



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 25.X.1967 (P 123 224)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 15.VIII.1972

Kl. 45f,1/04

MKP A01g 1/04

UKD

Twórca wynalazku: Mirosław Małuszyński

Właściciel patentu: Polska Akademia Nauk (Zakład Genetyki Roślin),
Poznań (Polska)

Sposób hodowli grzybni pieczarek

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób hodowli grzybni pieczarek, gwarantujący jej pełną plenność.

Dotychczas do hodowli grzybni pieczarek stosuje się zazwyczaj podłoże stanowiące odpowiednio spreparowany nawóz koński.

Znane są także — sposoby hodowli grzybni pieczarek na podłożu będącym mieszaniną nasyconego wodą i odkwaszonego węglanem wapnia torfu ogrodniczego zmieszanego z moczonym ziarnem pszenicy, które to podłoże zaszczepia się grzybnią mateczną, uzyskaną drogą kiełkowania zarodników na wyjałowionej pożywce agarowej.

Grzybnię mateczną przygotowuje się w sposób następujący: w warunkach możliwie aseptycznych powoduje się wysyp zarodników dojrzałej pieczarki. Zarodniki umieszcza się w płytce Petriego w celu poddania ich narkotyzowaniu dwuchlorkiem etylenu.

Następnie przenosi się zarodniki za pomocą igły platynowej do próbek zawierających pożywkę agarową o następującym składzie:

woda destylowana	1000 cm ³
glukoza	10 g
pepton	3 g
kwaśny fosforan potasu	1 g
siarczan magnezu	0,5 g
siarczan miedzi	0,1 g
siarczan glinu	0,01 g
molibdenian amonu	0,01 g
kwas borowy	0,01 g
agar-agar	15,00 g

2

Na otrzymanej pożywce zarodniki pieczarek kiełkują w okresie 2—3 tygodni w temperaturze 25°C, a w ciągu dalszych 3 tygodni całkowicie przerastają podłoże w próbówce.

5 Grzybnią mateczną przeszczepioną do naczyń szklanych z podłożem torfowo-ziarnistym przerasta je w ciągu 6 tygodni, po czym wytrząsa się gotowy produkt do tekturowych pudełek.

Otrzymana według dotychczasowych metod 10 grzybnią mateczną jest grzybnią niejednorodną, gdyż kiełkujące na jednej szalce zarodniki są różne genetycznie co powoduje, że powstające z nich grzybnie mają różny typ koniugacyjny, a to z kolei umożliwia 15 przebieg procesów somatycznej rekombinacji zwiększających jeszcze niejednorodność genetyczną grzybni. W wyniku tych procesów na szalce powstają takie grzybnie, które są częściowo lub całkowicie bezpłodne.

Stosowany zatem dotychczas proces produkcji grzybni handlowej uniemożliwia w ogóle prowadzenie jej 20 selekcji zarówno pod względem przydatności do produkcji, jak i odporności na choroby — konsekwencją czego jest otrzymywanie grzybni handlowej pieczarek o różnorodnej plenności, co w rezultacie powoduje 25 powstawanie w produkcji niejednorodnych kultur pieczarek.

Niedogodności tych nie posiada rozwiązanie według wynalazku, w którym — w odróżnieniu od dotych- 30 czas znanych sposobów hodowli grzybni pieczarek — położony jest nacisk na etap początkowy omawianej

hodowli tj. na produkcję grzybni macecznej, której istotą stanowi wegetatywne rozmnażanie sprawdzonych grzybni homotalicznych (samopłodnych).

Cel ten został osiągnięty przez selekcję pod względem przydatności handlowej jednorodnych, sprawdzonych, homotalicznych kultur pieczarek, uzyskanych z pojedynczego zarodnika.

Selekcja kultur pieczarek — efektem której jest produkcja grzybni macecznej gwarantującej rozmnażanie sprawdzonych grzybni homotalicznych (samopłodnych) odbywa się według poniższych zasad.

U dziko rosnących pieczarek na podstawie wytwarzane są cztery haploidalne zarodniki (pojedyncza liczba chromosomów „n”). Zarodniki takie kiełkują w grzybnię homokariotyczną, którą może tworzyć z inną grzybnią o odpowiednim typie koniugacyjnym nową grzybnię tzw. dikariotyczną „n + n”, która jest zdolna do tworzenia owocników. W razie połączenia się grzybni homokariotycznej z inną grzybnią również homokariotyczną, ale o nieodpowiednim typie koniugacyjnym powstaje nowa grzybnia heterokariotyczna (n, n), która jest całkowicie lub częściowo bezpłodna.

U pieczarki uprawnej na ogół obserwuje się zjawisko wtórnego homotalizmu, polegające na tym, że na podstawie znajdują się jedynie dwa zarodniki, które zawierają po dwa jądra i mają zdolność do odowocowywania.

Jednak pieczarka uprawna wytwarza również zarodniki haploidalne „n” z częstotliwością około 20%, które nie są zdolne do owocowania. Grzybnia taka może natomiast wchodzić w procesy rekombinacji somatycznej usteczniąc grzybnie dikariotyczne powstałe z zarodników zawierających po 2 jądra, w wyniku czego mogą powstać grzybnie heterokariotyczne częściowo lub całkowicie bezpłodne.

W związku z tym należy wyodrębnić spośród wszystkich zarodników i wyselekcjonować tylko te, które zawierają po dwa dikariotyczne jądra i dlatego posiadają dużą zdolność owocowania.

Przeprowadzenie tej selekcji będzie wtedy tylko możliwe, jeżeli zastosuje się podany w patencie sposób izolowania pojedynczego zarodnika z którego powstanie indywidualna grzybnia, którą następnie podda się sprawdzeniu czy jest ona homo- czy heterokariotyczna, a więc na ile jest płodna.

Taki sposób selekcji eliminuje zarodniki haploidalne (jednojądrowe) nieprzydatne do produkcji jako całkowicie niepłodne.

Dotychczasowy bowiem sposób wysiewu wszystkich zarodników na jedną szalkę uniemożliwia przeprowadzenie jakiegokolwiek selekcji.

Zastosowanie wynalazku umożliwia uzyskanie wyrównanych plonów pieczarek w hodowli produkcyjnej, gdy dotychczas w jednakowych warunkach hodowlanych istniały zdecydowane różnice w plonowaniu. Poza tym zastosowany cykl hodowlany umożliwia drogą selekcji samopłodnych jednorodnych grzybni w warunkach produkcyjnych uzyskiwanie bardziej wydajnych i odpornych na choroby grzybni pieczarek.

Sposób postępowania według wynalazku jest następujący: zebrane na wyjałowionej bibule zarod-

niki wysiewa się na pożywkę syntetyczną o następującym składzie:

glukoza	20,00 g
asparagina	2,00 g
winian amonu	0,50 g
KH_2PO_4	1,00 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,50 g
Fe^{+++}	0,20 g
Zn^{++}	0,20 g
Mn^{++}	0,10 g
biotyna	5,00 mg
tiamina	100,00 mg
wyciąg z drożdży	0,75 g
pepton	0,75 g
wyciąg słodowy	0,60 g
hydroлизat kwasów nukleinowych	1,25 g
agar-agar	20,00 g
wywar z grzybni ziarnistej	100,00 g
woda destylowa	1000,00 g

Zarodniki kiełkują w temperaturze od 22 do 28°C. Po skielkowaniu przystępuje się do izolacji pojedynczych zarodników za pomocą igły wolframowej pod mikroskopem stereoskopowym. Wyizolowane zarodniki przeniesione na oddzielne płytki Petriego rozrastają się w nowe grzybnie, które przenosi się na pożywkę ziarnistą. Ziarno na pożywkę, moczone uprzednio przez 1—2 godziny w stosunku objętościowym 1 : 2 w wodzie destylowanej o temperaturze od 50 do 90°C, po napęcznieniu wyjaławia się w szklanych naczyniach zamkniętych korkiem z waty w autoklawie pod ciśnieniem od 0,9 do 1,5 atm przez 20 do 60 min.

Przeprowadzone przez nas badania również wykazały, że znacznie lepsze efekty uzyskuje się stosując podłoże z ziaren owsa. Efekty te przejawiają się w szybszym przerastaniu grzybni, (tzn. skróceniu cyklu produkcyjnego o około 10 dni), w większej płodności co powoduje, że uzyskana grzybnia jest dużo zdrowsza i plemniejsza w porównaniu z dotychczas otrzymywaną.

Postępowanie z owsem jest następujące: — ziarno owsa należy namoczyć w temperaturze od 18—30°C w wodzie destylowanej, a następnie wyłożyć do kiełkowania w warunkach umożliwiających zainicjowanie procesów kiełkowania.

W tych warunkach ziarno pozostaje przez około 72 godziny. Dopiero podkiełkowane ziarna poddaje się sterylizacji i dalszej obróbce tak jak to podano wyżej.

W ten sposób przygotowana pożywka stanowi podłoże do wzrostu grzybni ziarnistej pieczarek.

Do produkcji grzybni ziarnistej wybiera się tylko dobrze owocujące kultury homotaliczne, co stwierdza się przez wstępne odowocowanie w warunkach produkcyjnych. Grzybnią ziarnistą zaszczepia się znane i stosowane już podłoże nawozowe.

Sprawdzone kultury dla produkcji grzybni ziarnistej (handlowej) rozmnaża się jedynie wegetatywnie, gdyż tylko w ten sposób postępowanie gwarantuje w pełni plenność tej grzybni przy zachowaniu odpowiednich warunków w hodowli produkcyjnej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób hodowli grzybni pieczarek na podłożu z ziarna zbóż **znamienny tym**, że ziarno zwłaszcza

owsa moczone uprzednio przez 1—2 godziny w stosunku objętościowym 1 : 2 w wodzie destylowanej i wyjałowione przez 20—60 minut w autoklawie pod ciśnieniem 0,9 do 1,5 atm zaszczipia się wyselekcjonowaną grzybnię mateczną rozmnażaną wegetatywnie na pożywce syntetycznej, po czym po przerośnięciu otrzymana grzybnia ziarnista służy do dalszej produkcji grzybni handlowej.

2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że do hodowli grzybni matecznej używa się pożywkę syntetyczną o składzie: glukoza — 20,00 g, asparagina — 2,00 g, winian amonu — 0,50 g, KH_2PO_4 — 1,00 g, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,50 g, Fe^{+++} — 0,20 g, Zn^{++} —

0,20, Mn^{++} — 0,10 g, biotyna — 5,00 mg, tiamina — 100,00 mg, wyciąg z drożdży — 0,75 g, pepton — 0,75 g, wyciąg słodowy — 0,60 g, hydrolizat kwasów nukleinowych — 1,25 g, agar-agar — 20,00 g, wywar z grzybni ziarnistej — 100,00 g, woda destylowana — 1000,00 g.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grzybnię mateczną otrzymuje się przez wyizolowanie pojedynczych kiełkujących zarodników, z których wyprowadza się grzybnię, wyselekcjonowano w warunkach produkcyjnych na drodze wegetatywnego rozmnażania.