

Organizacja Banku Patogenów Roślin w Instytucie Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu

Organization of the Collection of Plant Pathogens

Maria Rataj-Guranowska

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Bank Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności

W 1994 r. Instytut Ochrony Roślin otrzymał dotację Ministerstwa Rolnictwa na zorganizowanie Kolekcji Patogenów Roślin. Celem projektu było utworzenie centralnej polskiej kolekcji grzybów, bakterii i wirusów chorobotwórczych charakterystycznych dla roślin rolniczych, gleb i klimatu w Polsce. Do 1996 r. zaadaptowano dwa pomieszczenia: pomieszczenie danych podstawowych oraz pomieszczenie identyfikacji i dostępu. Zamówiono aparaturę naukową, środki chemiczne, meble i książki. W ciągu dwóch kolejnych lat wyremontowano i wyposażono pozostałe pomieszczenia. Każdy patogen zachowywano dwiema uzupełniającymi się metodami, głównie przez liofilizację i zamrażanie w ciekłym azocie. Do 2016 roku zebrano 1748 kultur grzybów chorobotwórczych i 192 szczepy bakterii.

In 1994 The Institute of Plant Protection received the subsidy of Ministry of Agriculture to organize the Collection of plant pathogens. The aim of the project was to settle the central Polish collection of fungi, bacteria and viruses pathogenic and characteristic to agricultural plants, soils and climate in Poland. Up to 1996 two rooms were adapted: the room of the basic data and the identification and access room. Scientific equipment, chemicals, furniture and books have been ordered. In the period of two following years the rest of the rooms were renovated and equipped. Each pathogen has been conserved by means of two complementary methods, mainly by the freeze-drying and freezing in the liquid nitrogen. Till 2016, 1748 cultures of pathogenic fungi and 192 strains of bacteria have been collected.

Wstęp

W 1994 roku Ministerstwo Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej (MRiGŻ) powołało Bank Patogenów Roślin (BPR) do zorganizowania go w Instytucie Ochrony Roślin (IOR) w Poznaniu, kierowanym przez prof. dr hab. Stefana Pruszyńskiego. Decyzja ta została podjęta w odpowiedzi na potrzeby, hodowców uzyskania odmian roślin uprawnych o zwiększonej odporności na patogeny, a także pracowników ochrony roślin testujących nowe pestycydy oraz genetyków i biotechnologów. Nowoutworzona placówka na utworzenie, organizację i prowadzenie BPR i w nim Kolekcji mikroorganizmów patogenicznych dla roślin, otrzymała dotację z MRiGŻ w ramach programu „Zasoby genowe roślin uprawnych”. Także IOR miał wspierać finansowo BPR. Było to duże wyróżnienie dla Instytutu, który o przyznanie dotacji konkurował z kilkoma instytutami. O wyborze IOR-u zadecydował fakt długoletniego istnienia w nim trzech zakładów: Mykologii, Wirusologii i Bakteriologii. Otrzymane fundusze byłyby wystarczające dla wybudowania nowego budynku. Jednak zadecydowano, że zostaną one częściowo rozdzielone między w/w zakłady mikrobiologiczne, które w zamian za to a te w zamian za to będą dostarczać patogeny do Kolekcji.

W październiku 1994 roku powołano mnie na stanowisko kierownika BPR; miałam już wówczas stopień doktora habilitowanego. Organizacja BPR wymagała interdyscyplinarnej wiedzy z zakresu nie tylko mikrobiologii, ale także biochemii oraz fizyki. Dysponowałam taką wiedzą, gdyż ukoń-

czyłam na Uniwersytecie Warszawskim studia biologiczne ze specjalizacją z botaniki w zakresie fizjologii roślin. Swoją pracę naukową rozpoczęłam w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Tam obroniłam pracę doktorską, wykonywaną pod kierunkiem prof. dr hab. Karola Mańki. Jej tematyka dotyczyła zagadnień z pogranicza genetyki roślin i mykologii. Habilitacją zakończyłam pewien etap prac naukowych, które prowadziłam w IGR PAN. Dotyczyła ona charakterystyki grzybów rodzaju *Fusarium* metodami niekonwencjonalnymi. Jeszcze jako pracownica IGR PAN, zostałam delegowana na koszt IOR-u przez jego dyrektora do Commonwealth Mycological Institute (CMI) w Egham w Wielkiej Brytanii, w celu zdobycia podstawowej wiedzy o organizacji największej kolekcji mykologicznej w Europie. Był to istotny wkład prof. Pruszyńskiego w organizację kolekcji.

Praca w IOR miała być dla mnie przede wszystkim służbą publiczną, wykonywaną w instytucie branżowym wśród nowych ludzi. Nie oznaczało to jednak rezygnacji z pracy naukowej. Entuzjastycznie i z nadzieją na sukces myślałam o nowym wyzwaniu. Wraz ze mną pracę w IOR podjęła mgr Iwona Walkowiak-Cagara, która przeszła do Instytutu również z IGR PAN.

W latach 1994–2016 zaplanowałam, nadzorowałam adaptację pomieszczeń i zorganizowałam wraz z uformowanym zespołem Kolekcję mikroorganizmów patogenicznych dla roślin. Całością BPR kierowałam do przejścia na emeryturę, czyli do końca 2016 roku.

Rozplanowanie pomieszczeń, ich adaptacja i remont (1994–1996)

Kiedy rozpoczynałam pracę w IOR, lokalizacja Banku nie była jeszcze ustalona. Na siedzibę BPR wybrano ostatecznie parter budynku 6. Wcześniej mieściły się tam magazyny chemikaliów i materiałów budowlanych; stan pomieszczeń był bardzo zły (Rys. 1). Wyziewy chemikaliów spowodowały wykruszenie się wykładzin podłogowych, a zardzewiałe drzwi uniemożliwiały wejście do pomieszczeń. Plany przebudowy od pomysłu do realizacji nowej jednostki wykonane zostały bez pomocy architekta lub choćby inżyniera.



Rys. 1. Pomieszczenie Banku Patogenów Roślin i Badań ich Bioróżnorodności przed remontem (Fot. M. Rataj-Guranowska)

Fig. 1. Room of the Bank of Plant Pathogens and Research on Plant Biodiversity before renovation (Photo M. Rataj-Guranowska)

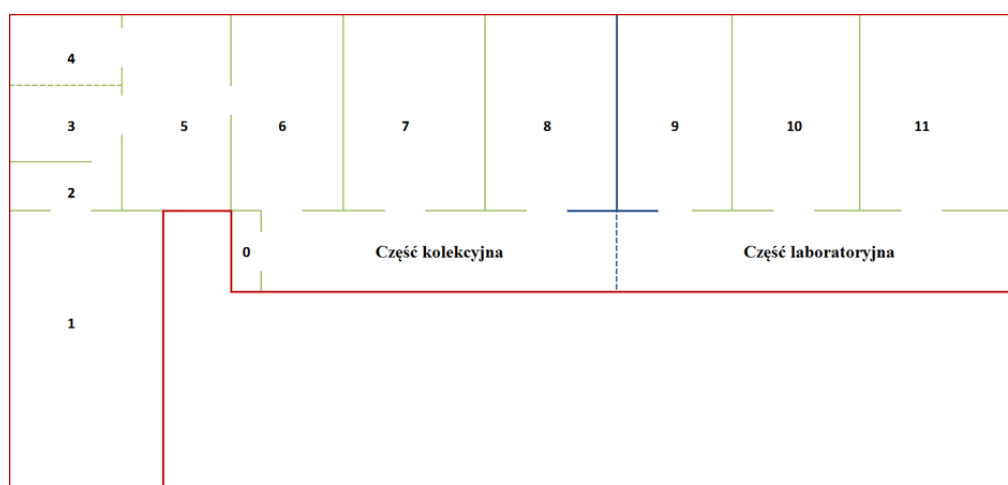
Pracownicy BPR stali przed prawdziwym wyzwaniem stworzenia centralnej, polskiej kolekcji patogenów specyficznych dla naszych roślin uprawnych – gospodarzy tychże patogenów, specyficznych także dla klimatu i gleb naszego obszaru geograficznego.

Tworzona od podstaw kolekcja miała uzupełniać zbiory przechowywane w kolekcjach Europy Zachodniej, w których na ogół brakowało patogenów z Europy Środkowej.

W pierwszym okresie – od 1994 do lutego 1996 roku – urządzono dwa pomieszczenia: pokój do identyfikacji grzybów oraz gabinet – bazę danych, a także zaplanowano lokalizację pozostałych pomieszczeń. W budynku wyróżniono dwie części: tzw. ściśle kolekcyjną (pomieszczenia 0-8, w tym duże pomieszczenie 1 na kolekcję) i laboratoryjną (pomieszczenia 9-11) patrz Rys. 2.

W części laboratoryjnej zaplanowano pożywkarnię i myjnię z wydzieloną za przepierzeniem częścią sterylizacyjną, w której miał stać niewielki autoklaw i aparat Kocha, a także pomieszczenie do liofilizacji oraz pokój socjalny. Ten ostatni był szczególnie potrzebny w BPR, gdyż we wszystkich pokojach laboratoryjnych krążyły zarodniki grzybów. Część kolekcyjną miały stanowić: pokój bazy danych – gabinet kierownika, pokój taksonomiczny, pokój hodowlany z lodówkami, termostatami oraz dużą komorą hodowlaną, pokój dla dwóch asystentów oraz dwie przeszczepialnie i pokój kolekcyjny – największy ze wszystkich, oddzielony od przeszczepialni małą śluzą z lampą UV.

Przeprowadzany etapami remont oraz podstawowa organizacja BPR trwały do 1999 roku.



Rys. 2. Rozplanowanie pomieszczeń w Banku Patogenów Roślin. Ozaczenia pomieszczeń: 0, magazyn; 1, pokój kolekcyjny; 2, śluza; 3 i 4, przeszczepialnie; 5, pokój mikroskopowy; 6, pokój hodowlany; 7, pokój identyfikacji, 8, gabinet kierownika; 9, pokój socjalny; 10, pokój do liofilizacji; 11, pożywkarnia.

Fig. 2. Layout of rooms in the Plant Pathogens Bank. Room designations: 0, warehouse; 1, collection room; 2, airlock; 3 and 4, transplant rooms; 5, Microscope room; 6, breeding room; 7, identification room, 8, manager's office; 9, social room; 10, lyophilization room; 11, the feeder room.

Zakup aparatury, drobnego sprzętu, chemikaliów, mebli i książek

Dużo czasu poświęcono na zakup aparatury dla czterech pracowni: Mykologii, Wirusologii, Bakteriologii i dla BPR. Do 1996 roku dla BPR zakupiono mikroskopy marki Olympus, trzy komory z nawiewem sterylnym, zamrażarkę do -85°C (Revco), jedną dużą komorę hodowlaną (Memmert), i komorę do termicznej sterylizacji szkła oraz autoklaw. Ponadto, zakupiono wiele drobnego sprzętu laboratoryjnego, odczynników, zwłaszcza standardowych pożywek z firmy Difco, a także meble, głównie laboratoryjne.

Najważniejszymi sprzętami zakupionymi do BPR były komory do pracy sterylnej oraz palniki Fire Boy, które można było wyłączać w trakcie wielogodzinnej pracy, dzięki czemu nie dochodziło do nagrzania się komory. Bardzo udany okazał się również zakup buteleczek (próbówek) uniwersalnych (Fisons) z zakrętkami i płaskim dnem,

o pojemności 25 ml. Luźne zakręcanie zakrętek umożliwiało oddychanie kultur. Pod zakrętkami umieszczano papierowe krażki chroniące przed rozkruszkami. Buteleczki – po 25 sztuk – ustawiano na podstawkach, co bardzo ułatwiało wyszukiwanie i przenoszenie prób. Do dziś w pokoju kolekcyjnym, na metalowych półkach, w buteleczkach pod olejem (lub wodą) przechowuje się całą kolekcję przyżyciową patogenów (Rys. 3).

Zakład wyposażono również w meble i podstawowe książki. Sporo starych, obcojęzycznych kluczy mykologicznych, użyczonych przez prof. Karola Mańkę i już nieosiągalnych na rynku, skserowały pracownice Banku. Zbiór ten jest stale uzupełniany nowymi wydawnictwami, głównie anglojęzycznymi. Nowoczesne urządzenia zapewniły wysoki standard pracy, niedostępny wcześniej, a także niespotykany w tamtych latach w innych placówkach.



Rys. 3. Kolekcja grzybów patogenicznych przechowywanych w butelkach uniwersalnych pod olejem mineralnym (Fot. A. Pukacka)

Fig. 3. A collection of pathogenic fungi stored in universal bottles under mineral oil (Photo A. Pukacka)

W lutym 1996 roku nastąpiło uroczyste otwarcie BPR w obecności pracowników IOR i Ministerstwa.

Po 1996 roku zakupiono komputery, kolejne dwa mikroskopy (Olympus) (Rys. 4) oraz binokular (Olympus), komorę do termicznej sterylizacji, autoklaw oraz aparat Kocha. W latach 2007–2012, kiedy dyrektorem Instytutu był prof. dr hab. Marek Mrówczyński, zakupiono komory termostatowe do kilku pomieszczeń. Wspomniane zakupy były konieczne ze względu na zapewnienie odpowiednich warunków do przechowywania grzybów i bakterii kwarantannowych. Placówka musiała otrzymać zezwolenie na przechowywanie tych organizmów i odpowiednio zaadaptować pomieszczenia w całym Banku. BPR jako pierwszy w IOR

uzyskał prawa do przechowywania patogenów kwarantannowych. Obecnie patogeny te są przechowywane w Centrum Badań Organizmów Kwarantannowych, Inwazyjnych i Genetycznie Zmodyfikowanych IOR-PIB.

Do ważniejszych sprzętów zakupionych w dalszych latach działalności BPR należy zaliczyć komorę do pracy sterylnej klasy II Esco z filtrami na wejściu i wyjściu, a także zamrażarkę niskotemperaturową New Brunswick Scientific U101 Innova I (Rys. 5). Jest to specjalna komora mająca zabezpieczenie na wypadek awarii prądu. W razie awarii przez trzy doby utrzymuje się pożądana temperatura, bowiem w płaszczu komory wytwarza się skroplony dwutlenek węgla. Zakup aparatu okazał się niezbędny po łącznie dziewięć-



Rys. 4. Mikroskop Olympus (Fot. J. Wojczyńska)
Fig. 4. Olympus microscope (Photo J. Wojczyńska)

ciu awariach wspomnianej wcześniej zamrażarki Revco, chłodzącej do -85°C . Kupiono także generator prądu; szczególnie przydatny podczas awarii prądu.

Gromadzenie patogenów

Od 1996 roku zaczęto gromadzić kultury grzybów i bakterii do późniejszego opracowania. Pochodziły one z mojej kolekcji zawodowej oraz od kilku innych fitopatologów. Już w 1996 roku zgromadzono 700 kultur, z czego do 1997 roku potwierdzono identyfikację połowy kultur. W następnych latach rozpoczęto izolacje patogenów z chorych roślin. Przez kilka lat próby były dostarczane przez terenowe oddziały Wojewódzkich Inspektoratów Ochrony Roślin i Nasiennictwa (WIORiN). Każdego roku wybierano grupę roślin do zbioru. Były to, kolejno: rośliny okopowe i korzeniowe, cebulowe, bobowate, zboża i iglaste. Dopiero w latach późniejszych chore rośliny zbierali pracownicy Kolekcji. Były to porażone rośliny ze wszystkich grup, z naciskiem na grupę wybraną w danym roku.

W 1997 roku ustalono zasady rozprowadzania patogenów drogą wymiany i sprzedaży. Cenę jednego izolatu ustalono na 200 zł i do dzisiaj nie uległa ona zmianie.

Opracowano następujące metody przechowywania i konserwacji patogenów: liofilizację, przechowywanie pod olejem mineralnym i mrożenie w 10-procentowym glicerolu w -85°C . Dopiero w 2000 roku wprowadzono metodę mrożenia w ciekłym azocie w -196°C . Aparaturę do tego celu zakupiono z funduszy 5. Europejskiego Programu Ramowego, do realizacji którego zostałam zaproszona jako specjalista analizy zgodności wegetatywnej grzybów. Ustalono, że każdą kulturę należy zabezpieczyć co najmniej dwiema uzupełniającymi się metodami (Rys. 6).



Rys. 5. Zamrażarka niskotemperaturowa New Brunswick Scientific U101 Innova I (Fot. J. Wojczyńska)
Fig. 5. New Brunswick Scientific U101 Innova I low-temperature freezer (Photo J. Wojczyńska)

W kolekcji stale rozszerza się zbiory grzybów i bakterii, rozwija metody konserwacji, izoluje, identyfikuje, konserwuje, odnawia i rozprowadza patogeny. Po paru latach zrezygnowano z kolekcjonowania wirusów, ponieważ tą grupą patogenów zajmuje się Pracownia Wirusologii działająca w Instytucie.

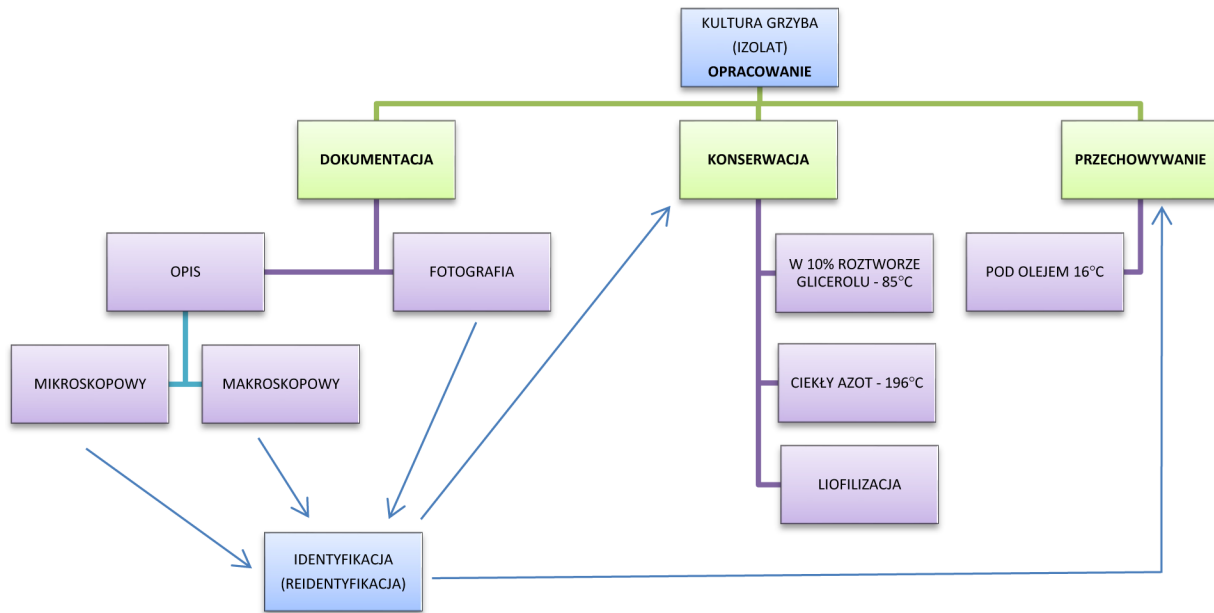
O szczegółowej działalności BPR pisano wielokrotnie, m.in. w broszurze na temat metod przechowywania i konserwacji patogenów stosowanych w kolekcji. W 2014 roku nazwę Banku Patogenów Roślin zmieniono na Bank Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności.

Już w roku 1999 rozpoczęto opracowywanie katalogu kolekcji, który po pierwszej edycji w postaci książki wydanej w 2000 roku jest aktualnie dostępny dla wszystkich zainteresowanych w wersji elektronicznej na stronie IOR-PIB: <http://bankpat.expertus.com.pl/search/>.

Do 2017 roku w Banku Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności było 1 748 izolatów grzybów i 192 kolonie bakterii.

Rada programowa

5 listopada 1996 roku dyrektor IOR-u, prof. Stefan Pruszyński, po uzgodnieniu z Ministerstwem Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej, powołał Radę Programową Banku Patogenów Roślin. Na pierwszym posiedzeniu, 14 listopada, powołano następujących członków Rady, którzy w owym czasie posiadali co najmniej stopień doktora habilitowanego: kierowniczkę BPR Marię Rataj-Guranowską, dyrektora IOR-u Stefana Pruszyńskiego, wicedyrektora Departamentu Produkcji Rolniczej MRiGŻ Bożenę Nowicką oraz Włodzimierza Doruchowskiego, Zofię Fiedorow, Halinę Kurzawińską, Ewę Łojkowską, Małgorzatę Mańkę, Joannę Marcinkowską, Stefana Martyniuka, Leszka Orlikowskiego, Czesława Sadowskiego



Rys. 6. Schemat postępowania z grzybami patogenicznymi
Fig. 6. Scheme of dealing with pathogenic fungi

i Piotra Sobiczewskiego. Przewodniczącą Rady została Zofia Fiedorow. Rada była zawsze organem społecznym, zatwierdzającym harmonogram corocznych prac, opiniującym coroczne sprawozdania, a także organem doradczym i pomocniczym w rozwiązywaniu bieżących problemów, nawet pomagającym uzyskać dodatkowe fundusze. Zbiierała się na ogół raz w roku i w zmienianym składzie trwa do dzisiaj. Jednak od 2016 roku w jej skład wchodziło tylko: prof. dr hab. Małgorzata Mańka – od 30 października 2002 roku przewodnicząca, dr hab. Agnieszka Jemiołkowska, prof. dr hab. Halina Kurzawińska, prof. dr hab. Piotr Łakomy, dr hab. Krzysztof Matkowski, prof. dr hab. Henryk Pośpieszny, prof. dr hab. Maria Rataj-Guranowska i prof. dr hab. Halina Wiśniewska.

Pracownicy

W pierwszych latach działalności w BPR pracowały ze mną dwie osoby: mgr inż. Iwona Walkowiak-Cygara i mgr inż. Ilona Peroutka, a od 1997 doszły mgr Maria Pasternak i Krystyna Przywalska. Ogromne zasługi dla BPR miała mgr Anna Pukacka, która w latach 1999–2015 prowadziła kolekcję przyżyciową patogenów. W 2004 do zespołu dołączyła mgr inż. Małgorzata Tyrakowska; w 2006 roku doświadczony mykolog dr inż. Sylwia Stępniewska-Jarosz; w 2007 roku mgr inż. Natalia Łukaszewska-Skrzypniak, a w 2008 roku bakteriolog dr Katarzyna Sadowska. Te cztery ostatnie pracownice pracują w BPR do dzisiaj. Zatrudniona w 2015 roku biolog molekularna mgr Marzena Lewandowska pracowała tylko rok, a jej miejsce zajęła w 2016 roku mgr Jagoda Wojczyńska. Stworzenie bardzo dobrego zespołu nie było jednak łatwe. Praca w BPR jest wymagająca. Nauka identyfikacji najtrudniejszej ponoć taksono-

micznej grupy – grzybów mikroskopowych – trwa minimum trzy lata. Pracowników jest za mało, aby w zadowalającym stopniu łączyć pracę w kolekcji z pracą naukową. Jednak udało się nam eksperymentować, publikować i popularyzować wiedzę na temat metod przechowywania patogenów oraz metody zgodności wegetatywnej w ramach Sekcji Genetyki Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego. Ponadto, przez trzy lata prowadziliśmy zajęcia dla studentów Poznańskiego Uniwersytetu Przyrodniczego.

Publikacje

Spośród wielu opracowań opublikowanych przez pracowników BPR warto zwrócić uwagę na zeszyty „Kompedium symptomów chorób roślin oraz morfologii ich sprawców” pod moją redakcją, które wydawane są corocznie od 2001 roku (Rys. 7). W 2012 roku wydrukowano zbiór kompendiów pod tym samym tytułem, a w 2015 roku angielską wersję zbioru. Publikacje te cieszą



Rys. 7. Kompedium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców (Fot. A. Pukacka)
Fig. 7. Compendium of symptoms of plant diseases and morphology of their perpetrators (Photo A. Pukacka)

się ogromnym powodzeniem w kraju i za granicą. Dla wielu fitopatologów i mykologów to jakby pierwszy polski „klucz” do oznaczania grzybów patogenicznych. Jest źródłem wiedzy oraz pomocą nie tylko dla początkujących fitopatologów. Bar-

dzo ceniony jest przez pracowników (WIORiN-ów) oraz studentów. Poza mną, autorami Kompendium byli: dr Sylwia Stępniewska-Jarosz, dr Katarzyna Sadowska, mgr Anna Pukacka, mgr inż. Natalia Łukaszewska-Skrzypniak (Rys. 8).



Rys. 8. Zespół Banku Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności. Od lewej: dr K. Sadowska, prof. dr hab. M. Rataj-Guranowska, mgr N. Łukaszewska-Skrzypniak, dr S. Stępniewska-Jarosz, mgr A. Pukacka, mgr M. Tyrakowska (Fot. R. Gwiazdowski)
Fig. 8. The team of the Plant Pathogens Bank and Research on their Biodiversity. From the left: PhD K. Sadowska, Professor M. Rataj-Guranowska, MA N. Łukaszewska-Skrzypniak, PhD S. Stępniewska-Jarosz, MA A. Pukacka, MA M. Tyrakowska (Photo R. Gwiazdowski)