

ALEKSANDRA TRZEWIK, TERESA ORLIKOWSKA

Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna izolatów *Phytophthora alni* otrzymanych z chorych olszy, gleby i wody

Morphological and physiological characteristic of *Phytophthora alni* isolates obtained from diseased alder, soil and water

ABSTRACT

Trzewik A. 2011. Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna izolatów *Phytophthora alni* otrzymanych z chorych olszy, gleby i wody. Sylwan 155 (1): 63-69.

The morphological and physiological features of 31 *Phytophthora alni* isolates from diseased alder, soil and water samples were determined. Optimum temperature for growth, sporangia produced and sex organs were examined.

KEY WORDS

alder decay, *Phytophthora alni*, morphological and physiological characteristic

ADDRESSES

Aleksandra Trzewik – e-mail: Aleksandra.Trzewik@insad.pl
Teresa Orlikowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa im. Szczepana Pieniżka; ul. Pomologiczna 18; 96-100 Skierniewice

Wstęp

W Polsce coraz częściej izoluje się gatunki rodzaju *Phytophthora* nie tylko z chorych roślin, ale także z gleby i wody [Orlikowski i in. 2008; Trzewik i in. 2008]. Obecnie znanych jest ponad 100 gatunków tego rodzaju (<http://www.speciesfungorum.org>). Większość z nich należy do groźnych patogenów roślin [Brasier i in. 1999; Orlikowski i in. 2007]. Jednym z nich jest *Phytophthora alni*, wywołujący fytoftorozę olszy [Brasier i in. 2004].

P. alni to międzygatunkowy mieszaniec *P. cambivora* i gatunku *Phytophthora* wykazującego podobieństwo do *P. fragariae* [Brasier i in. 1999, 2004; Olson, Stenlid 2002]. Na podstawie cech morfologicznych, badań cytogenetycznych i analizy izoenzymów Brasier i in. [2004] wyodrębnili 3 podgatunki *P. alni*: subsp. *alni*, subsp. *uniformis* oraz subsp. *multiformis*. *P. alni* subsp. *alni* występuje najliczniej w Europie. Dotychczas w Polsce wykrywany był tylko ten podgatunek [Brasier i in. 2004; Trzewik i in. 2008]. Początkowo izolowano go jedynie w Anglii [Gibbs 1995] i Francji [Streito i in. 2002], a obecnie występuje w większości krajów europejskich [Orlikowski i in. 2003; Brasier i in. 2004]. Objawy fytoftorazy na olszy to przerzedzone i często jasnozielone listowie (ryc. 1), wczesne i nadmierne owocowanie oraz tworzenie nietypowych, małych szyszek. Na pniach mogą występować rdzawe wysięki (ryc. 1) [Gibbs 1995]. W Polsce obserwuje się coraz liczniejsze przypadki zachorowania olszy czarnej (*Alnus glutinosa*) spowodowane przez *P. alni*. Jest to zarówno problem ekosystemów nadrzecznych, jak i leśnictwa [Oszako i in. 2003; Orlikowski i in. 2003]. Od 2000 roku powierzchnia, na której stwierdzono drzewa uszkodzone lub obumarłe z powodu porażenia *P. alni*, wzrosła z 250 do 3039 ha.



Ryc. 1.

Objawy porażenia 2-letnich siewek olszy przez *P. alni* subsp. *alni* po trzech tygodniach od zakażenia (fot. A. Trzewik)

Evidence of infestation of 2-years-old alder seedlings with *P. alni* subsp. *alni* after three weeks (photo A. Trzewik)

Celem pracy jest poznanie cech morfologicznych i fizjologicznych izolatów *P. alni* uzyskanych w Polsce z chorych roślin, gleby i wody oraz ich porównanie z kulturami otrzymanymi we Francji, Włoszech i Belgii. Uzyskana wiedza może pomóc w identyfikacji czynnika chorobotwórczego, a przez to w zahamowaniu rozprzestrzeniania tej choroby w Polsce.

Materiał i metody

Badania prowadzono na 31 izolatach *Phytophthora alni* subsp. *alni* otrzymanych z porażonych drzew (14 izolatów), gleby (4 izolaty) i wody (7 izolatów), pobranych z miejsc wypadania olszy, a także na kulturach *P. alni* subsp. *alni* otrzymanych z Francji (2 izolaty) i Belgii (1 izolat), *P. alni* subsp. *uniformis* z Włoch (1 izolat) i Belgii (1 izolat) oraz *P. alni* subsp. *multiformis* z Belgii (1 izolat) (tab.). Wszystkie izolaty oznaczono przy użyciu markerów DNA zgodnie z procedurą opisaną przez Trzewik i in. [2008].

Typ wzrostu kultur charakteryzowano na pożywce CA (ang. carrot agar) [Erwin, Ribeiro 1996]. W preparatach mikroskopowych oceniano morfologię strzępek, obecność lub brak zgrubień strzępkowych, zoosporangiów, chlamydospor oraz organów rozmnażania generatywnego. W celu uzyskania zoosporangiów 10-dniowe kultury *P. alni* rosnące na pożywce CA przeszczepiano na pożywkę FPM (ang. frozen pea medium) [Erwin, Ribeiro 1996] i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 7 dni. Po tym czasie z miejsc aktywnego wzrostu wycinano korkoborem krążki o średnicy 5 mm i zanurzano je w niesterylnym wyciągu glebowym. Po 48 godzinach inkubacji w 20°C obserwowano liczne zoosporangia. Określano sposób tworzenia zarodni płytkowych, typ zgrubienia szczytowego oraz ich kształt. Pomiar długości i szerokości dokonywano na 50 losowo wybranych zoosporangiach. Analizę morfometryczną oogoniów, anteridiów i oospor przeprowadzano na 21-dniowych kulturach rosnących w 20°C, na pożywce CA. Mierzono 50 losowo wybranych struktur płciowych oraz określano kształt oogoniów i typ anteridiów.

Z 10-dniowych kultur wszystkich izolatów *P. alni* rosnących na pożywce CA pobierano korkoborem inokulum o średnicy 5 mm i wykładano je w centralnej części płytek Petriego (średnica 90 mm) z pożywką PDA (ang. potato dextrose agar), V8 (ang. vegetable agar) oraz CA. Zainokulowane szalki inkubowano w ciemności, w termostatach elektrycznych, w temperaturze

Tabela.

Podgatunki *Phytophthora alni* użyte w badaniach
Subspecies of *Phytophthora alni* used in the study

Gatunek	Źródło izolacji	Numer izolatu	Miejsce izolacji	Rok
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA1	Puławy	2004
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA2	Białobrzegi	2004
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA3	Morawica	2004
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA4	Koszyce	2004
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA5	Nakło	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA6	Nakło	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA7	Szczecinek	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA8	Szczecinek	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA9	Siedliska	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA10	Kornie	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA11	Kornie	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA12	Siedliska	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA13	Kijany	2006
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA14	Kijany	2006
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	ziemia	PAA15	Siedliska	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	ziemia	PAA16	Siedliska	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	ziemia	PAA17	Siedliska	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	ziemia	PAA18	Kornie	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	woda	PAA19	Olszanka	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	woda	PAA20	Korabiewka	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	woda	PAA21	Korabiewka	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	woda	PAA22	Kurówka	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	woda	PAA23	Kurówka	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	woda	PAA24	Ner	2005
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	woda	PAA25	Rawka	2006
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA26	Francja	2003
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA27	Francja	2003
<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAA28	Belgia	2000
<i>P. alni</i> <i>multiformis</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAM29	Belgia	2001
<i>P. alni</i> <i>uniformis</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAU30	Belgia	2001
<i>P. alni</i> <i>uniformis</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	PAU31	Włochy	2000

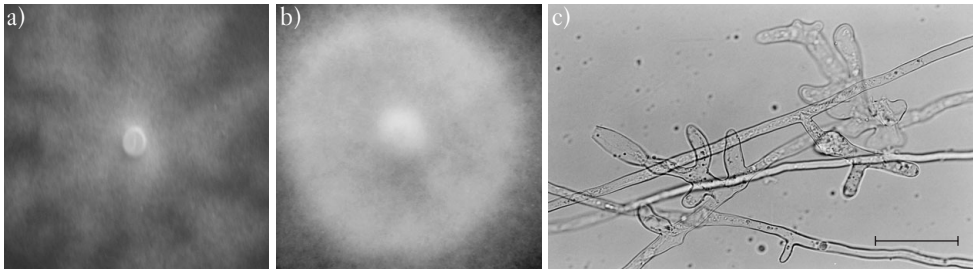
od 5 do 35°C, z odstępem co 5°C. Doświadczenia założono w dwóch powtórzeniach po trzy szalki dla każdego izolatu *P. alni*, każdego rodzaju podłoża agarowego i badanej temperatury. Pomiarów przyrostu kolonii dokonywano co 24 godziny przez 7 dni. Pomiarzy wzrostu po pierwszych 24 godzinach traktowano jako okres aklimatyzacji i z tego powodu nie brano ich pod uwagę przy obliczaniu średniego tempa wzrostu.

Wyniki

WZROST KULTUR ORAZ TWORZENIE ORGANÓW WEGETATYWNYCH I GENERATYWNYCH. Izolaty *P. alni* subsp. *alni* z olszy oraz *P. alni* subsp. *uniformis* na pożywce CA tworzyły strzępki substratowe, nieregularne w zarysie, z obszarami szybciej i wolniej rosnącymi (ryc. 2a). W kulturach *P. alni* subsp. *alni* z gleby i wody oraz *P. alni* subsp. *multiformis* obserwowano watowate w miejscu inokulacji strzępki powietrzne (ryc. 2b). Wszystkie badane izolaty miały strzępki gładkie, jednolite, bez zgrubień i guzków, rozgałęzione prawie pod kątem prostym (ryc. 2c).

Zoosporangia *P. alni* subsp. *alni*, subsp. *uniformis* i subsp. *multiformis* nie tworzyły się na pożywkach PDA, V8 i CA. Zarodnie płytkowe obserwowano po przeszczepieniu izolatów na pożywkę FPM i stymulacji niesterylnym ekstraktem glebowym. Zoosporangia, niezależnie od podgatunku i źródła izolacji, powstawały na prostych sporangioforach i nie wykazywały zdolności do opadania. Miały one kształt elipsoidalny i były pozbawione szczytowego zgrubienia (non-papillate) z szerokim ujściem pory (ryc. 3). Wymiary zoosporangiów różniły się w zależności od źródła izolacji. Największe były zoosporangia z izolatów glebowych (długość od 55,0 do 67,5 mm, szerokość od 37,0 do 50,0 mm), następnie z wody (długość od 47,5 do 63,0 mm, szerokość od 28,0 do 43,0 mm) i z chorych drzew (długość od 35,0 do 65,0 mm, szerokość od 24,0 do 50,0 mm).

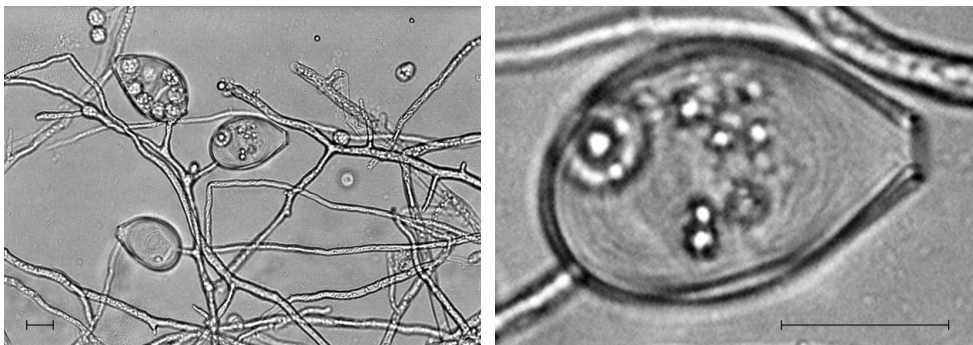
Wszystkie badane kultury *P. alni* tworzyły organy rozmnażania płciowego na pożywkach agarowych. Jednak na PDA i V8 były one mniej liczne niż na pożywce CA. Oogonia *P. alni* subsp. *alni* oraz subsp. *multiformis* były ornamentowe (bruzdkowane) (ryc. 4a), a *P. alni* subsp. *uniformis* gładkie (ryc. 4b). Męskie organy rozmnażania płciowego (anteridia) były w przeważającej liczbie okołolęgniowe (amfigeniczne) (ryc. 4c). Anteridia typu przylegniowego (parageniczne) stwierdzano sporadycznie i tylko w kulturach *P. alni* subsp. *multiformis*. W zależności od podgatunku wymiary oogoniów, anteridiów i oospor były zróżnicowane, przy czym najwięk-



Ryc. 2.

Wzrost kultur na pożywce CA: a) *P. alni* subsp. *alni*, izolat PAA3 z olszy, strzępki substratowe, b) *P. alni* subsp. *alni*, izolat PAA15 z gleby, strzępki powietrzne, c) Strzępki *P. alni* subsp. *alni* izolat PAA10 (fot. A. Trzewik)
Growth of cultures on CA medium: a) *P. alni* subsp. *alni*, PAA3 isolate from tree, substrate hyphae, b) *P. alni* subsp. *alni*, PAA15 isolate from soil, aerial hyphae, c) hyphae of *P. alni* subsp. *alni* PAA10 isolate (photo A. Trzewik)

Kreska; Bar=20 μm



Ryc. 3.

Zarodnie płytkowe i uwalniające się z nich zarodniki izolatu *P. alni* subsp. *alni* PAA1 (fot. A. Trzewik)
Zoosporangia and spores of *P. alni* subsp. *alni* PAA1 isolate (photo A. Trzewik)

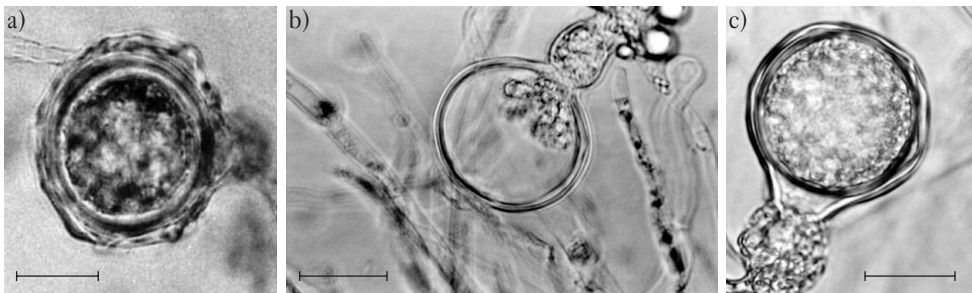
Kreska; Bar=20 μm

sze obserwowano u *P. alni* subsp. *multiformis*. Zakres wymiarów oogoniów wahał się od 45,0 do 58,0 μm . Długość anteridiów wynosiła od 24,0 do 35,0 μm , zaś szerokość – od 21,0 do 25,5 μm . Średnica oospor wahała się od 34,0 do 48,0 μm . Wymiary organów rozmnażania płciowego u *P. alni* subsp. *alni* i subsp. *uniformis* były do siebie zbliżone.

TEMPO WZROSTU KULTUR W ZALEŻNOŚCI OD TEMPERATURY I POŻYWKI. Polskie izolaty *P. alni* subsp. *alni* uzyskane z porażonych drzew, a także te pochodzące z Francji i Belgii, oraz *P. alni* subsp. *uniformis* rosły najszybciej na pożywce CA (ryc. 5). Kultury *P. alni* subsp. *alni* uzyskane z wody i gleby oraz *P. alni* subsp. *multiformis* najszybciej rosły na pożywce V8 (ryc. 6). Wszystkie izolaty rosły najwolniej na pożywce PDA. Nie obserwowano wzrostu strzępek w temperaturze 5°C i 35°C na żadnej z trzech pożywek. Ustalono optimum temperatury dla poszczególnych izolatów *P. alni*. Wynosiło ono dla *P. alni* subsp. *alni* i subsp. *uniformis* 25°C, a dla subsp. *multiformis* 20°C. Temperatura graniczna była jednakowa dla wszystkich podgatunków *P. alni* i wynosiła 10°C (minimalna) oraz 30°C (maksymalna).

Dyskusja

Według Brasier i in. [1999] międzygatunkowa hybrydyzacja u grzybów występuje bardzo rzadko. Jednak w ostatnich latach podano przykłady gatunków pochodzących z hybrydyzacji w obrę-

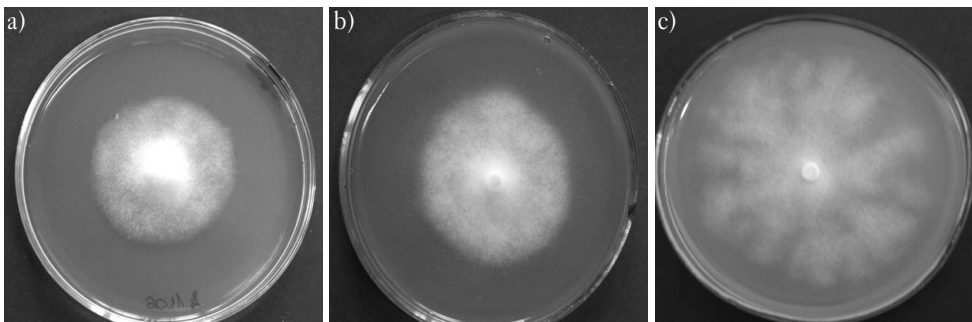


Ryc. 4.

Ornamentowe oogonium izolatu *P. alni* subsp. *alni* PAA16 (a), oogonium o gładkich ścianach *P. alni* subsp. *uniformis* PAU30 (b) i okołolęgnowe anteridium *P. alni* subsp. *alni* PAA10 (c) (fot. A. Trzewik)

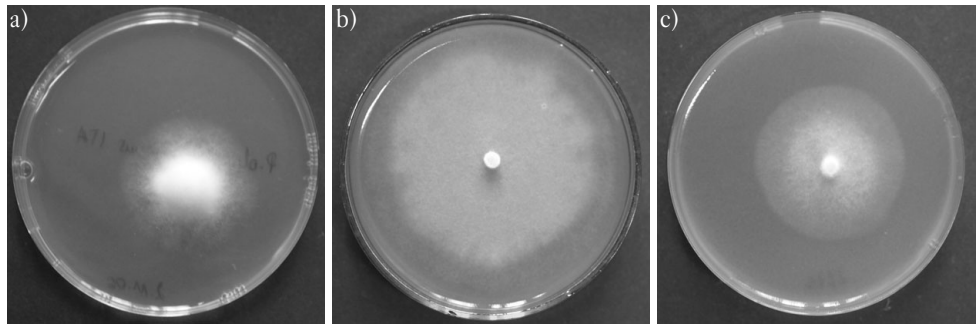
Ornamental oogonium of *P. alni* subsp. *alni* PAA16 isolate (a), oogonium of *P. alni* subsp. *uniformis* PAU30 (b) and antheridium of *P. alni* subsp. *alni* PAA10 (c) (fot. A. Trzewik)

Kreska; Bar=20 μm



Ryc. 5.

Wzrost kultur *P. alni* subsp. *alni* izolatu PAA3 z olszy na pożywkach PDA (a), V8 (b) oraz CA (c) po 3 dniach
Growth of *P. alni* subsp. *alni* PAA3 isolate from tree on PDA (a), V8 (b) and CA (c) media, after 3 days



Ryc. 6.

Wzrost kultur *P. alni* subsp. *alni* izolatu PAA15 z gleby na pożywkach PDA (a), V8 (b) oraz CA (c) po 3 dniach
Growth of *P. alni* subsp. *alni* PAA15 isolate from soil on PDA (a), V8 (b) and CA (c) media after 3 days

bie klasy *Oomycetes*, do której zaliczany jest rodzaj *Phytophthora* [Olson, Stenlid 2002; Man in't Veld i in. 2007]. Brasier i in. [2004] opisali *P. alni* – nowy gatunek atakujący olsze, który jest międzygatunkową hybrydą *P. cambivora* i gatunku wykazującego podobieństwo do *P. fragariae*. Budowa morfologiczna struktur wegetatywnych i generatywnych *P. alni* jest podobna do *P. cambivora*. Gatunek ten różni się jednak wymaganiami w stosunku do temperatury oraz tym, że jest homotaliczny. Ponadto *P. alni* jest bardzo agresywnym patogenem w stosunku do olszy czarnej, podczas gdy *P. cambivora* nie atakuje drzew z tego rodzaju.

Cechy morfologiczne badanych izolatów *P. alni* wykazały duże zróżnicowanie. Biorąc pod uwagę tempo wzrostu plechy w zależności od temperatury i pożywki, możemy wśród nich wyróżnić grupę izolatów najszybciej rosnących na pożywce CA, do których zaliczamy *P. alni* subsp. *alni* z porażonych drzew oraz *P. alni* subsp. *uniformis*. Drugą grupą wyraźnie wyodrębniającą się są izolaty najlepiej rosnące na pożywce V8, do których należą kultury *P. alni* subsp. *alni* uzyskane z wody i gleby oraz *P. alni* subsp. *multiformis*. Podobne zróżnicowanie obserwowano przy analizie wzrostu plechy. Wszystkie izolaty *P. alni* subsp. *alni* z porażonych drzew i *P. alni* subsp. *uniformis* tworzyły na pożywce CA strzępki substratowe, natomiast izolaty *P. alni* subsp. *alni* z gleby i wody oraz *P. alni* subsp. *multiformis* tworzyły białą grzybnię powietrzną. Wyniki te pokrywają się z uzyskanymi przez Brasiera i in. [2004], z wyjątkiem izolatów *P. alni* subsp. *alni* otrzymanych z olszy, które miały strzępki substratowe. Inne cechy, jak tworzenie, kształt i obecność zgrubienia szczytowego zarodni płytkowych, są podobne. Zoosporangia, niezależnie od podgatunku i źródła izolacji, tworzyły się na prostych sporangioforach, miały kształt elipsoidalny i były pozbawione zgrubienia szczytowego. Stwierdzona różnica dotyczy tylko wymiarów zarodni płytkowych, które zależne są od źródła pochodzenia izolatu. Analiza wielkości i kształtu struktur generatywnych potwierdza dane uzyskane przez Brasiera i in. [2004]. W zależności od podgatunku wymiary oogoniów, anteridiów i oospor były zróżnicowane. Największe z nich obserwowano u *P. alni* subsp. *multiformis*.

Podsumowanie

Identyfikacja podgatunków *P. alni* w oparciu o cechy morfologiczne i fizjologiczne jest bardzo trudna. Wynika to między innymi z faktu, że różnice pomiędzy poszczególnymi podgatunkami nie występują wcale bądź są nieznaczne i dotyczą tylko wymiarów określonych struktur. Przykładem mogą być zoosporangia, które są podobne u subsp. *alni*, *uniformis* i *multiformis*, a różnią się jedynie wymiarami i to nie pomiędzy poszczególnymi podgatunkami, lecz w zależności

od źródła izolacji, co stanowi dodatkową trudność w identyfikacji. Podobnie sytuacja przedstawia się z typem wzrostu poszczególnych podgatunków. Istnieją różnice w obrębie podgatunku *P. alni*, dotyczące typu tworzących się strzępek. Izolaty *P. alni* subsp. *alni* z olszy na pożywce CA tworzyły strzępki substratowe, a kultury *P. alni* subsp. *alni* z gleby i wody – powietrzne. Bardzo pomocną informacją dla identyfikacji *P. alni* są struktury generatywne, zwłaszcza oogonia, które różnicują *P. alni* subsp. *alni* od *P. alni* subsp. *uniformis* oraz optimum temperatury różnicujące *P. alni* subsp. *alni* i subsp. *uniformis* od *P. alni* subsp. *multiformis*.

Literatura

- Brasier C. M., Cooke D. E. L., Duncan J. M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 5878-5883.
- Brasier C. M., Kirk S. A., Delcan J., Cooke D. E. L., Jung T., Man in't Veld W. A. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid pathogens spreading on *Alnus* trees. Mycol. Res. 108: 1172-1184.
- Erwin D. C., Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora* Disease Worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Gibbs J. 1995. *Phytophthora* root disease of alder in Britain. EPPO Bull. 25: 661-664.
- Man in't Veld W. A., Cock A. W. A. M., Summerbell R. C. 2007. Natural hybrids of resident and introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new hosts. Europ. J. Plant Pathol. 117: 25-33.
- Olson A., Stenlid J. 2002. Pathogenic fungal species hybrids infecting plants. Microb. Infect. 4: 1353-1359.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Szkuta G. 2003. First record of alder *Phytophthora* in Poland. J. Plant Prot. Res. 43: 33-39.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2008. Współzależność pomiędzy źródłem wody i porą roku a występowaniem *Phytophthora* w środowisku. Prog. Plant Prot. 48: 246-251.
- Orlikowski L. B., Trzewik A., Orlikowska T. 2007. *Phytophthora* spp. associated with nursery reservoirs, rivers and drainage canals. Comm. Appl. Sci. Grent University 72/04: 887-890.
- Oszako T., Orlikowski L. B., Dmyterko E. 2003. Zamieranie olszy czarnej (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) w Polsce. Prace IBL, Ser. A 3: 90-93.
- Streito J. C., Legrand P., Tabary F., Jarnouen de Villartay G. 2002. *Phytophthora* disease of alder (*Alnus glutinosa*) in France: investigation between 1995 and 1999. Forest Pathol. 32: 179-191.
- Trzewik A., Orlikowska T., Oszako T. 2008. Zagrożenie olszy czarnej przez *Phytophthora alni* w Polsce. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 529: 227-233.

SUMMARY

Morphological and physiological characteristic of *Phytophthora alni* isolates obtained from diseased alder, soil and water

Phytophthora alni is a new, identified in 2004 species that attacks alders. It was found in many European countries, including Poland. Brasier et al. [2004] distinguished three subspecies: *P. alni* subsp. *alni*, subsp. *uniformis* and subsp. *multiformis*. So far, only *P. alni* subsp. *alni* has been isolated in Poland from affected trees as well as from soil and water. Performed studies revealed differences among analysed subspecies of *P. alni*. They deal with isolate growth, zoospore dimensions as well as rate of hyphae growth in relation to temperature and medium. *P. alni* subsp. *alni* isolates from alders growing on CA medium formed substrate hyphae, while isolates from soil and water developed aerial structures. Soil isolates had the largest zoospores. *P. alni* subsp. *alni* isolates from alders grew the faster on CA medium, while isolates from soil and water achieved the highest growth rate on V8 medium.