evne. Det benyttede væksts substrat bestod af kødvandsagar tilsat skummetmælk (ca. 15 ml pr. petriskål).

Substratet fremstilledes på følgende måde:

Skummetmælk: Skim Milk (dehydrat-	
ed), »Difco«	100 g
Afioniseret vand	1000 g
Kødvands-agar: Tryptose Blood Agar	
Base, »Difco«	33 g
Yeast extract, »Difco«	5 g
Afioniseret vand	1000 g

Skummetmælken og kødvandsagaren auto-

klaveredes i 20 min. ved 1 atm og sammenblandes umiddelbart inden brugen.

Mængden af skummetmælk udgjorde 10 pct. af kødvandsagaren.

Isolaterne overførtes først til malt-agar for ikke at overføre substrat med en høj enzymkoncentration fra stamkulturene.

Podestykker (20 mm²), udtaget under sterile forhold fra kanten af vækstzonen på malt-agaren, overførtes til midten af petriskåle med kødvandsagar tilsat skummetmælk.

Skålene henstilledes derefter ved 23° C. Substratet, der har en mælket farve på grund af den tilsatte skummetmælk, bliver, hvis det udsættes for proteinspaltende enzymer, gennemsigtigt (Long og Hammer, 1937).

Zonemålingen (diameteren af det gennemsigtige område målt i mm) blev foretaget efter 4 døgn's inkubation. Resultaterne af disse målinger er opstillet i fig. 3).

Resultater

Undersøgelsen over *O. graminis* isolaternes nedbrydning af filtrepapir (fig. 2) viste, at evnen til at nedbryde filtrepapir tiltog, jo længere

° Vægttab af filtrepapir

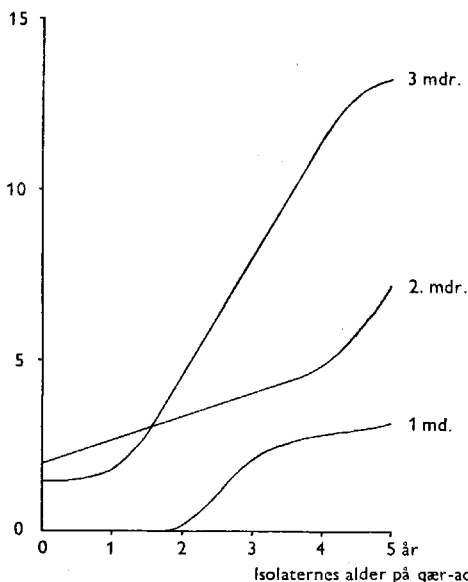


Fig. 2. Filtrepapirs vægttab efter podning med *O. graminis* isolater af varierende alder dyrket på gær-agar. Inkubationstid 1, 2 og 3 mdr. ved 11° C i drivhus.

isolaterne havde været opbevaret som stamkulturer på gær-agar ved stuetemperatur.

Den tilsvarende undersøgelse over den proteolytiske evne hos *O. graminis* viste, at evnen til at nedbryde protein i varierende afstand fra podestykket aftog ret hurtigt, men stabiliseredes efterhånden, når isolaterne dyrkedes på gær-agar gennem længere tid.



Fig. 3. Gennemsnitlig zones diameter efter podning med *O. graminis* på kødvandsagar tilsat skummetmælk. Inkubation: 4 døgn ved 23°C.

Diskussion og sammendrag

Undersøgelsen over *O. graminis*' cellulolytiske evne viste, at svampens evne til at nedbryde filtrerpapir tiltog, når isolaterne havde været dyrket på gær-agar gennem længere tid (fig. 2).

Andre undersøgelser har vist, at svampens patogenitet under tilsvarende dyrkningsforhold sænkes væsentligt (Christensen, 1967).

Dette tyder på, at *O. graminis* besidder evnen til at tilvænne sig de forhold, hvorunder den eksisterer; noget sådant har tidligere været på tale bl.a. med hensyn til svampens tilvænnning til en given kornart (Christensen, 1967).

Hvis et sådant forhold er en realitet, skulle det være muligt at forøge svampens patogenitet igen, når denne udsættes for dyrkningsforhold, som kræver noget sådant. Dette forhold er søgt klarlagt i en undersøgelse sideløbende med den her refererede (Christensen, 1968).

Undersøgelsen viste, at patogeniteten øgedes

over for alle de medtagne græsarter (10), blandt hvilke de fire kornarter indgik, ved podning på en enkelt art.

Der anvendtes som test-afgrøder vårformen af de fire kornarter, og undersøgelsen viste, at den stærkeste patogenitetsøgning af lavpatogene isolater tilsyneladende skete over for den kornart, hvorpå svampen havde været dyrket. Dette forhold gjaldt dog ikke for havre, hvilket sikkert skyldes dennes resistens mod den her i landet normalt forekommende varietet af *O. graminis*.

Undersøgelsen over *O. graminis*' proteolytiske effekt viste, at svampens evne til at nedbryde protein i skummetmælk aftog stærkt inden for det første år, hvor isolaterne opbevarede som stamkulturer på gær-agar.

Efter et års forløb stabiliseredes evnen til at nedbryde protein, hvilket kurven, som angiver gennemsnitsværdierne, viser (fig. 3).

Det var i denne forbindelse bemærkelsesværdigt at konstatere, at *O. graminis* isolaternes patogenitet over for rug (Petkus Vårrug), når denne dyrkedes i Perlite i væksthush, faldt jævnt med et forløb angivet i kurveform omtrent som det i fig. 3 angivne (Christensen, 1967), når isolaterne opbevarede under samme forhold som isolaterne anvendt i undersøgelsen over svampens proteolytiske evne.

Om sænkningen i svampens patogenitet skyldes eller er direkte sammenkoblet med den aftagende proteolytiske evne, må dog indtil videre forblive en antagelse og kræver yderligere undersøgelser for at blive tilfredsstillende belyst.

Summary

Investigation of the cellulytical and proteolytical ability of Ophiobolus graminis Sacc.

The investigation was made to examine as to whether the cellulytical ability of the fungus was changed during a storage period when the fungus was grown on yeast-agar (21° C).

The investigation showed that the ability of breaking down filter-paper was increased during a storage-period from 0 to 5 years (figure 2).

The investigation of the proteolytical ability, which was made according to a method de-

scribed by Long and Hammer (1937), showed that the ability of the fungus to break down protein in skim milk was lowered (figure 3) during the first year the fungus was stored under conditions as mentioned above.

Earlier investigations (Christensen, 1967) showed that the pathogenicity of the fungus, when stored as mentioned above, dropped very fast, especially in respect of spring-sown rye (Petkus Vårrug).

Whether there is any connection between the drop in the pathogenicity and the lowering of the ability of the fungus to break down protein has not been investigated, and can therefore only be a suggestion at the moment.

The fact that the fungus is able to increase in cellulolytic ability and decrease in proteolytic ability when grown on yeast-agar, seems to confirm earlier investigations (Christensen, 1967), which suggests that the fungus is able to adapt itself to the conditions under which it is grown. These investigations (Christensen, 1968) showed that it was possible to raise a lowered pathogenicity by growing the fungus on a susceptible crop.

Text of figures:

Fig 2:

Loss of weight of filterpaper inoculated with *O. graminis* isolates kept on yeast-agar for various periods.

Time of incubation 1, 2 and 3 months by 11°C in greenhouse.

Fig 3:

Diameter of clear zone after inoculation of Tryptose-Blood-Agar mixed with yeast extract and skim milk with *O. graminis* kept on yeast-agar for various periods.

Incubation: 4 days by 23°C

Litteratur

Christensen, B. Dam: Undersøgelser over goldfodsygesvampen *Ophiobolus graminis* (Sacc.). I. Undersøgelse over virulens variation, kornarternes modtagelighed og udbyttedepression ved smitte med *Ophiobolus graminis*. Tidsskrift f. Planteavl 71:64-69, 1967.

Christensen, B. Dam: Undersøgelser over goldfodsygesvampen *Ophiobolus graminis* Sacc. III. Nogle græsarters modtagelighed samt deres evne til at overføre smitte af *Ophiobolus graminis*. Tidsskrift for Planteavl, 72, 1968.

Garret, S. D.: Cellulose-decomposing ability of some food-rot fungi in relation to their saprophytic survival. Trans. Brit. Mycol. Soc. 49 (1): 57-68, 1966.

Long, H. F. og Hammer, B. W.: Methods for the detection of lipolysis by microorganisms. Journal of Science 11: p. 347, 1937.