

**TYTUŁ ZADANIA:  
WPŁYW PARAMETRÓW ŚRODOWISKOWYCH ORAZ ZMIENNOŚĆ  
BIOLOGICZNA *PLEUROTUS OSTREATUS* W ZAKRESIE DZIAŁANIA  
NICIENIOBÓJCZEGO NA *HETERODERA SCHACHTII*  
TERMIN REALIZACJI: 2021 – 2025  
NR ZADANIA 22  
BADANIA REALIZOWANE W 2024 R**

Wykonawcy:

Dr hab. Ewa Moliszewska, prof. UO ([ewamoli@uni.opole.pl](mailto:ewamoli@uni.opole.pl)) (Uniwersytet Opolski) - kierownik

Dr Małgorzata Nabrdalik (Uniwersytet Opolski)

Dr hab. Mirosław Nowakowski, prof. IHAR (Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB)



# Cele zadania w 2024 roku

- **Cel podstawowy** – poszukiwanie efektywnych grzybni i warunków do rozrostu i funkcjonowania bójczego grzybni *P. ostreatus* w warunkach gleby rolniczej.
- **Cele pośrednie:**
  - 1. Wstępne określenie warunków dozowania grzybni do gleby oraz wpływu roślin nicieniobójczych na efektywność grzybni modelowej Po4 oraz wykorzystania grzybni w płodozmianie.
  - 2. Testowanie wybranych szczepów grzybni pod kątem ich efektywności nicieniobójczej w warunkach laboratoryjnych i wazonowych.
  - 3. Ocena zmienności i warunków produkcji 3-oktanonu przez wybrane grzybnie *P. ostreatus*.
  - 4. Opracowanie możliwości wykrywania obecności grzybni *P. ostreatus* w glebie.
- **Cele szczegółowe:**
  - 1 – Sprawdzenie możliwości bójczych wybranych grzybni bocznika na nicienie w warunkach modyfikowanych przez rośliny nicieniobójcze.
  - 2 – Przygotowanie metodyki analitycznej pozwalającej na wykrycie 3-oktanonu koniecznego do realizacji dalszych tematów badawczych.
  - 3 – Ocena możliwości bójczych grzybni bocznika wobec nicieni *C. elegans* w odniesieniu do zdolności do wytwarzania przez nie 3-oktanonu.
  - 4 – Dobór składu pożywki dającej większą skuteczność bójczą.
  - 5 – Wytypowanie, wybór i optymalizacja starterów selektywnych dla grzybni *P. ostreatus*.
  - 6 - Wazonowa ocena właściwości nicieniobójczych grzybni w warunkach oddziaływania roślin nicieniobójczych i buraka.
  - 7 - Ustalenie terminów i warunków dozowania grzybni do gleby oraz badanie wpływu jej obecności na populację *H. schachtii* w warunkach polowych.
- Cele zrealizowano. Mierniki badań - wykonano

# Materiały i metody badań

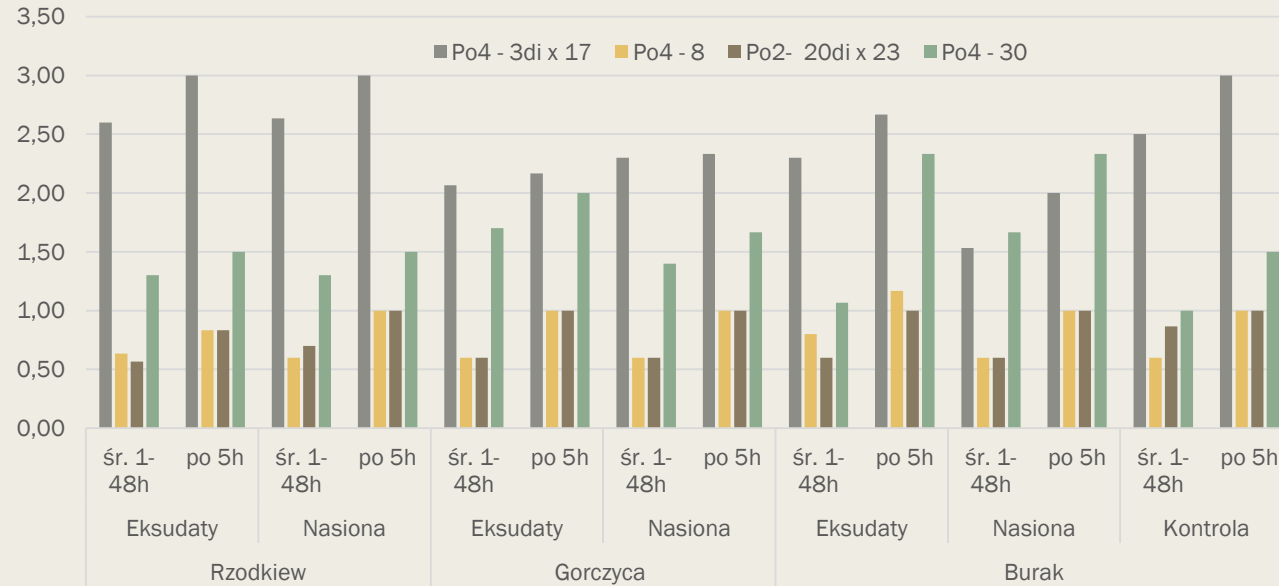
## Materiał badań

1. Heterokariony *Pleurotus ostreatus* Po2- 20di x 23, Po4-14 x 17, Po1-5di x 27, Po4, Po4 -3di x 17 oraz Po4-8 i Po4-30 wyselekcjonowane na podstawie rezultatów badań (cechy rozrostu; agresywność względem badanych nicieni; tolerancja na temperatury).
2. *Caenorhabditis elegans* N2 (fenotyp dziki) – organizm modelowy
3. *Heterodera schachtii* – organizm badany

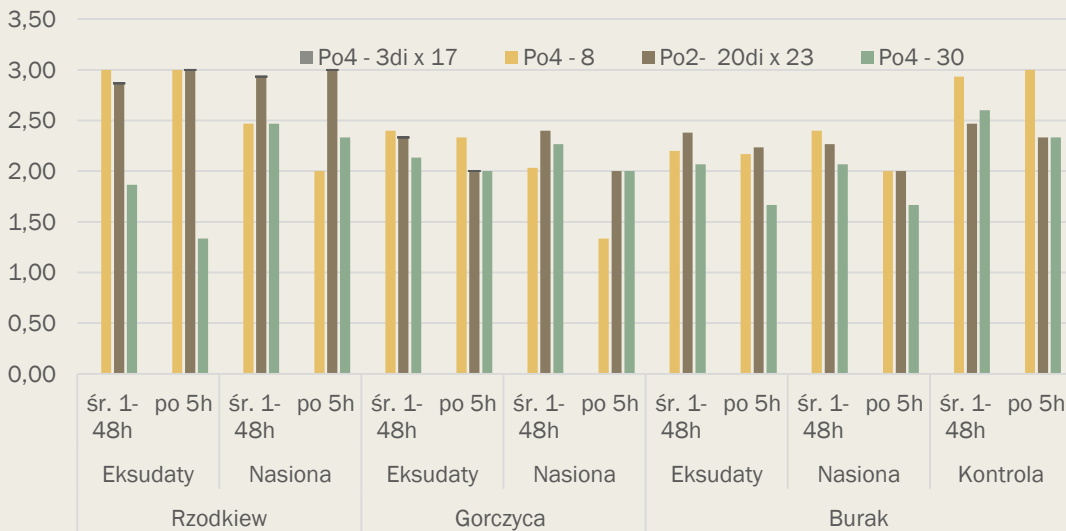
## Metody badawcze

1. Podłoża: agar wodny +: (1) na grzybni wykładano kielkujące nasiona roślin nicieniobójczych (rzodkiew oleista odm. Romesa, gorczyca biała mątwikobójcza odm. Bardena) lub buraka; (2) na grzybni zastosowano eksudaty korzeniowe siewek (w.w. roślin); eksudaty pozyskano przez zanurzenie przez 24 h w 5 ml wody sterylnej dejonizowanej korzeni 10 dobrze wykształconych siewek. Obserwowano tworzenie wypustek toksynotwórczych/ruch *C. elegans*/oplatanie *H. schachtii*; ocena wg. skali 0-3.
2. Określenie parametrów ekstrakcji HS-SPME związków lotnych z badanych grzybnii i analizy GC-MS. Analiza GC-MS zdolności wytwarzania 3-oktanonu przez grzybnie.
3. Badania molekularne prowadzono z wykorzystaniem gotowych kitów, grzybnie do badań hodowano w płynnej pożywce peptonowej; startery użyte w badaniach opracowano z wykorzystaniem narzędzia Primer BLAST.
4. Test wazonowy, gleba zamątwiczona +grzybni boczniaka; warianty: +gorczyca biała odm. Bardena, rzodkiew oleista odm. Romesa; +burak cukrowy odm. Fantazja; kontrola – doniczki z grzybnią bez uprawy roślin (czarny ugór), z gorczycą, z rzodkwią, z burakiem oraz bez grzybni i uprawy roślin (czarny ugór). Oznaczono inicjalny i końcowy poziom populacji *H. schachtii*.
5. Doświadczenie polowe w namiotach hodowlanych z nawadnianiem, część odkryta (warunki polowe), z dwoma terminami dawkowania grzybni *P. ostreatus* Po4 (1 termin - 04.04.2024 r., 2 termin - 19.08.2024 r.). Obsiane roślinami j.w. w wariantach płodozmianu. Określono poziom wyjściowy *H. schachtii*, a następnie po zbiorze gorczycy/rzodkwi/buraka. Zastosowano 3 termin - 08.11.2024r. dawkowania grzybni zaplanowany na zimowanie.

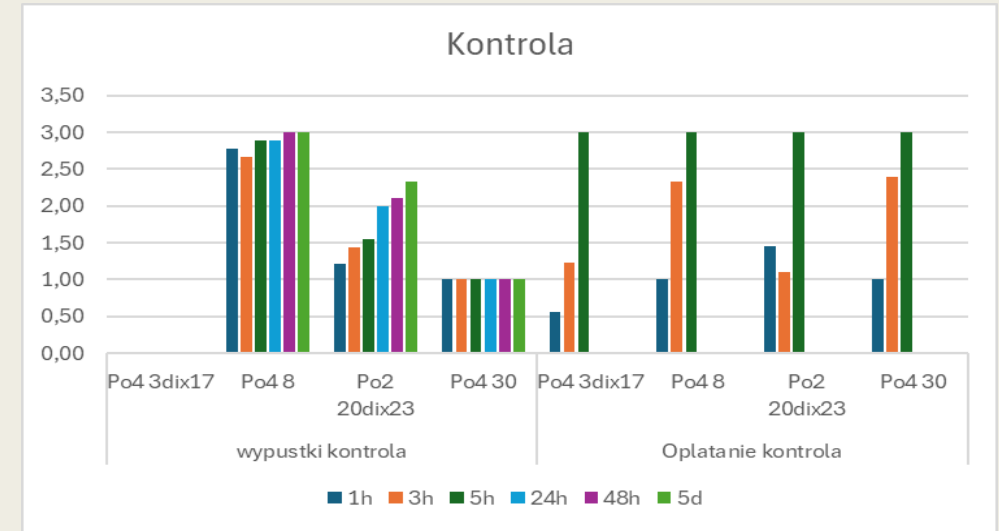
# WYNIKI 1. Temat badawczy 1 - Wpływ roślin (burak i rośliny nicianiobójcze) na zdolności bójcze wybranych grzybni względem nicieni – test na podłożu zagaryzowanym



Wykres. 1. Wpływ badanych grzybni i roślin na żywotność wyrażoną ruchem *C. elegans*



Wykres. 2. Wpływ badanych grzybni i roślin na zdolność wytwarzania toksocyst przez grzybnie pod wpływem obecności *C. elegans*



Wykres. 3. Wytwarzanie toksocyst/wypustek i oplatanie cyst *H. schachtii* przez czyste grzybnie

## Aktywność badanych grzybni wobec cyst *H. schachtii*

Wszystkie badane grzybnie w pełni oplatały cysty *H. schachtii* po 5 dniach w próbach badawczych i w kontroli (Wyk. 3), przy czym nieco słabiej ten proces przebiegał w przypadku grzybni Po4-3di x 17 w próbach z nasionami gorczycy i rzodkwi. Grzybnie Po4-8 i Po2-20di x 23 były dość dobrze stymulowane obecnością eksudatów oraz nasion badanych roślin co zaznaczało się już po 24 h w intensywniejszym wytwarzaniu toksocyst niż pozostałe grzybnie, przy czym grzybnia Po4-8 dobrze i intensywnie wytwarzała toksocysty niezależnie od obecności stymulatorów roślinnych. Grzybnia Po4-30 w próbie kontrolnej tworzyła najmniej toksocyst, a ich poziom był stabilny w całym przebiegu testu kontrolnego, natomiast w badaniu z wykorzystaniem eksudatów i nasion grzybnia ta zachowywała się podobnie stabilnie choć ilość toksocyst była dwukrotnie większa w wariantach z udziałem gorczycy i rzodkwi oraz tak jak w kontroli - w wariantach z burakiem (eksudaty i nasiona). Grzybnia Po4-3di x 17 nie tworzyła toksocyst i najwolniej oplatała cysty *H. schachtii* w testach z gorczycą i rzodkwią (eksudaty i nasiona) (Wyk. 3).

# WYNIKI

## Temat badawczy 2 - Przygotowanie metodyki analitycznej pozwalającej na wykrycie 3-oktanonu i porównanie zdolności jego wytwarzania; Temat badawczy 3 - Ocena zdolności do wytwarzania 3-oktanonu przez wybrane grzybnie



Wybrane do badań parametry ekstrakcji HS-SPME:

- Przygotowanie próbek:

Hodowle: grzybnia *P. ostreatus*, która rosła 8 dni w pożywce wylanej do fiolki typu HS.

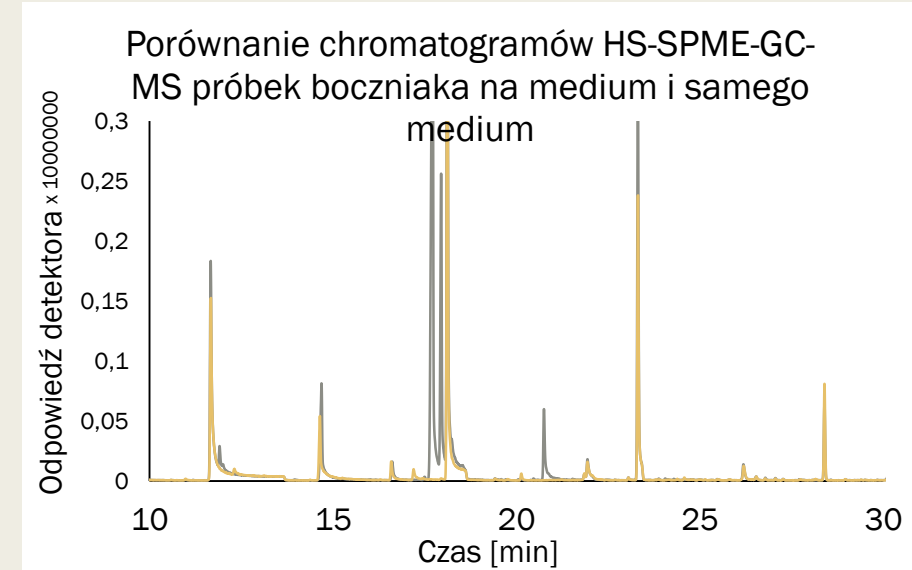
Przed analizą konieczne jest dodanie 0,6 g szklanych kulek, zamknięcie z kapslem z septą fiolki i wytrząsanie pulsacyjne przez 30 minut, w celu otwarcia toksocyst i uwolnienia toksyny.

- Kondycjonowanie próbki: 60 min w 30°C
- Ekstrakcja SPME: z fazy nadpowierzchniowej, czas trwania – 30 min, temperatura – 30°C, włókno SPME – 50/30 µm StableFlex DVB/CAR/PDMS (szare) o długości 2 cm

Parametry analizy GC-MS:

- Tryb iniekcji próbki – bez podziału próbki, po 10-ciu minutach przepłukanie dozownika, temperatura iniekcji – 250°C
- Kolumna: kapilarna ZB5HT, 60 m, średnica wewnętrzna: 0,25 mm, grubość filmu: 0,25 µm
- Program temperaturowy piecyka: 50 °C od 0 do 5 min, 5-220°C w tempie 5°C/min, 220-280°C w tempie 30°C/min.
- Detektor MS: skanowany zakres mas: 30-450 Da

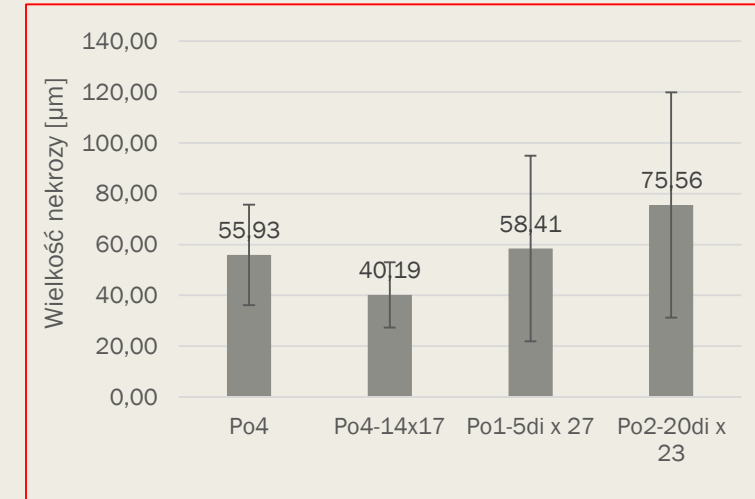
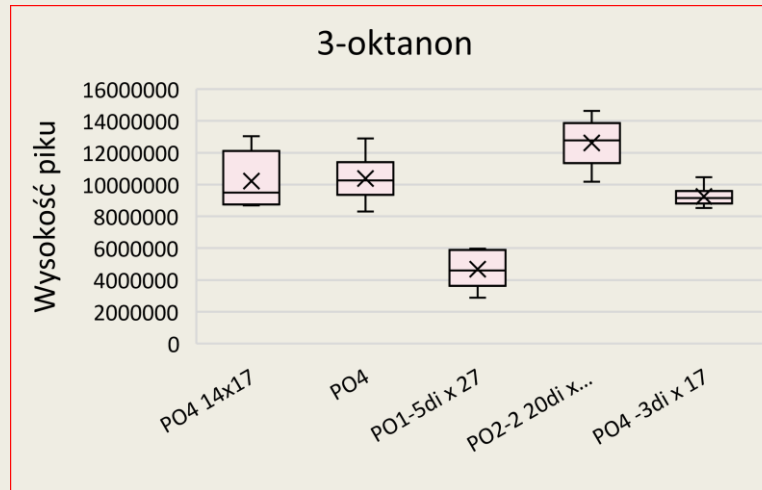
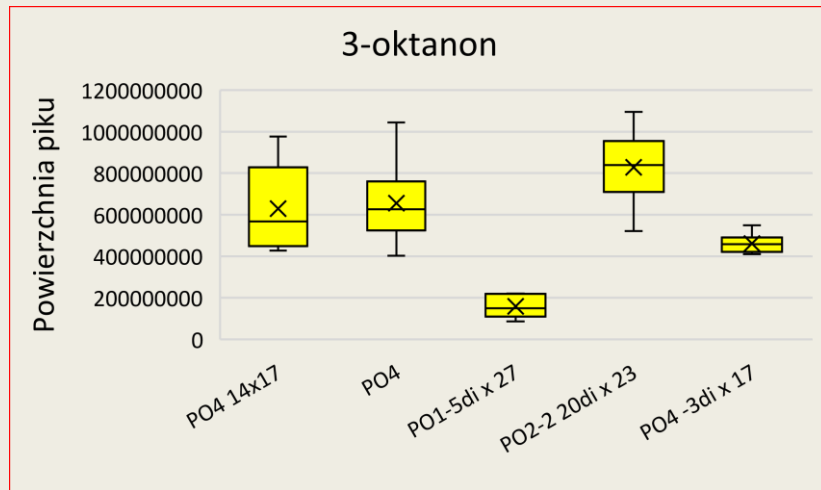
Głównymi wykrytymi składnikami lotnymi próbki bocznika (rosnącego na medium) były **1-okten-3-ol** (CAS 3391-86-4), **3-oktanon** (CAS, 106-68-3). Ponadto wykryto także disiarczek dimetylowy, izomery oktadienu, 1-okten-3-ol, trans-2-oktenal, trans-2-okten-1-ol. Związków tych nie wykryto w profilu lotnym samego medium, zatem można założyć, że ich źródłem jest grzybnia bocznika.



Wykres 4. Porównanie chromatogramów po ekstrakcji HS-SPME podłoża z grzybnią *P. ostreatus* (niebieski) oraz samego podłoża (pomarańczowy)

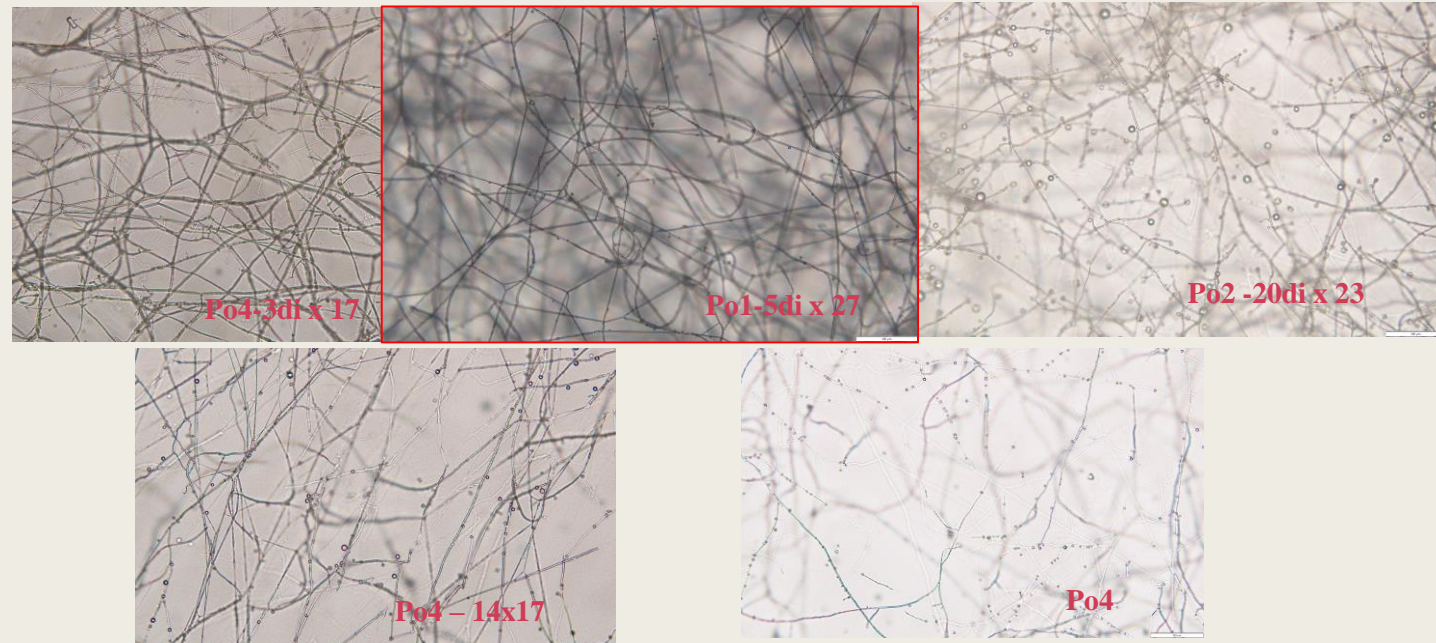
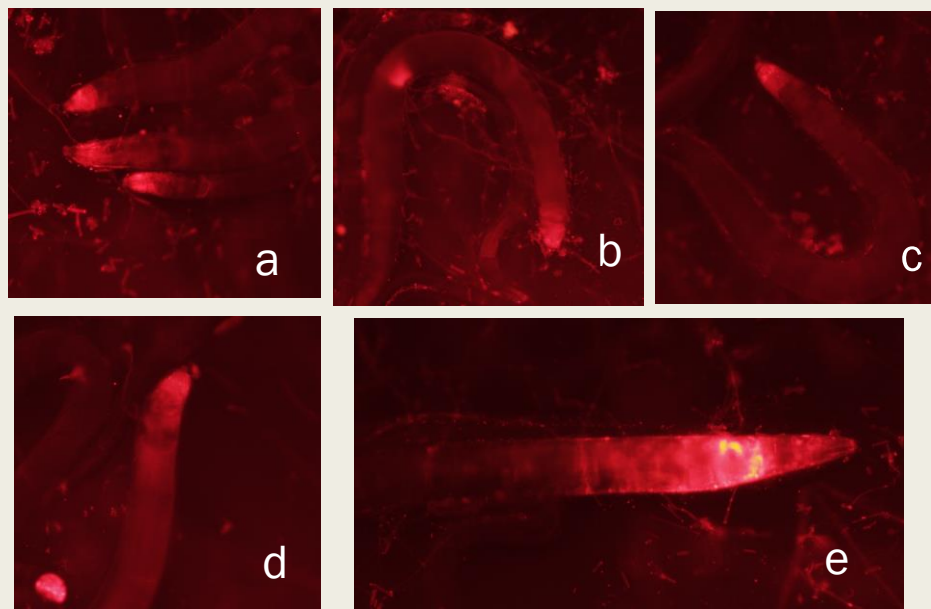
W świetle przeprowadzonych wstępnych badań testowych postanowiono w analizach rzeczywistych próbek nie stosować wzorca wewnętrznego, a jako ilościowy miernik zawartości 3-oktanonu monitorować powierzchnię i wysokość pików w trybie TIC.

# WYNIKI Temat badawczy 3 - Ocena zdolności do wytwarzania 3-oktanonu przez wybrane grzybnie



Wykres 5-6. Zdolność do wytwarzania 3-oktanonu przez różne badane grzybnie mierzona jako powierzchnia pików – lewo, wielkość pików - prawo

Wykres 7. Wielkość nekrozy u *C. elegans* pod wpływem działania grzybnie

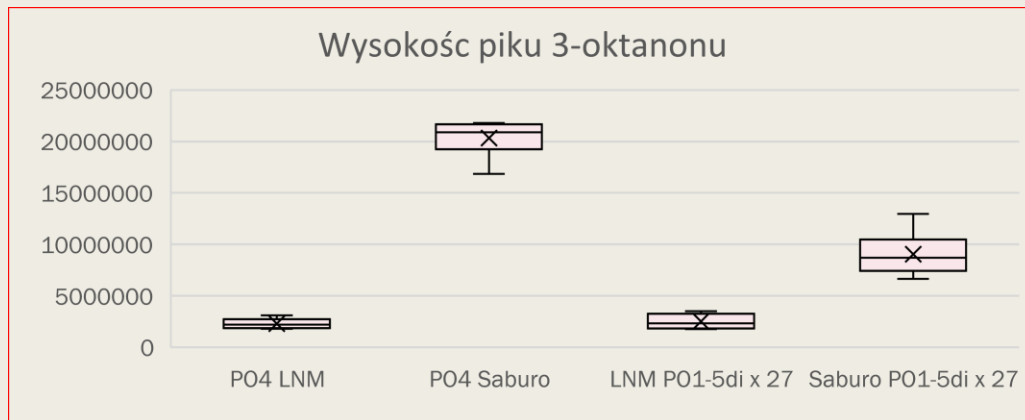
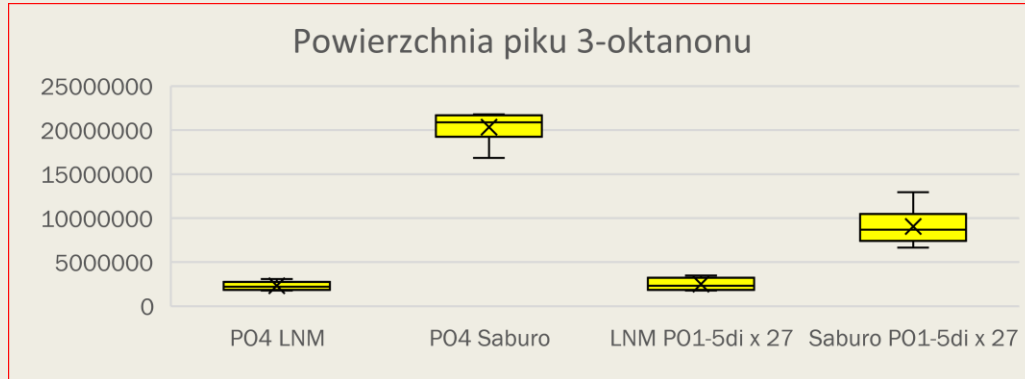


Fot. 1 a-e. Nekrozy u *C. elegans* pod wpływem grzybnie: a, b, c - Po4-14x17; d - Po4; e - Po1-5di x 27;

Fot. 2. Obraz grzybnie wraz z toksocystami

# WYNIKI

## Temat badawczy 4 - Ocena wpływu składu pożywek na zdolność produkcji 3-oktanonu przez wybrane grzybnie modelowe; Temat badawczy 5 - Opracowanie metody molekularnej do wykrycia obecności *P. ostreatus* w glebie



Wykres 7-8. Zdolność do wytwarzania 3-oktanonu (mierzona jako powierzchnia pików – góra, wysokość pików - dół) przez badane grzybnie; LNM - pożywka minimalna; Saburo – pożywka Sabourauda (bogata)

Badano dwie grzybnie - PO4 oraz PO1-5di x 27 i dwie pożywki - LNM oraz Sabourauda. Zawartość 3-oktanonu była znacznie wyższa w grzybniach na pożywce Sabourauda, niż na LNM (Wyk. 7-8). Wynika to najprawdopodobniej z faktu, nikłego porośnięcia grzybnią podłoża LNM. Choć jednocześnie takie grzybnie obficie produkują toksocysty.

Z grupy badanych starterów (Tab. 1) tylko dla dwóch par Pleurotus2F/ Pleurotus2R i Pleurotus10KF/Pleurotus10KR uzyskano pożądany wynik, czyli dodatnie reakcje dla *P. ostreatus* i negatywne dla pozostałych grzybów i roślin. Nie uzyskano z tymi starterami spodziewanego produktu w próbkach gleby, co najprawdopodobniej jest to związane ze zbyt małą ilością/brakiem grzybni w próbce gleby (próbka 250 mg). Jednocześnie w doświadczeniu wazonowym obserwowano grzybnię podstawczakową na powierzchni gleby, a w doświadczeniu polowym, jesienią pojawiły się owocniki, co dowodzi dobrego przetrwania grzybni w glebie.

Tabela 1. Wykaz starterów opracowanych w badaniach

	Nazwa	Sekwencja	Wielkość produktu [pz]	Temperatura hybrydyzacji [°C]
1	Pleurotus1F	ATCTCTGGCTCTCGCATCG	100	54
	Pleurotus1R	CGCAAGGTGCGTTCAAAGAT		
2	Pleurotus2F	TGGGCCTTGTGCCTATAAACC	70	55
	Pleurotus2R	TCTTCATCGATGCGAGAGCC		
3	Pleurotus4F	CATTTAATGGGCCTTGTGCCT	72	54
	Pleurotus4R	ATCGATGCGAGAGCCAAGAG		
4	Pleurotus5F	GGATCTCTGGCTCTCGCAT	102	54
	Pleurotus5R	CGCAAGGTGCGTTCAAAGA		
5	Pleurotus9F	AACGGATCTTTGGCTCTCG	104	53
	Pleurotus9R	GCAAGGTGCGTTCAAAGATTC		
6	Pleurotus1KF	ATCTCTGGCTCTCGCATCG	226	55
	Pleurotus1KR	TAAGAGGAGCCGACCTGTCA		
7	Pleurotus2KF	TGAAGAACGCAGCGAAATGC	79	54
	Pleurotus2KR	CGCAAGGTGCGTTCAAAGAT		
8	Pleurotus4KF	TGTTTGGATTGTTGGGGGCT	88	55
	Pleurotus4KR	CATCATGCGCAGAGGCAATG		
9	Pleurotus7KF	GAACGCAGCGAAATGCGATA	237	54
	Pleurotus7KR	ATGCGCAGAGGCAATGAGAA		
10	Pleurotus10KF	TGACAGGTCGGCTCCTCTTA	132	54
	Pleurotus10KR	TCAAATTGTCCTTGCAGACG		
K	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	400-900	49
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

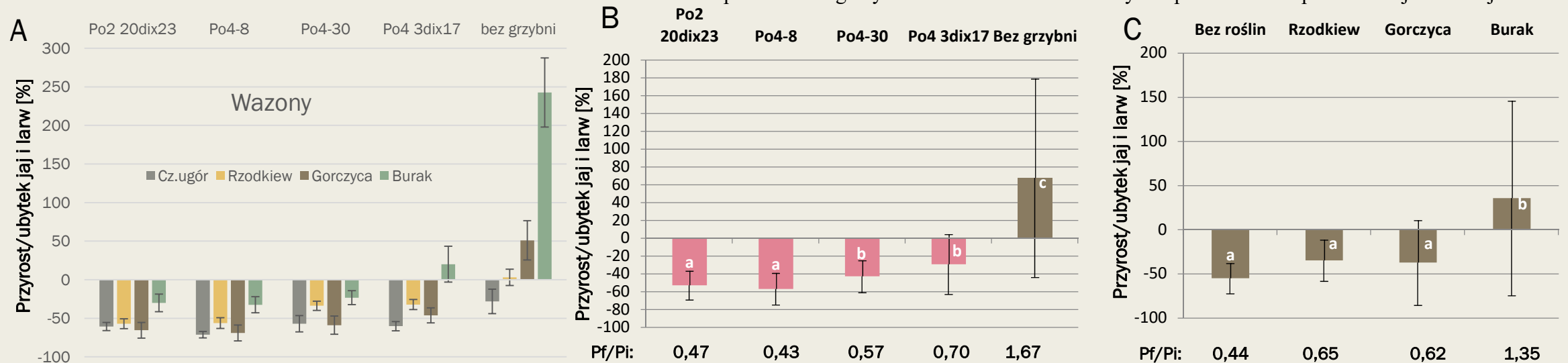
# Wyniki

## Temat badawczy 6 - Wpływ roślin (burak i rośliny nienieniobójcze) na zdolności bójcze wybranych grzybni względem nicieni – test wazonowy (na podłożu glebowym)

Badane grzybnie bocznika różniły się w zakresie ich oddziaływania mątwikobójczego. Stwierdzono, że najskuteczniejszym działaniem antymątwikowym charakteryzowały się grzybnie Po2-20dix23 i Po4-8. Zaobserwowano, że inokulacja grzybniami *P. ostreatus* w połączeniu z wegetacją rzodkwi oleistej i gorczycy białej przyczyniła się do istotnej poprawy działania antymątwikowego w porównaniu do odpowiadających im wariantów kontrolnych. Nie wykazano statystycznie istotnego wpływu wegetacji rzodkwi oleistej i gorczycy białej na liczebność *H. schachtii* w porównaniu do wariantów bez roślin,



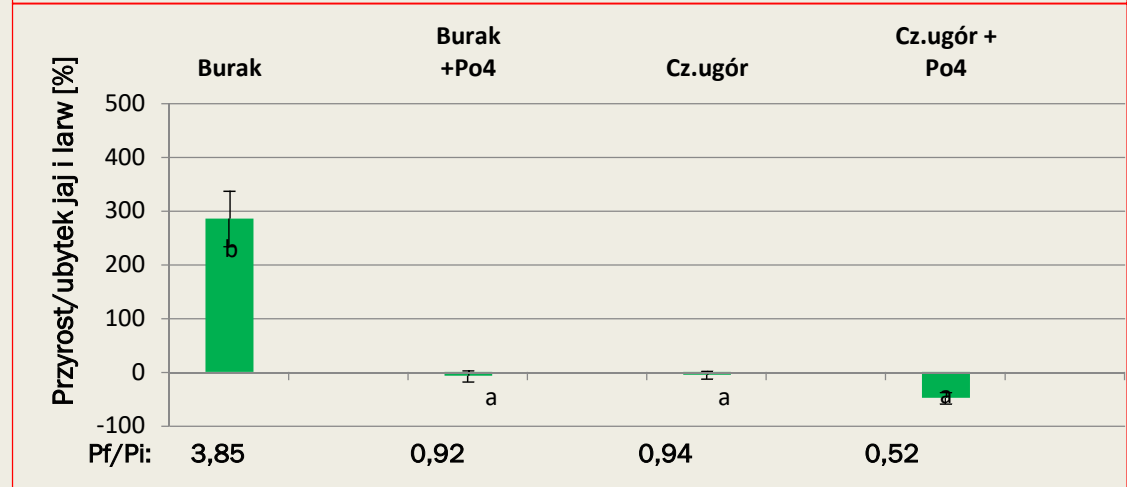
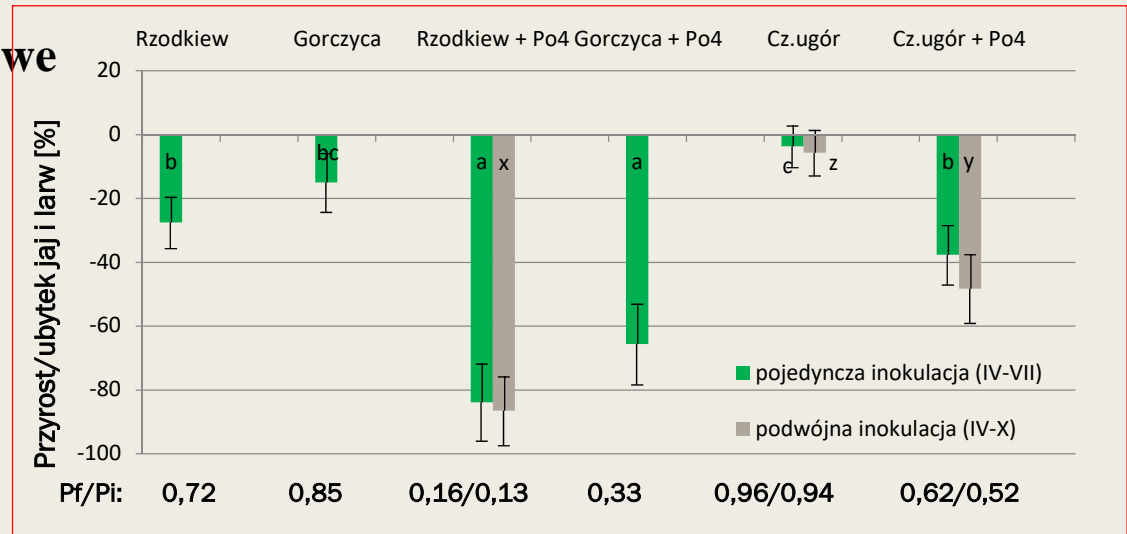
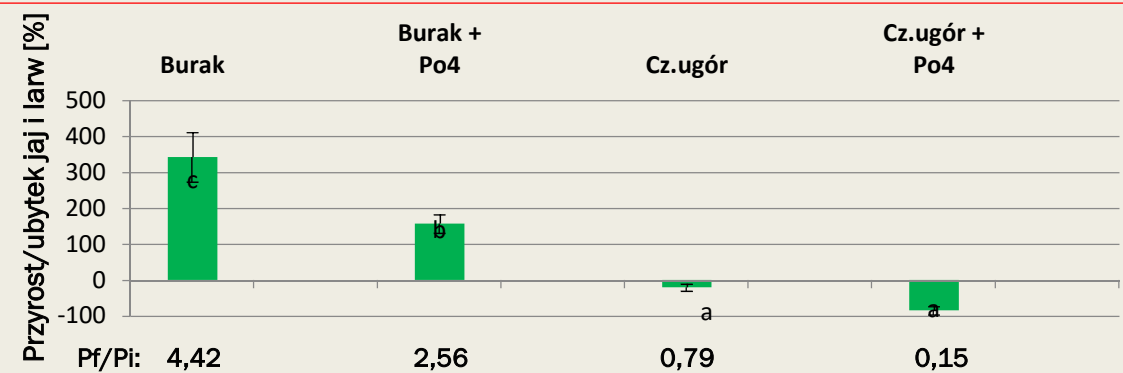
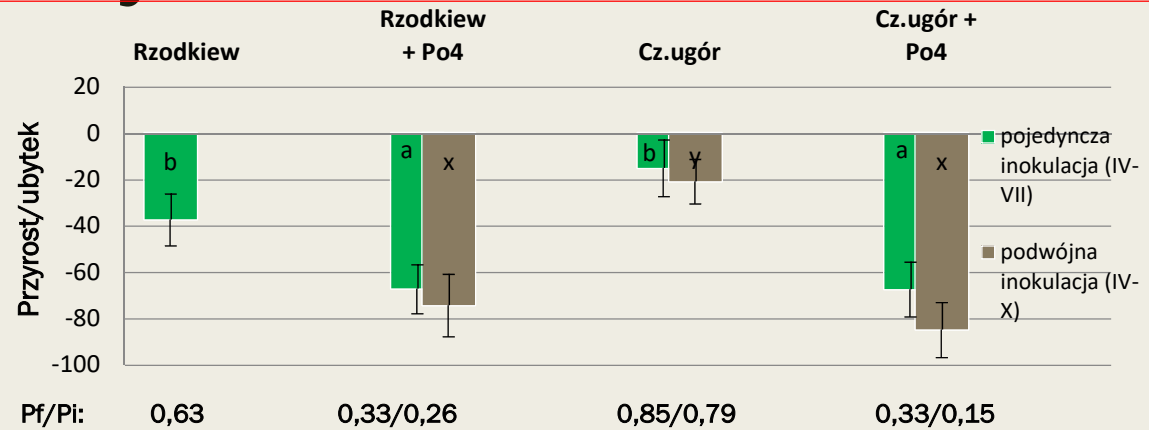
Fot. 1-2. Fragment dośw. wazonowego – na lewo; na prawo - grzybnia strzępkowa *P. ostreatus* widoczna na powierzchni gleby w doświadczeniu wazonowym – potwierdzenie prawidłowej inokulacji



Wykres 9-11. Wpływ genotypu grzybni *P. ostreatus* na liczebność populacji nicienia *H. schachtii* – doświadczenia wazonowe  
 Pi – liczba żywych jaj i larw *H. schachtii* oznaczona na początku doświadczenia; Pf – finalna populacja nicienia; a-c – przedziały istotności czynnika (A – współdziałanie grzybni i roślin; B – efekt działania grzybni; C – efekt działania roślin mątwikobójczych i buraka)



# Wyniki Temat badawczy 7 - Doświadczenie polowe



Wykres 12-13. Wpływ uprawy rzodkwi olejowej w plonie głównym i buraka na stanowiskach zasiedlonych *P. ostreatus* na populację mątwika burakowego (*H. schachtii*). Doświadczenie polowe (odkryte namioty)

Wykres 14-15. Wpływ uprawy rzodkwi olejowej w plonie głównym i buraka na stanowiskach zasiedlonych *P. ostreatus* na populację mątwika burakowego (*H. schachtii*). Doświadczenie polowe (zakryte namioty)



Fot. 3. Owockniki *P. ostreatus* widoczne na powierzchni gleby w międzyplonowej uprawie rzodkwi olejowej – potwierdzenie prawidłowej inokulacji (X.2024)



Fot. 4-5. Objawy porażenia buraka mątwikiem burakowym (X.2024)



Nie stwierdzono negatywnego oddziaływania grzybni boczniaka ostrygowatego na plonowanie rzodkwi olejowej oraz gorzycy białej oraz na plonowanie i wartość przetwórczą korzeni buraka.

# Wnioski

1. Głównymi wykrytymi składnikami lotnymi próbki bocznika (rosnącego na medium) były **1-okten-3-ol** (CAS 3391-86-4), **3-oktanon** (CAS, 106-68-3).
2. Potwierdzono zróżnicowanie zdolności do wytwarzania 3-oktanonu wśród potomstwa *P. ostreatus*. Większą zdolnością do produkcji tego związku cechowały się grzybnie Po2-20di x 23, Po4-14 x 17, Po4, a grzybnie Po1-5di x 27, Po4 -3di x 17 produkowały mniej 3-oktanonu, przy czym tylko dla szczepu Po1-5di x 27 cecha ta istotnie różni się statystycznie od pozostałych szczepów.
3. Zdolność do produkcji 3-oktanonu nie koreluje z rozmiarem nekrozy u *C. elegans*, choć w przypadku Po4-3di x 17 nie zanotowano zdolności bójczych pomimo wytwarzania 3-oktanonu i braku toksocyst.
4. Podłoże hodowlane (zawierające peptydy/lub ubogie) ma wpływ na ilość produkowanego 3-oktanonu; więcej powstawało go na podłożu bogatym.
5. Obecność roślin mątwikobójczych może stymulować grzybnie w zakresie ich działania bójczego, wyrażonego ruchem *C. elegans*, tworzeniem toksocyst i zdolnością do oplatania cyst *H. schachtii*, przy czym najkorzystniej działa rzodkiew oleista odm. Romesa.
6. Wykazano bardzo korzystny wpływ stosowania grzybni *P. ostreatus* w uprawie buraka cukrowego na spadek liczebności populacji patogenicznego nicienia *H. schachtii*.
7. Udowodniono, że inokulowana grzybnia wykazuje zdolności przetrwania w środowisku glebowym pomimo braku systemu nawadniającego oraz mimo braku możliwości wykrywania grzybni metodą molekularną.
8. Stwierdzono, że pomimo istotnego ograniczenia namnażania nicienia *H. schachtii* przy jednoczesnej uprawie buraka cukrowego, korzystniejszą metodą fitosanitarnego wykorzystania grzybni *P. ostreatus* w uprawach polowych jest równoczesny z grzybnią siew rzodkwi oleistej.
9. Nie odnotowano negatywnego wpływu grzybni *P. ostreatus* na wzrost i rozwój buraka cukrowego i rzodkwi oleistej.
10. Wykazano, że ze względu na obiecujące rezultaty badań, uzasadniona jest ich kontynuacja.