

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 2025 R

Wykonawcy:

Dr hab. Ewa Moliszewska, prof. UO (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 2025 r.

Cel podstawowy – poszukiwanie efektywnych grzybni i warunków do rozrostu i funkcjonowania bójczego grzybni *P. ostreatus* w warunkach gleby rolniczej - kontynuacja badań.

Cele pośrednie:

1. Określenie i potwierdzenie 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 produkcji w czasie 3-oktanonu i 1-okten-3-olu przez grzybnię *P. ostreatus*.
4. Badanie wpływu 3-oktanonu i 1-okten-3-olu na nicienie *C. elegans* i *H. schachtii*.

Cele szczegółowe:

1. Wpływ roślin (burak i rośliny nicieniobójcze) na zdolności bójcze wybranych grzybni względem nicieni – test na podłożu zagaryzowanym
2. Ocena zmienności produkcji w czasie 3-oktanonu i 1-okten-3-olu przez wybrane grzybnie *P. ostreatus*
3. Wpływ substancji 3-oktanonu i 1-okten-3-olu na nicienie *C. elegans* i *H. schachtii* – opracowanie metodologii badań
4. Wpływ 3-oktanonu i 1-okten-3-olu na nicienie *C. elegans* i *H. schachtii*.
5. Wpływ roślin (burak i rośliny nicieniobójcze) na zdolności bójcze wybranych grzybni względem nicieni – test wazonowy (na podłożu glebowym)
6. Doświadczenie polowe (wstępne) – terminy dozowania grzybni/przeżywanie grzybni w glebie, zdolności bójcze grzybni względem mątwika burakowego; oddziaływanie roślin oraz wybranych grzybni

Materiały i metody badań

Materiały badań

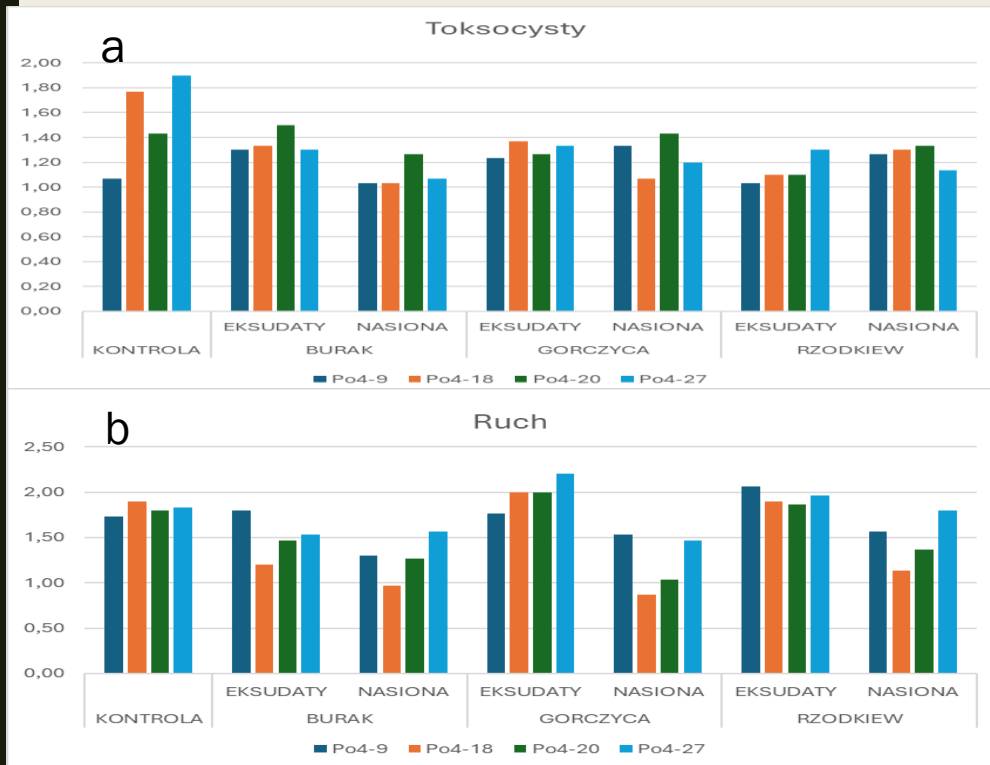
1. Grzybnie: homokariony *P. ostreatus* Po4-9, Po4-18, Po4-20, Po4-27, heterokariony: Po4, Po4-2dix1, Po4-14x17, Po1- 5dix27
2. Nicienie: *Caenorhabditis elegans* N2 (fenotyp dziki) – organizm modelowy; *Heterodera schachtii* – organizm badany
3. Rośliny: rzodkiew oleista odm. Romesa, gorczyca biała mątwikobójcza odm. Bardena, burak cukrowy odm. Fantazja i Janetka
4. Substancje: 3-oktanon, 1-okten-3-ol, etanol, olej parafinowy, DMSO

Metody badawcze

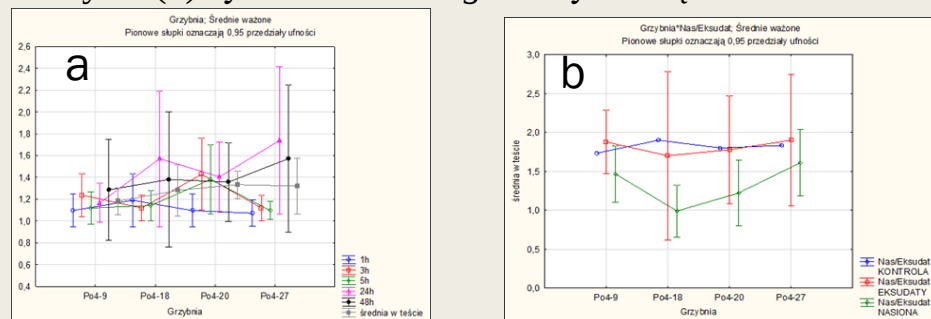
1. Podłoża: agar wodny + grzybnia: (1) na grzybni wykładano kiełkujące nasiona roślin nicieniobójczych (rzodkiew oleista odm. Romesa, gorczyca biała mątwikobójcza odm. Bardena) lub buraka; (2) na grzybni zastosowano eksudaty korzeniowe siewek (ww. roślin); eksudaty pozyskano przez zanurzenie przez 24 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. Opracowanie metodologii badań i dobór rozpuszczalnika dla oceny wpływu 3-oktanonu i 1-okten-3-olu na nicienie.
3. Ocena dawek negatywnego/bójczego wpływu 3-oktanonu i 1-okten-3-olu na nicienie w bezpośrednim kontakcie z s.a.
4. Ekstrakcji HS-SPME związków lotnych z badanej grzybni w czasie i analizy GC-MS wytwarzania 3-oktanonu i 1-okten-3-olu przez grzybnię w czasie; określenie zmian w czasie zawartości obu związków w profilu lotnym HS-SPME-GC-MS związków lotnych (VOC) poprzez analizę wielkości pików dla tych substancji.
5. Test wazonowy, gleba zamątwiczona + grzybnia boczniaka; warianty: + gorczyca biała odm. Bardena, rzodkiew oleista odm. Romesa; + burak cukrowy odm. Fantazja; kontrola – doniczki z grzybnią bez uprawy roślin (czarny ugór), z gorzycą, z rzodkwią, z burakiem oraz bez grzybni i uprawy roślin (czarny ugór). Oznaczono inicjalny i końcowy poziom populacji *H. schachtii*.
6. Doświadczenie polowe w namiotach hodowlanych z nawadnianiem, część odkryta (warunki polowe), z dwoma terminami dawkowania grzybni *P. ostreatus* Po4 (1 termin - 17.04.2025r., 2 termin dla międzyplonów - 08.08.2025 r.). Obsiane roślinami j.w. w wariantach płodozmianu. Określono poziom wyjściowy *H. schachtii*, a następnie po zbiorze gorzycy/rzodkwi/buraka. Siew 17.04.2025 r., zbiór 25.07.2025 r.; międzyplon - siew 08.08.2025 r., zbiór 23.10.2025 r., zbiór buraka cukrowego - 23.10.2025 r..

WYNIKI

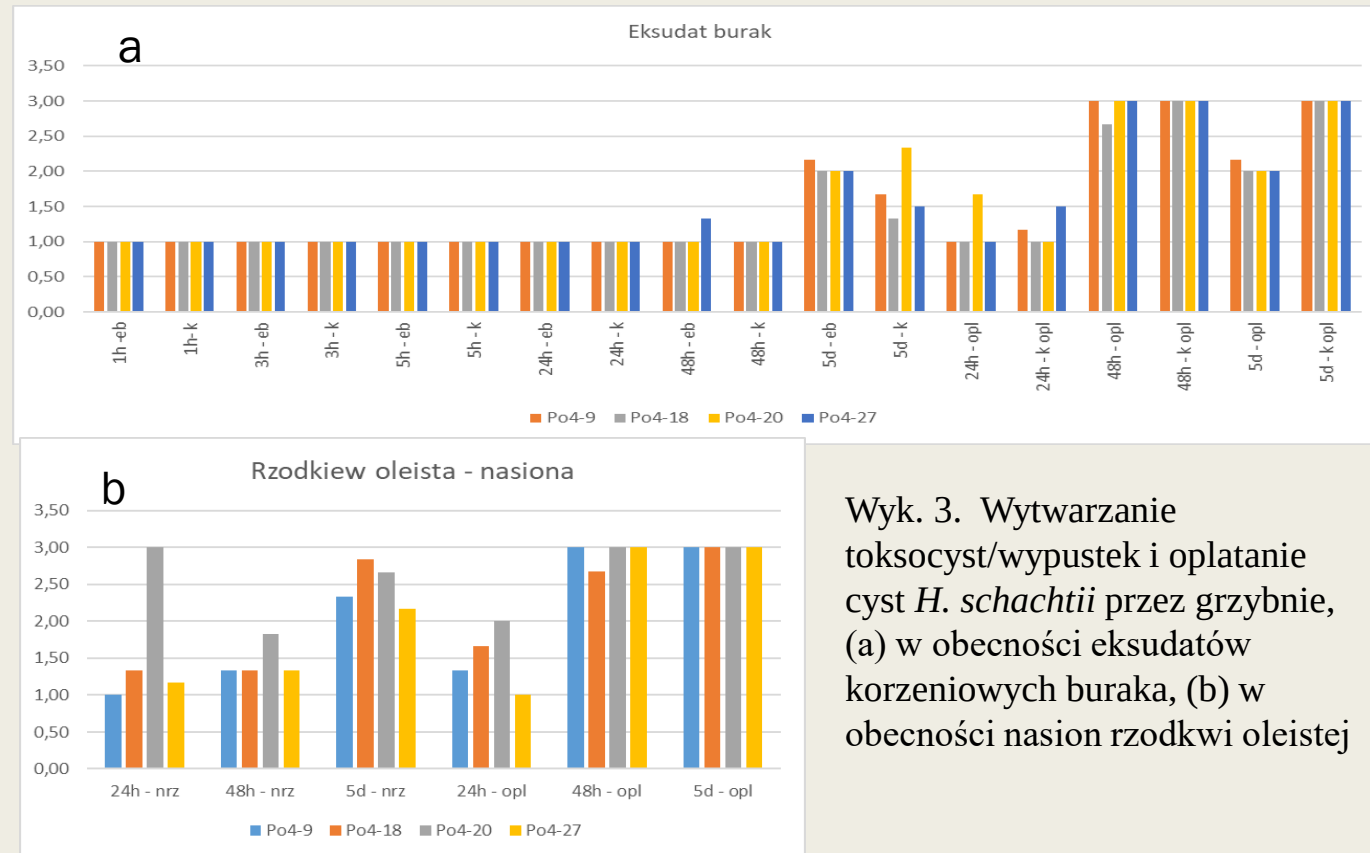
1. Temat badawczy 1 - Wpływ roślin (burak i rośliny nicianiobójcze) na zdolności bójcze wybranych grzybní względem nicieni – test na podłożu zagaryzowanym



Wyk. 1. Wpływ badanych grzybní i roślin na (a) wytwarzanie toksocyst i (b) żywotność *C. elegans* wyrażoną ruchem



Wyk. 2. Wpływ badanych grzybní i roślin na (a) zdolność wytwarzania toksocyst w czasie i (b) na ruch *C. elegans*



Wyk. 3. Wytwarzanie toksocyst/wypustek i oplatanie cyst *H. schachtii* przez grzybní, (a) w obecności eksudatów korzeniowych buraka, (b) w obecności nasion rzodkwi oleistej

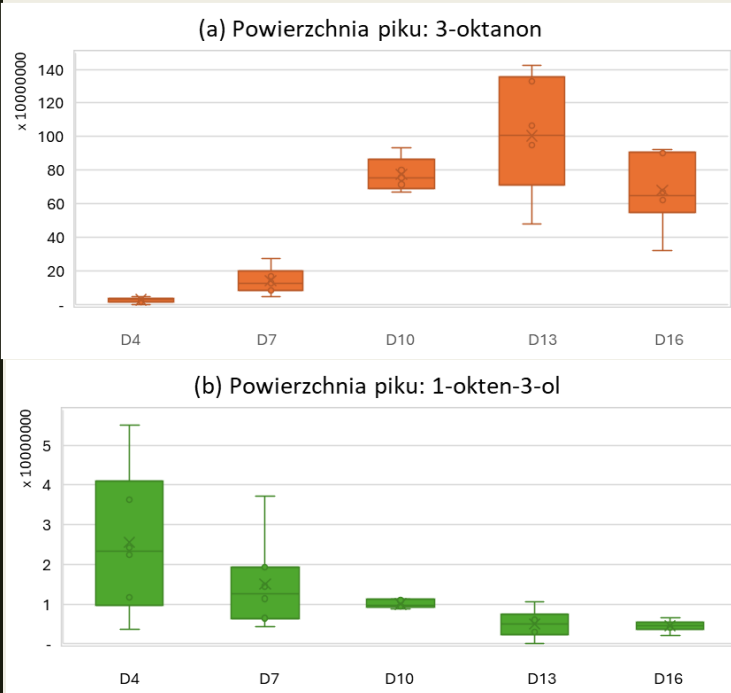
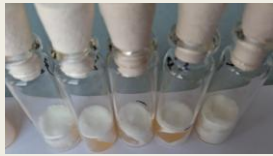
Aktywność badanych grzybní wobec nicieni *C. elegans* i cyst *H. schachtii*

Oddziaływanie badanych grzybní na nicienie *C. elegans* nie podlegało istotnemu różnicowaniu statystycznemu, choć można zauważyć pomiędzy nimi pewne różnice przejawiające się w tendencji do efektywności działania. Lepszymi parametrami bójczymi, niż inne grzybní, cechowała się grzybnia Po4-18.

W odniesieniu do *H. schachtii* grzybní zachowywały się podobnie, choć poziom wytworzenia toksocyst był nieco mniejszy niż w obecności *C. elegans*. Grzybní aktywnie oplatały cysty *H. schachtii*, co rozpoczynało się po 24 h trwania testu i było bardzo wyraźnie widoczne po 2 i 5 dniach. Czas ten jest czasem nieco krótszym niż typowe wylęganie larw *H. schachtii*.

WYNIKI

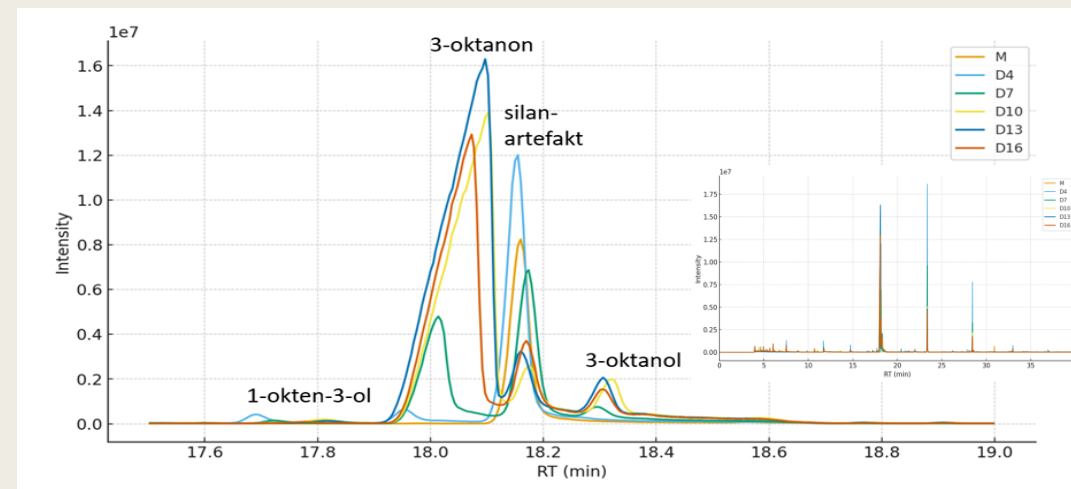
Temat badawczy 2 – Ocena zmienności produkcji w czasie 3-oktanonu i 1-okten-3-olu przez *P. ostreatus*



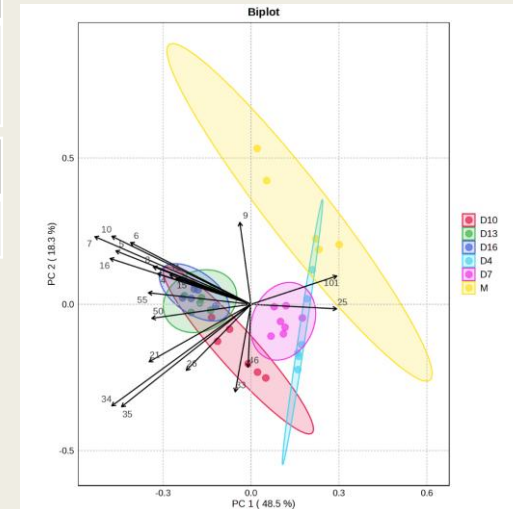
Wyk 4. Wielkość pików wyrażona jako powierzchnia dla (a) 3-oktanonu i (b) okten-3-olu dla hodowli *P. ostreatus* o różnym stopniu „dojrzałości”; D4, D7.. – kolejne dni hodowli

Tabela 1. Identyfikacja związków lotnych wydzielanych z grzybni *P. ostreatus*; D1..D16 – dni hodowli

ID	T _R	Identyfikacja	LRI		Mediu m	Hodowla <i>P. ostreatus</i>				
			LRI _{exp}	LRI _{ref}		D4	D7	D10	D13	D16
33	17.79	1-Octen-3-ol	983	980	0.16	15.0 1	6.94	1.35	0.59	0.83
34	18.16	3-Octanone	993	985	0.37	14.1 3	46.9 6	72.8 8	72.9 9	64.8 9



Wyk. 5. Chromatogramy HS-SPME-GC-MS dla medium (M) oraz kolejnych dni hodowli (D); powiększenie dla obszaru elucji pomiędzy 17,5 i 19 minutą; pomniejszony wykres – całe chromatogramy



Wyk. 6. Biplot z analizy PCA wykonanej na pełnym profilu lotnych metabolitów (wartości bezwzględne powierzchni pików). Dane zostały centrowane i zlogarytmowane (log10)

W czasie hodowli grzybni *P. ostreatus* następuje zmiana w produkcji dla 1-okten-3-olu która w D4 jest najwyższa i stopniowo spada do D13, natomiast produkcja 3-oktanonu i jego udziały względne w profilu VOC rosną od 4. dnia hodowli do 10.-13. Dnia, gdy osiągają najwyższe wartości, i następnie w 16. dniu nieznacznie spadają. Oznacza to, że już w 4-tym dniu hodowli 3-oktanon stanowi zauważalny komponent profilu VOC, na poziomie zbliżonym do 1-okten-3-olu, a między D4 a D7 obserwuje się bardzo silny wzrost jego udziału. W dniach D10 i D13 3-oktanon osiąga wartości powyżej 70%, stając się zdecydowanie dominującym składnikiem frakcji lotnej. Badanie wskazuje, iż grzybnia może być bardziej skuteczna w działaniu paraliżującym nicienie w pełnej dojrzałości.

WYNIKI

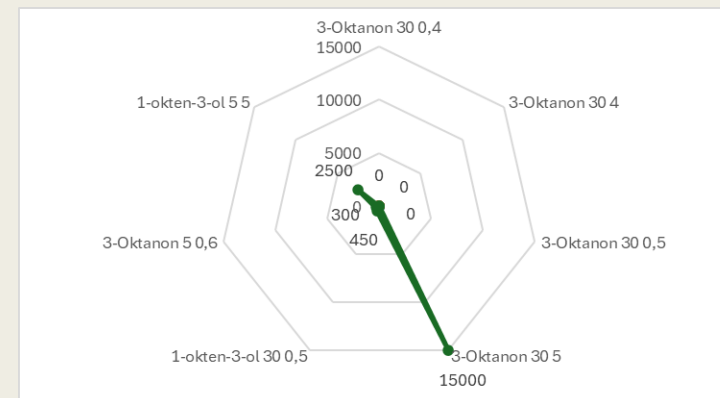
Temat badawczy 3 - Wpływ substancji 3-oktanonu i 1-okten-3-olu na nicienie *C. elegans* i *H. schachtii* – opracowanie metodologii badań

Temat badawczy 4 – Wpływ 3-oktanonu i 1-okten-3-olu na nicienie *C. elegans* i *H. schachtii*

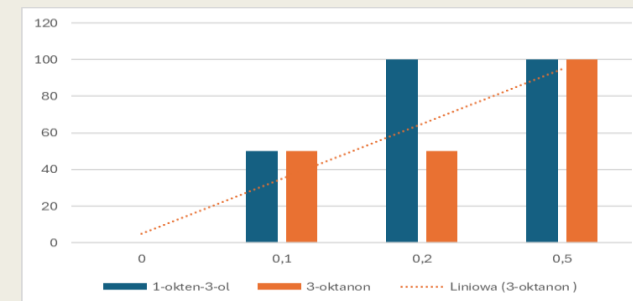
Do badań jako rozpuszczalniki wybrano:

1. DMSO – jako rozpuszczalnik typowo stosowany w naukach przyrodniczych/biologicznych;
2. Etanol – typowy rozpuszczalnik;
3. Olej parafinowy – rozpuszczalnik stosowany przez Lee i wsp. (2023), wg informacji uzyskanej od autorów.

Test przygotowano w 12–dołkowych płytkach do hodowli komórkowych z płaskim dnem. Do dołków naniesiono cienką warstwę agarozę, na której umieszczono po 20 μ l hodowli nicieni (zawiesina w pożywce LB). Wcześniej przygotowano 3-oktanon i 1-okten-3-ol jako roztwory wzorcowe do badań: roztwory przygotowano w ten sposób że zmieszano 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% badanej substancji w w/w rozpuszczalniku. Następnie naniesiono do przygotowanych dołków po 1 lub 10 μ l takiej mieszaniny. Obserwacje prowadzono po 5, 10, 15, 30 min. W kolejnym podejściu test zmodyfikowano w ten sposób, że zamiast płytki hodowlanej wykorzystano probówki eppendorfa o poj. 1,5 ml ze szczelną pokrywką. Test zaplanowano tak, że do probówek wprowadzono oczyszczoną z bakterii *E. coli* OP50 zawiesinę nicieni w PBS w ilości 500 μ l, a następnie dodawano po 1 lub 10 μ l badanych związków w stężeniu 50% w badanych rozpuszczalnikach. Jako kontrole zastosowano probówki z czystymi rozpuszczalnikami w tych samych ilościach. Ocenę żywotności prowadzono po delikatnym wymieszaniu i pobraniu kropli zawiesiny nicieni i umieszczeniu na szkiełku mikroskopowym. Obserwacje prowadzono pod mikroskopem z powiększeniem obiektywu 10 i 20 x. W rezultacie stwierdzono, że rozpuszczalniki jako dodatki po 1 i 10 μ l do hodowli nie są toksyczne w przeciągu 0,5 h do 2 h, zatem nadają się do wykorzystania w testach w zamkniętych probówkach.



Wyk. 7. Zakres śmiertelności 3-oktanonu i 1-okten-3-olu; pierwsza cyfra po nazwie związku oznacza czas działania w minutach, a druga - stężenie s.a. w μ l



Wyk. 8. Śmiertelność nicieni *C. elegans* w zależności od dawki substancji aktywnej; dawka podana w % [v:v]

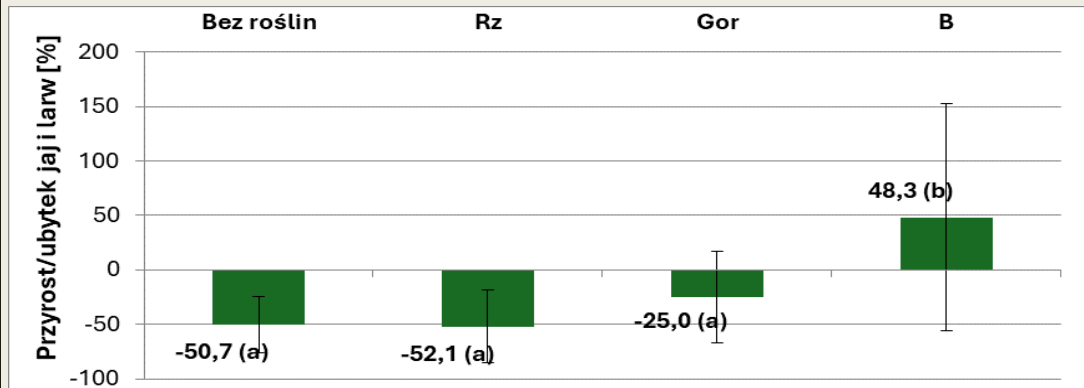
- Dawka śmiertelna dla *C. elegans* w przypadku 3-oktanonu wynosi 0,1-0,2 % (v:v), natomiast dla 1-okten-3-olu jest ona wyższa i wynosi 0,25-0,3 % (v:v). Larwy są bardziej wrażliwe niż osobniki L4. Dawki powyżej 0,5% s.a. są bezwzględnie paraliżujące i śmiertelne dla nicieni *C. elegans*, a działanie obu substancji aktywnych jest natychmiastowe. Niskie dawki mogą powodować przejściowy paraliż.
- Obie substancje działają kontaktowo i prawdopodobnie także jako frakcja lotna. Z uwagi na charakter substancji ich możliwości wykorzystania w czystej postaci jako potencjalnego środka są ograniczone, ale kwestią otwartą pozostaje ewentualne opracowanie specjalnego dawkowania lub nośnika.

WYNIKI

Temat badawczy 5 - Wpływ roślin (burak i rośliny nicianiobójcze) na zdolności bójcze grzybni względem nicieni – test wazonowy/szklarniowy (na podłożu glebowym)

Tabela 2. Wykaz początkowej wartości Pi w doświadczeniu wazonowym

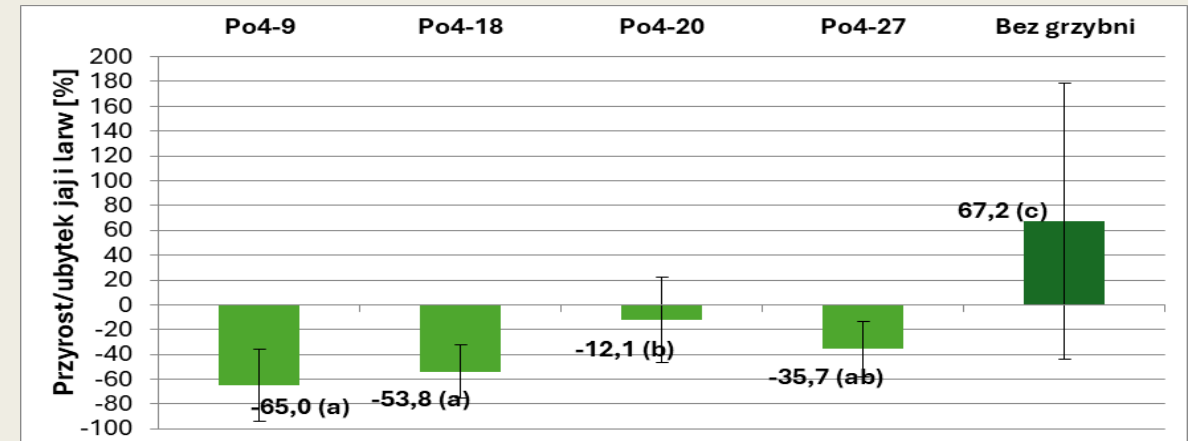
	Po4-9	Po4-18	Po4-20	Po4-27	Kontrola (bez grzybni)
Czu*	1073	1023	1552	1392	1154
+ Rz	1023	1552	1552	1392	1154
+ Gor	1023	1552	1392	1392	1154
+ B	1023	1552	1392	1154	1154



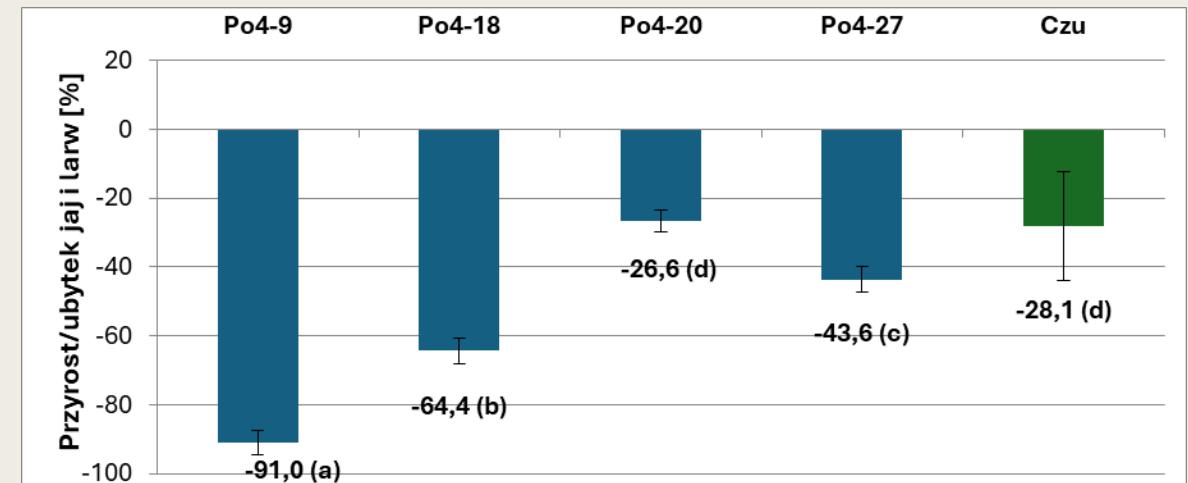
Wyk. 9. Wpływ wegetacji wybranych gatunków roślin na liczebność populacji nicienia *H. schachtii* – średnie w doświadczeniu wazonowym; Rz – rzodkiew oleista; Gor – gorczyca biała; B – burak cukrowy; a-e – przedziały istotności dla interakcji– dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny

W wyniku przeprowadzonych badań:

- stwierdzono, że najskuteczniejszym działaniem antymatwиковym charakteryzowały się grzybnie Po4-9 i Po4-18; nie wykazano statystycznie istotnego wpływu wegetacji rzodkwi oleistej i gorczycy białej na liczebność *H. schachtii* w porównaniu do wariantów bez roślin,
- odnotowano zróżnicowanie pomiędzy badanymi genotypami boczniaka w zakresie ich oddziaływania matwиковobójczego,



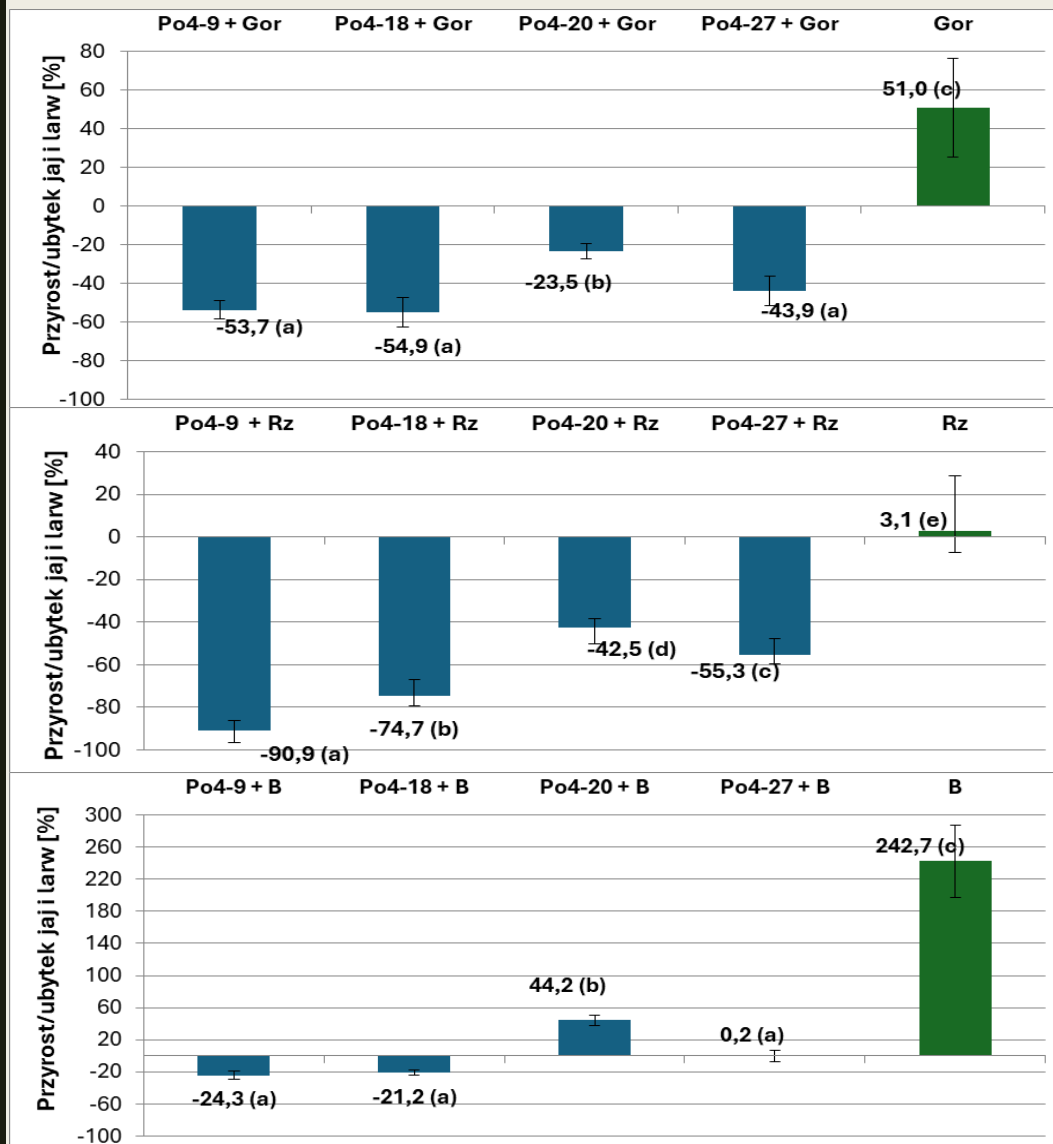
Wyk. 10. Wpływ grzybni *P. ostreatus* na liczebność populacji nicienia *H. schachtii* – doświadczenie wazonowe (średnie w doświadczeniu) a-e – przedziały istotności dla interakcji– dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny



Wyk. 11. Wpływ wybranych grzybni *P. ostreatus* na liczebność populacji nicienia *H. schachtii*; a-e – przedziały istotności dla interakcji– dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny

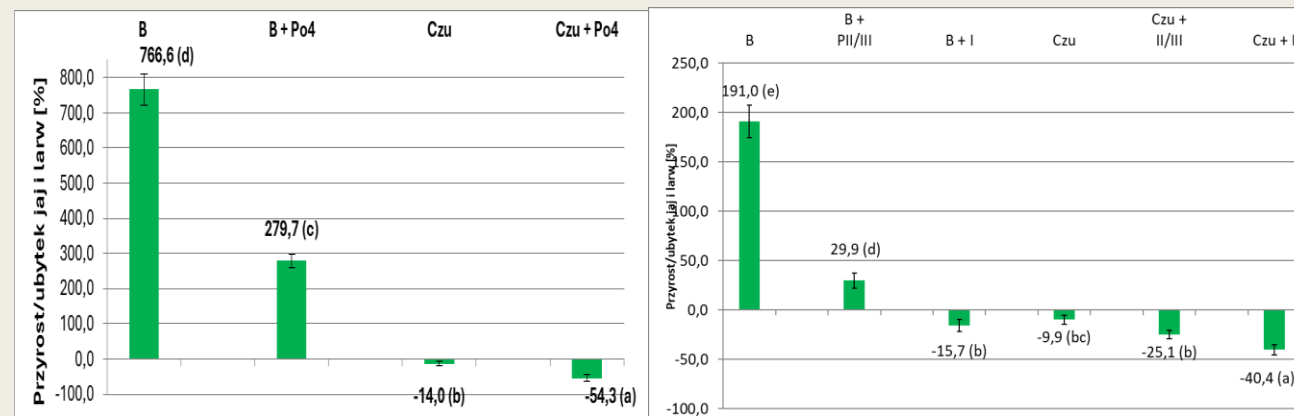
WYNIKI

Temat badawczy 5 – c.d. /Temat badawczy 6 - Doświadczenie polowe (wstępne) – terminy dozowania grzybni/przeżywanie grzybni w glebie, zdolności bójcze grzybni względem mątwika burakowego; oddziaływanie roślin



W doświadczeniu wazonowym:

- zaobserwowano, że inokulacja grzybniami *P. ostreatus* w połączeniu z wegetacją rzodkwi olejowej i gorczycy białej przyczyniła się do istotnej poprawy działania antymątwikowego w porównaniu do odpowiadających im wariantów kontrolnych,
- badane grzybnie nie powodowały przyrostu populacji mątwika burakowego w warunkach uprawy z burakiem cukrowym,
- wykazano wysoką skuteczność grzybni bocznika stosowanej w uprawie buraka cukrowego, co stanowi potencjalne rozwiązanie problemu nasilonego występowania mątwika burakowego w warunkach hodowlanych, które ze względów logistycznych wymuszają nierzadko uprawę monokulturową.,



Wyk. 15-16. Wpływ uprawy buraka cukrowego na stanowiskach zasiedlonych *P. ostreatus* na populację mątwika burakowego (*H. schachtii*). Doświadczenie polowe; B – burak cukrowy; Po4, II (Po4-2dix1), III (Po4-14x17), I (Po1- 5dix27) – grzybnie; Czu – czarny ugor; a-d – przedziały istotności– dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny

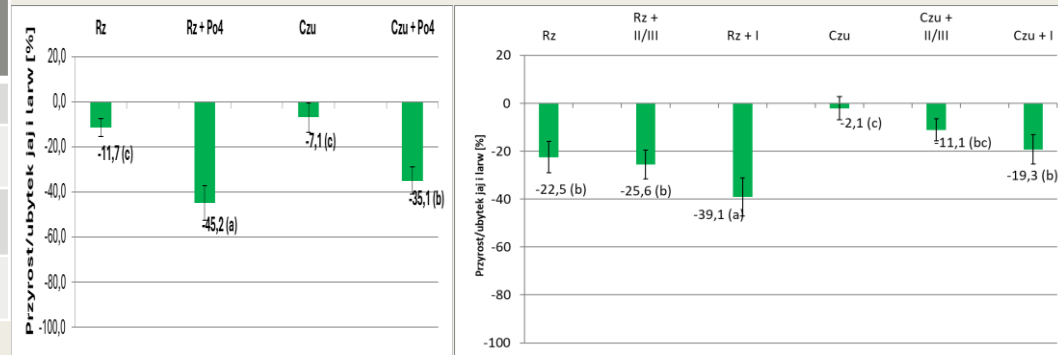
Badane grzybnie powodowały ograniczenie bądź też przyczyniały się do znacznie niższego przyrostu populacji *H. schachtii* w porównaniu do wariantu z uprawą buraka. Nowo włączone do badań polowych grzybnie heterokariotyczne wykazały skuteczność porównywalną lub lepszą niż grzybnia macierzysta Po4.

Wyniki

Temat badawczy 6 - Doświadczenie polowe (wstępne) – terminy dozowania grzybni/przeżywanie grzybni w glebie, zdolności bójcze grzybni względem mątwika burakowego; oddziaływanie roślin

	Plon korzeni	Plon liści	WU	Zawart ość cukru	PBC	K	Na	α-N	Zawartość cukru technologicznego	TPC
	[t·ha ⁻¹]			[%]	[t·ha ⁻¹]	[mmol·kg ⁻¹]			[%]	[t·ha ⁻¹]
Burak cukrowy	74,0	45,8	0,62	17,47	12,93	47,2	6,23	13,4	15,42	11,41
Burak cukrowy + II/III	62,3	42,0	0,71	17,39	10,90	44,6	5,93	11,7	15,42	9,68
Burak cukrowy + I	74,8	35,7	0,48	17,45	13,12	48,8	6,97	12,6	15,40	11,59

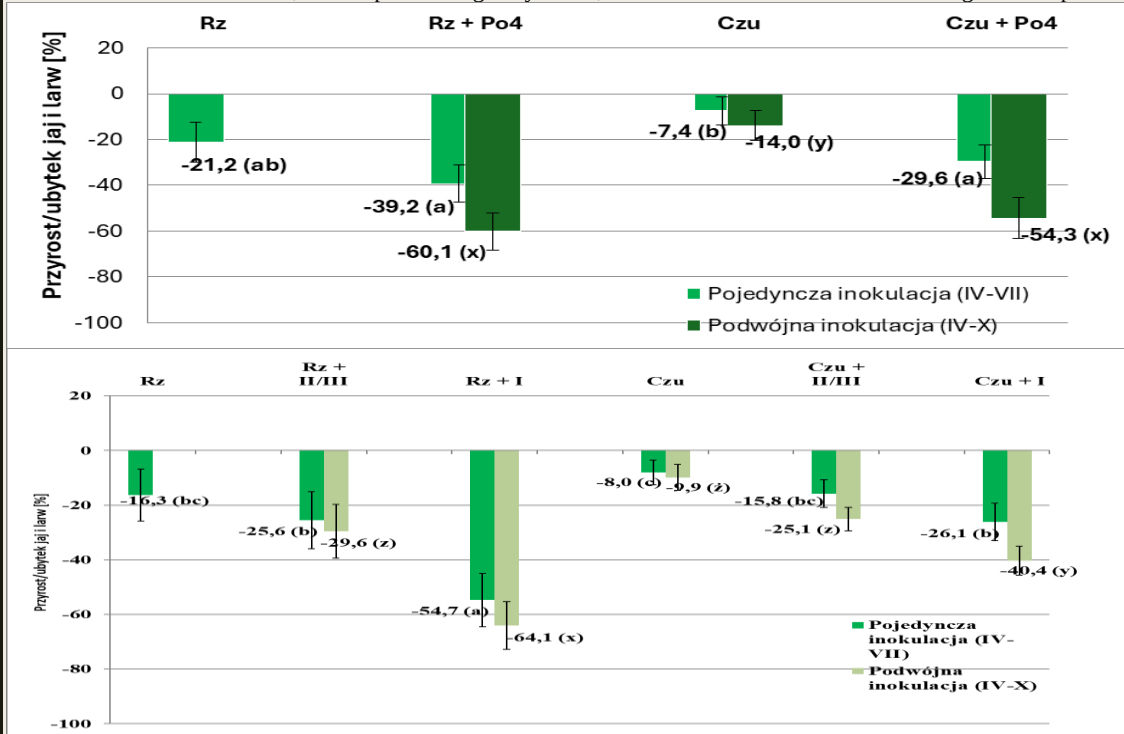
WU – wskaźnik ulistnienia; PBC – plon biologiczny cukru; α-N – zawartość azotu alfa aminowego TPC – plon technologiczny cukru



Wyk. 19-20. Wpływ uprawy buraka cukrowego na stanowiskach zasiedlonych wybranymi genotypami grzybni *Pleurotus ostreatus* na populację mątwika burakowego (*Heterodera schachtii*). Doświadczenie w tunelach hodowlanych; B – burak cukrowy; Po4 3dix17, Po1 5dix27 – genotypy grzybni; Czu – czarny ugor; a-e – przedziały istotności – dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny

W wyniku przeprowadzonych badań polowych:

- stwierdzono, że pomimo istotnego ograniczania namnażania nicienia *H. schachtii* przy jednoczesnej uprawie buraka cukrowego, korzystniejszą metodą fitosanitarnego wykorzystania grzybni *P. ostreatus* jest siew wraz z rzodkwią oleistą,
- wykazano zwiększenie skuteczności działania antymątwikowych odmian rzodkwi oleistej uprawianej na glebach inokulowanych grzybnia *P. ostreatus* w porównaniu do odpowiadających im wariantów kontrolnych (bez grzybni),
- dwukrotne inokulowanie gleby grzybniami *P. ostreatus* przyczyniało się do zwiększenia skuteczności ograniczania populacji *H. schachtii*
- stwierdzono, że badane metody wykorzystania bocznika ostrygowatego w zwalczaniu mątwika burakowego można dostosować do specyfiki zmianowania roślin uprawnych na danych stanowiskach,
- nie odnotowano negatywnego wpływu badanych grzybni bocznika ostrygowatego na wzrost i rozwój buraka cukrowego i rzodkwi oleistej.



Wyk. 17-18. Wpływ uprawy rzodkwi oleistej i w plonie głównym na stanowiskach zasiedlonych *P. ostreatus* na populację mątwika burakowego (*H. schachtii*). Doświadczenie polowe; Rz – rzodkiew oleista; Po4 – grzybnia mateczna Po4; Czu – czarny ugor; a-b – przedziały istotności (pojedyncza inokulacja); x-y – przedziały istotności (podwójna inokulacja) – dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny

Wnioski

- Oddziaływanie badanych grzybni homokariotycznych na nicienie *C. elegans* oraz *H. schachtii* nie podlegało istotnemu różnicowaniu statystycznemu, choć można zauważyć, że grzybnia Po4-18 wykazywała tendencje do lepszego działania niż inne grzybnie w zakresie ograniczania ruchu *C. elegans* i oplatania cyst *H. schachtii*. Grzybnie aktywnie oplatały cysty *H. schachtii*, co rozpoczynało się po 24 h trwania testu i było bardzo wyraźnie widoczne po 2 i 5 dniach. Czas ten jest czasem nieco krótszym niż typowe wylęganie larw *H. schachtii*.
- W czasie hodowli grzybni *P. ostreatus* rejestruje się produkcję 1-okten-3-olu która stopniowo spada, natomiast produkcja 3-oktanonu rośnie od 4. dnia hodowli do 10.-13. dnia, gdy osiąga najwyższe wartości. W dniach zawartość 10. i 13. 3-oktanonu osiąga wielkości powyżej 70%, stając się zdecydowanie dominującym składnikiem frakcji lotnej grzybni boczniaka. Badanie wskazuje, iż grzybnia w pełnej dojrzałości może być bardziej skuteczna w działaniu paraliżującym nicienie.
- Dawka śmiertelna dla *C. elegans* w przypadku 3-oktanonu wynosi 0,1-0,2 % (v:v), natomiast dla 1-okten-3-olu jest ona wyższa i wynosi 0,25-0,3 % (v:v). Dawki powyżej 0,5% s.a. są bezwzględnie paraliżujące i śmiertelne dla nicieni *C. elegans*, a działanie obu substancji aktywnych jest natychmiastowe. Niskie dawki mogą powodować przejściowy paraliż.
- W wyniku przeprowadzonych badań wazonowych stwierdzono, że najskuteczniejszym działaniem antymatwikowym charakteryzowały się grzybnie Po4-9 i Po4-18, a połączenie działania z uprawą rzodkwi przyczyniało się do wysokiej skuteczności w zakresie likwidacji populacji *H. schachtii*, przy czym nie wykazano statystycznie istotnego wpływu samodzielnego stosowania rzodkwi oleistej lub gorczycy białej na liczebność *H. schachtii* w porównaniu do wariantów bez roślin.
- Grzybnie Po4, Po4-3dix17 oraz Po1-5dix27 stosowane w warunkach polowych wykazały skuteczność w ochronie buraka przed *H. schachtii* przyczyniając się do redukcji jego populacji, w przypadku podwójnej inokulacji skuteczność Po4 i Po1-5dix27 przewyższała 60%.
- Wykazano, że poszukiwanie nowych grzybni do zastosowań ochronnych ma istotną wartość dla ochrony buraka cukrowego przed *H. schachtii*.
- Istotne właściwości ochronne wykazują zarówno grzybnie homokariotyczne jak np. Po4-9 i Po4-18 oraz grzybnie heterokariotyczne Po4 i Po1-5dix27.
- Zaobserwowano, że uzyskane rezultaty stosowania badanej metody pozwalają na zakwalifikowanie jej do zastosowania w ramach integrowanej uprawy roślin i połączenia silnego efektu fitosanitarnego uzyskiwanego z wprowadzania do gleby grzybni *P. ostreatus* z pozostałymi korzyściami uprawy integrowanej,
- Stwierdzono, że badane metody wykorzystania boczniaka ostrygowatego w zwalczaniu mątwika burakowego można dostosować do specyfiki zmianowania roślin uprawnych na danych stanowiskach.