

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

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

- **Cel podstawowy** – poszukiwanie efektywnych grzybni *P. ostreatus* o właściwościach nicieniobójczych mogących stanowić bazę dla dalszych badań oraz wstępna ocena możliwości rozwoju wybranych grzybni w warunkach glebowych i ich wpływu na populację *H. schachtii*.
- **Cele pośrednie:**
- Wyselekcjonowanie ze środowiska dodatkowego izolatu *P. ostreatus* (Po4).
- Otrzymanie owocników z pozyskanych grzybni oraz zbior basidiospor, w tym dwujądrowych.
- Wyprowadzenie kultur homokariotycznych i heterokariotycznych *P. ostreatus*.
- Charakterystyka nowo otrzymanych grzybni, w tym morfologiczna, molekularna (technika ISSR), i ocena właściwości nicieniobójczych.
- Ocena wpływu dodatków organicznych na rozrost grzybni modelowych i ich właściwości bójczych.
- Ocena możliwości rozrostu i aktywności bójczej w glebie grzybni modelowych.

Cele zrealizowano. Mierniki badań - wykonano

Materiały i metody badań

Materiał badań

1. Grzybnie *P. ostreatus* - dzika (PO4) oraz grzybnie potomne szczepów PO1, PO2, PO4
 - Monokariony – pozyskano z wysianych basidiospor, w badaniach użyto 30 tak uzyskanych grzybni.
 - Heterokariony pozyskano poprzez parowanie monokarionów PO4xPO4 (30 szt.) oraz grzybni monokariotycznych i dikariotycznych Po1di x Po1mon, Po2di x Po2mon, Po4di x Po4mon (po 10 szt.).
2. *Caenorhabditis elegans* N2 (fenotyp dziki) – organizm modelowy
3. *Heterodera schachtii* – organizm badany

Metody badawcze

Zbiór *Pleurotus ostreatus* ze środowiska; Hodowla grzybni została przeprowadzona z wykorzystaniem technik mykologicznych oraz podłoży PDA i agar wodny (pozyskanie basidiospor; namnażanie grzybni; przechowywanie grzybni; krzyżowanie grzybni). Dobór warunków owocowania dla szczepu PO4.

Hodowlę *C. elegans* przeprowadzono na podłożu NGM; jako pożywienie dla nicieni zastosowano *E. coli* OP50 na podłożu bulion odżywczy

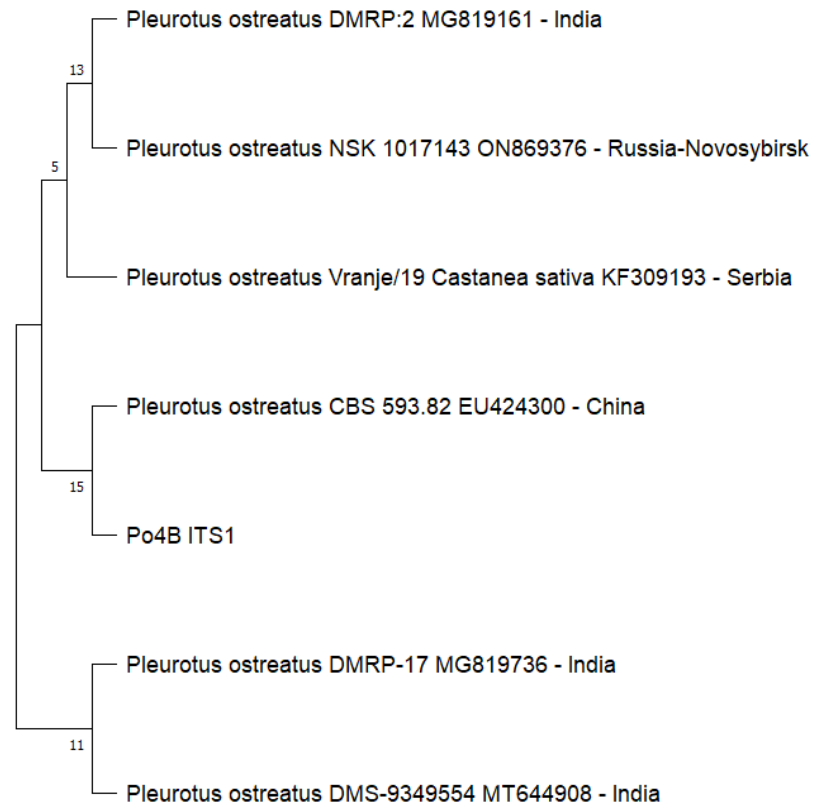
Hodowlę *H. schachtii* prowadzono w glebie na korzeniach siewek buraka, pozyskiwanie metodą klasyczną dla tego gatunku.

Identyfikacja grzybni wizualna (owocnik w siedlisku naturalnym; heterokariony w trakcie krzyżowania) i molekularna na podstawie sekwencji regionu ITS1-ITS2 (PO4)

Charakterystyka wybranych do badań grzybni na podłożu PDA – hodowla w zróżnicowanych warunkach temperatury (10, 15, 20, 25 ± 2°C), zdolność wytwarzania wypustek toksynotwórczych;

Analiza molekularna - izolacja DNA w oparciu o gotowe zestawy (Bead-Beat Micro AX Gravity, A&A Biotechnology), dobór starterów ISSR [(GTG)₅, (GA)₈T, (CTC)₆ (GA)₈C], rozdział produktów PCR w żelu agarozowym; analiza wyników rozdziału z wykorzystaniem programu NTSYS

Właściwości nicieniobójcze – hodowla grzybni na agarze wodnym, traktowanie grzybni zawiesiną z nicieniami (*C. elegans* lub *H. schachtii*) i wspólna inkubacja; obserwacja mikroskopowa indukcji wytwarzania wypustek toksynotwórczych w czasie po potraktowaniu nicieniami



Rysunek 1. Identyfikacja molekularna grzybnicy matecznej Po4

Fot.1. Dikarion *P. ostreatus*



Owocniki dzikie *P. ostreatus* zebrano w terenie pozamiejskim okolic Kluczborka, grzybnię odizolowano i oznaczono jako Po4

Identyfikacji gatunkowej grzybnicy dokonano wizualnie na podstawie cech morfologicznych oraz potwierdzono molekularnie (Rys. 1) przynależność do gatunku *Pleurotus ostreatus*

Z owocników Po1, Po2, Po4 pozyskiwano basidiospory, w których mikroskopowo określono liczbę jąder w celu ustalenia częstotliwości występowania basidiospor 2-jądrowych (Fot. 2). Wynosiła przeciętnie 3% dla wszystkich szczepów matecznych.



Fot. 2. Dwujądrowe basidiospory *P. ostreatus*



Laboratoryjne owocniki *P. ostreatus* Po4



Fot. 3, 4. Owocniki *P. ostreatus*

Pleurotus ostreatus Po4 w warunkach naturalnych

Charakterystyka grzybni

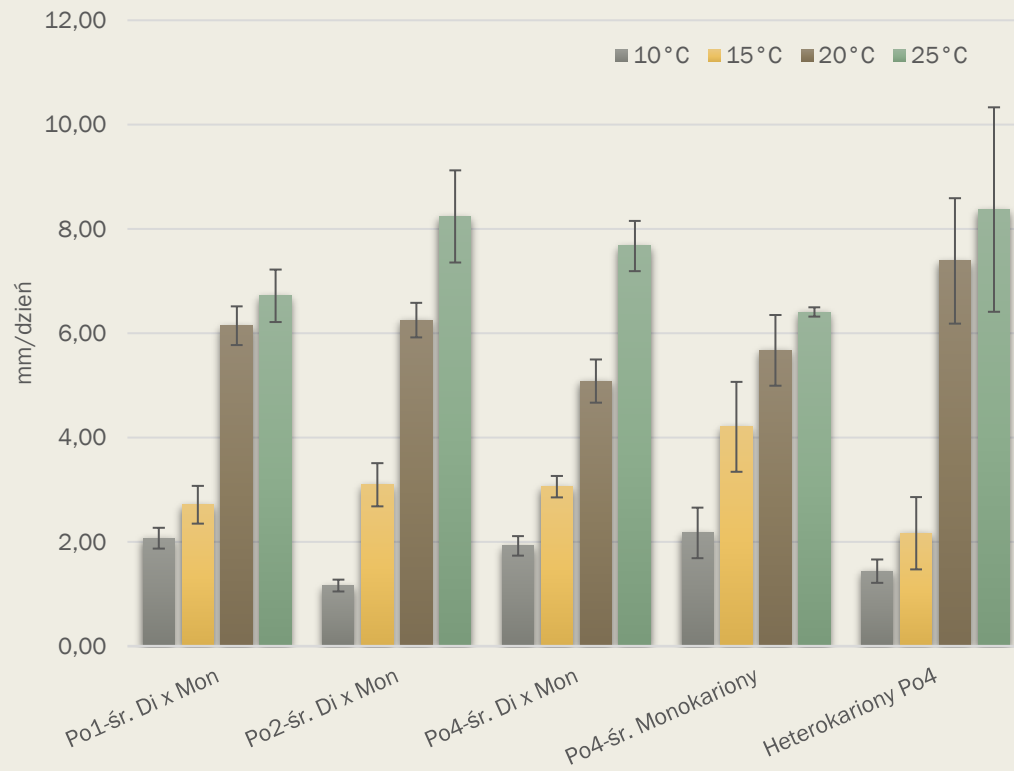
Analiza morfologiczna grzybni za pomocą analizy metodą UPGMA pozwoliła na zbudowanie dendrogramu, w którym można było wydzielić dwie grupy (klastry) grzybni, z czego klaster B zawiera większą część badanej kolekcji. W obu klastrach wyodrębniają się po dwa subklastry (A1, A2 i B1, B2). Klaster A zawiera grzybnie mateczne Po1 i Po2, z czego obie wraz z dwoma dikarionami typu Bullera wykazującymi identyczność morfologiczną w subklastrze A1, krzyżówki monokarionów Po1, Po2 i Po4 z dikarionami wyrosłymi z dikariotycznych badidiospor (krzyżowanie wg efektu Bullera). Klaster B zawiera subklaster B1 grupujący monokariony Po4, z czego wiele spośród nich wykazuje identyczność morfologiczną oraz dikariony typu Bullera (5 sztuk) i dikariony uzyskane z krzyżowania monokarionów Po4 (2 sztuki). Subklaster B2 zawiera monokariony Po4 i pozostałe dikariony Po4. Grzybnie zazwyczaj były białe, dość puszyste, średnio wysokie, ze strefowaniem bądź gruzełkowaniem widocznym na powierzchni grzybni. Heterokariony Po4 wytwarzały żółty lub pomarańczowy barwnik w temp. 20 i 25°C, grzybnia Po 4x8 cechowała się skąpym wzrostem.

Podobieństwo molekularne oceniono na podstawie wzorów prążków uzyskanych po rozdzieleniu elektroforetycznym produktów amplifikacji fragmentów uzyskanych w trakcie reakcji PCR genomowego DNA z wytypowanymi do badań starterami ISSR. Porównanie wzorów prążków wykonano w programie NTSYS wykorzystując metodę UPGMA do zbudowania dendrogramu ukazującego podobieństwa i różnice badanych grzybni.

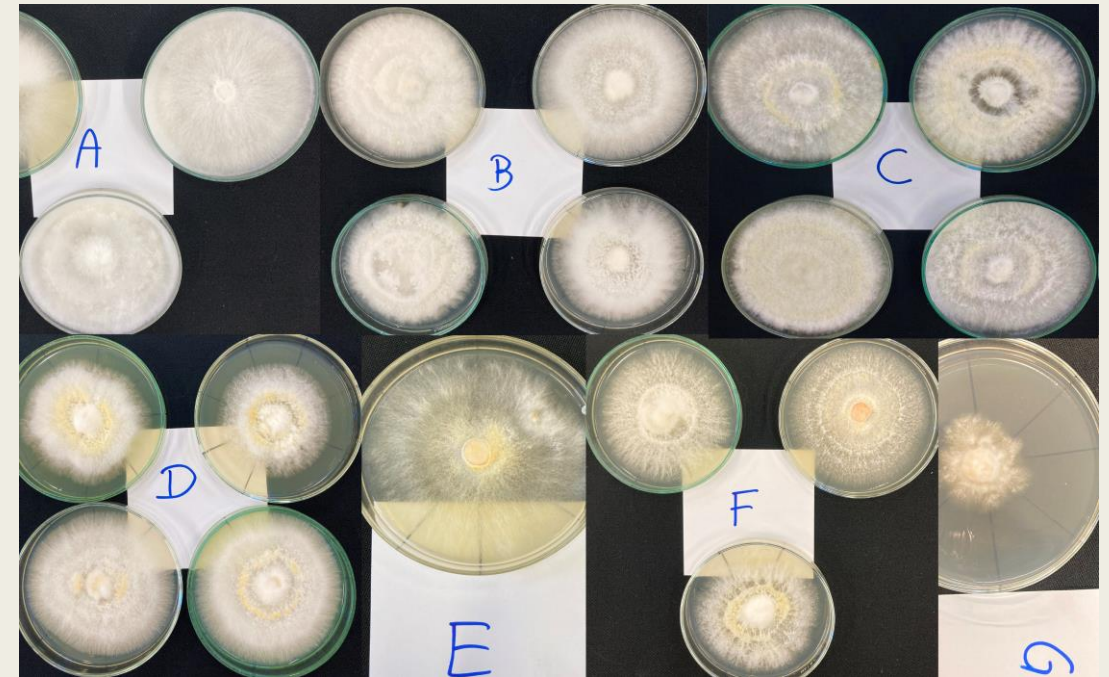
W dendrogramie wydzielono dwa klastry oraz trzy grzybnie niewchodzące w ich skład, są to grzybnie Po1, Po2 i monokarion Po4-26. Pozostałe grzybnie w znaczącej części wchodzi w skład klastru 2, gdzie można wyróżnić grupę grzybni o identycznym wzorze molekularnym, są to monokariony potomne Po4 (12 szt.) oraz większość heterokarionów, w tym typu Bullera. Wynik badania wskazuje na małe zróżnicowanie genetyczne pomiędzy badanymi grzybniami w zakresie jaki jest możliwy do zbadania wykorzystywanym zestawem starterów ISSR.

Charakterystyka grzybni

- Wzrost grzybni w różnych temperaturach był zróżnicowany, najintensywniejszy w temp. 25°C (od ok. 6 do 10 mm/dzień dla heterokarionów Po4), najslabszy w temp. 10°C (od ok. 1 do 3 mm/dzień). Najbardziej pożądanym jest wzrost w temp. 15 - 20°C, takimi właściwościami cechowały się: Po4-6, Po4-9, Po4-10, Po4-18 i heterokariony Po4. Pozostałe heterokariony (typu Bullera) osiągały znacznie słabsze wzrosty w tym zakresie temperatur. Promowany powinien wzrost w temp. 15°C, czyli wiosennym zakresie temperaturowym.



Rysunek 2. Średnie przyrosty grzybni w różnych temperaturach

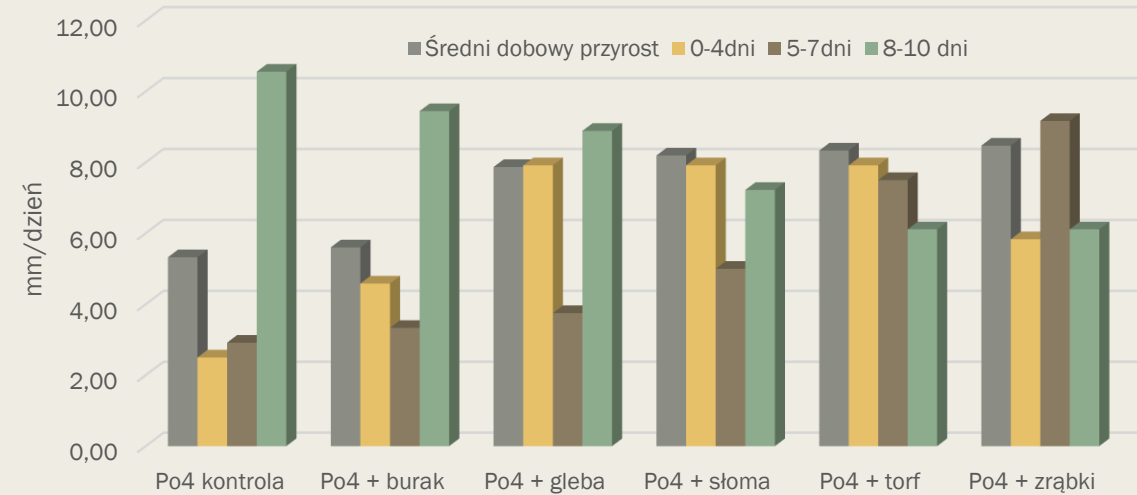


Fot. 5. Przykładowa morfologia grzybni w temp. 20°C

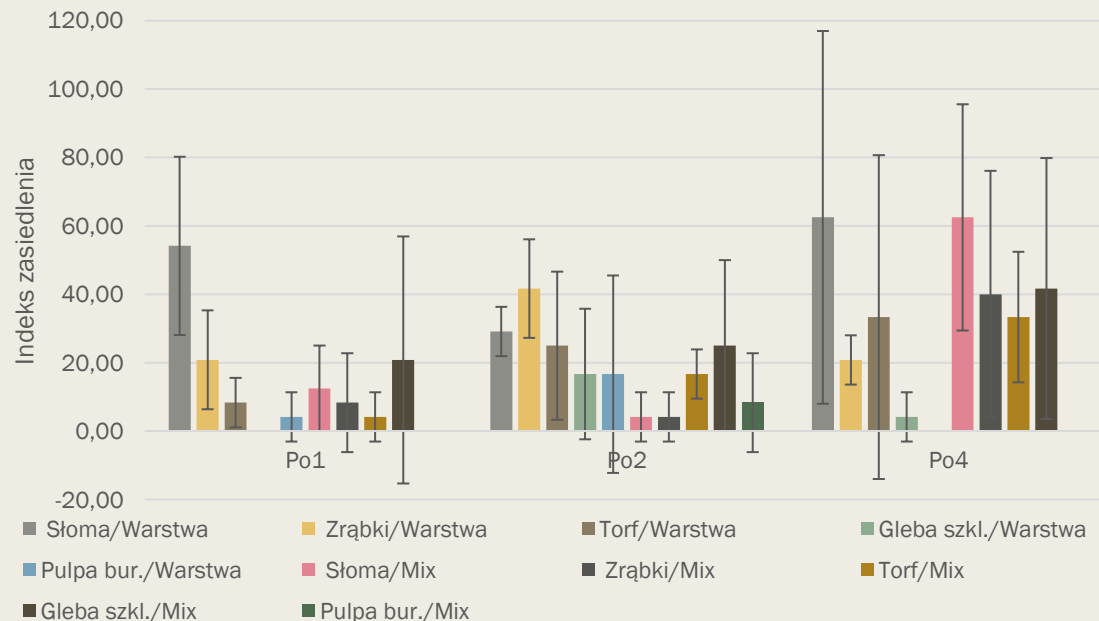
Wyniki – ocena materiałów organicznych jako nośników grzybni



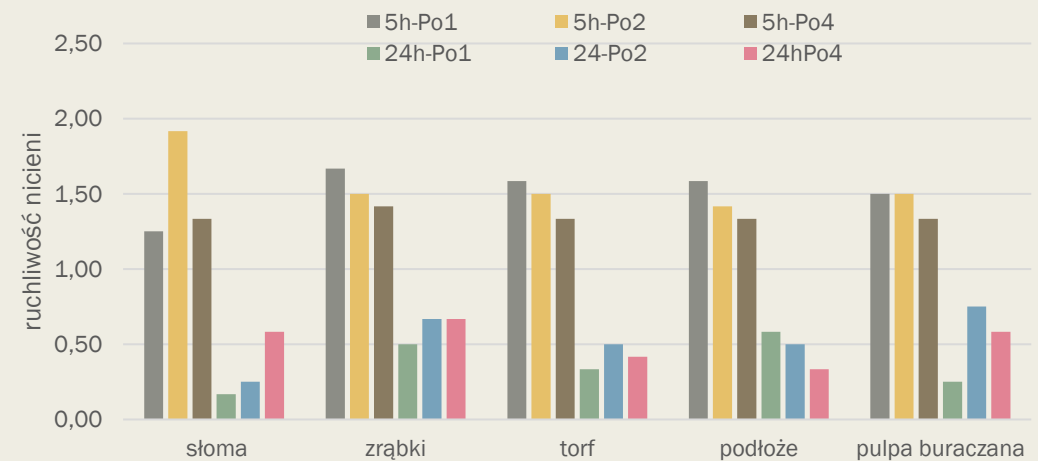
grzybni



Rysunek 3. Wpływ dodatków organicznych do AW na wzrost grzybni Po4



Rysunek 4. Indeks zasiedlenia gleby z dodatkami organicznymi

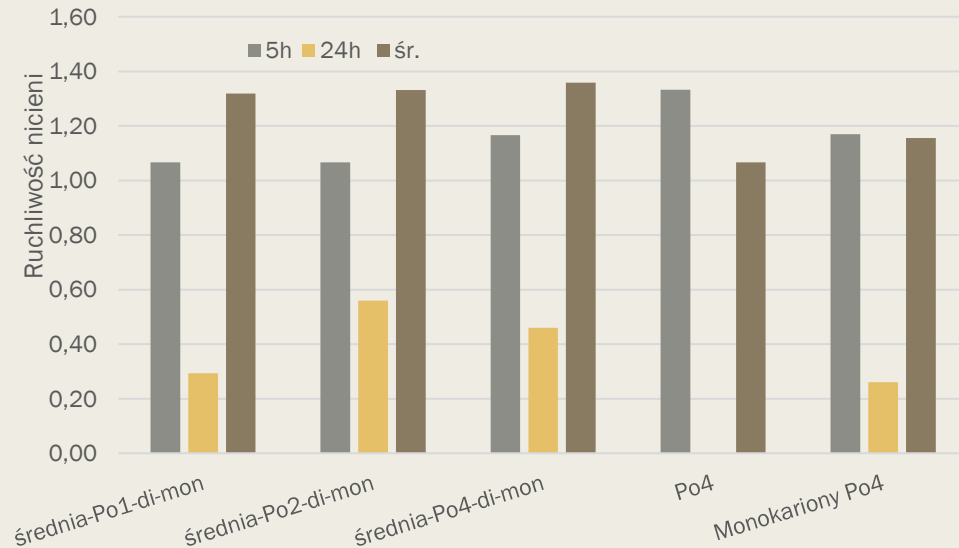


Rysunek 5. Aktywność grzybni wyrażona ruchliwością *C. elegans* na podłożach z różnymi dodatkami organicznymi

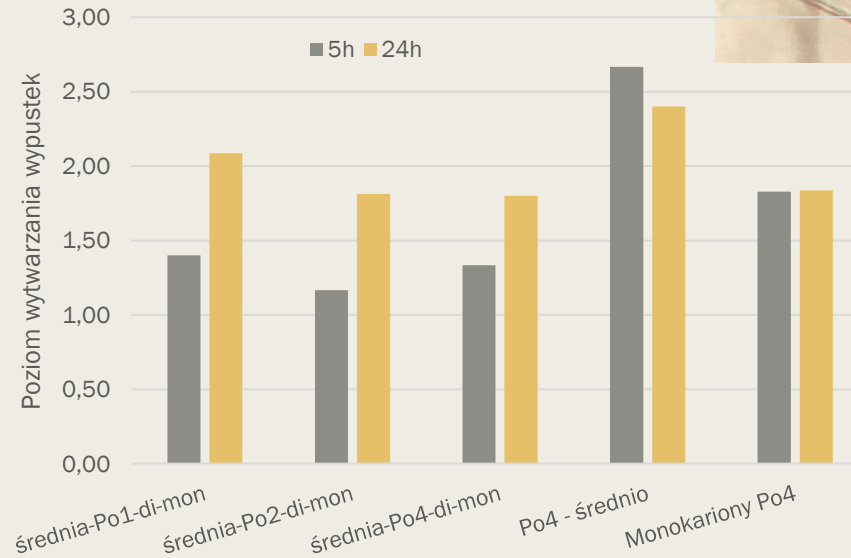
WYNIKI

Charakterystyka grzybni

■ Aktywność nicieniobójcza względem *C. elegans*



Rysunek 6. Średnie przyrosty grzybni w różnych temperaturach



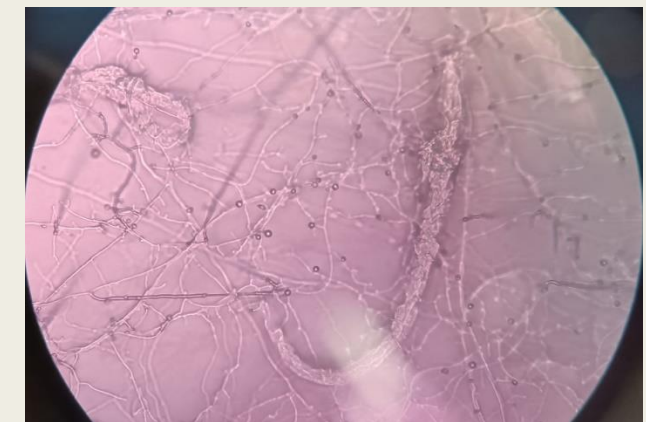
Rysunek 7. Średnie przyrosty grzybni w różnych temperaturach



Fot. 6-7. Wypustki z toksyną wytwarzane przez *P. ostreatus* na agarze wodnym (pow. 100x, 1000x)

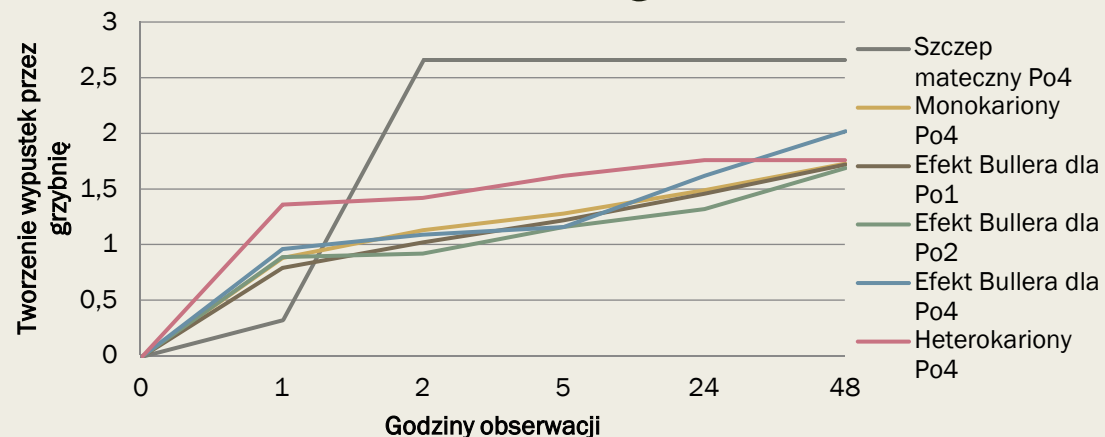
Biorąc pod uwagę rezultaty przeprowadzonych badań należy stwierdzić, iż nie można jednoznacznie stwierdzić, że bójczość poszczególnych szczepów wobec *C. elegans* zależy od intensywności wytwarzanych przez nie wypustek toksynotwórczych. Pogląd taki znajduje potwierdzenie w literaturze.

Pośród badanych szczepów najlepszymi parametrami co do bójczości względem *C. elegans* cechują się: Po4-21(monokarion Po4), Po4 14x17, Po4 22x18 (heterokariony Po4), a spośród heterokarionów typu Bullera Po1 5dix27, Po1 5dix32, Po2 14dix21, Po2 20dix21, Po2 15dix17, Po4 1dix30, Po4 3dix7.



Fot. 8. Zniszczenie nicienia *C. elegans* obserwowane w interakcji z grzybniami *P. ostreatus*

Interakcja *P. ostreatus* z *Heterodera schachtii*



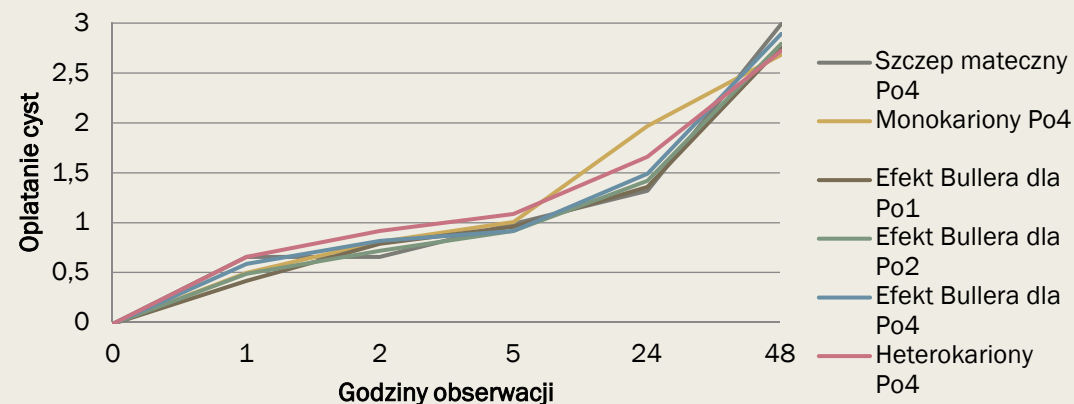
Rysunek 8. Podsumowanie - Średnia liczebność wypustek toksynotwórczych wytwarzanych przez badane grupy szczepów *Pleurotus ostreatus* oceniana przy pomocy skali 0-3 (0- brak wypustek; 1- wypustki nieliczne; 2- średnia liczebność wypustek; 3- wypustki obfite)

Wykazano, że na podstawie uzyskanych danych, możliwe jest wskazanie szczepów o największym potencjale bójczym względem *Heterodera schachtii*: Po4 (szczep mateczny), Po4-8, Po4-24 i Po4-30 (homokariony Po4), a także Po1-5dix27, Po2-20dix23 oraz Po4-3dix17 (szczepy pozyskane na drodze krzyżowania z wykorzystaniem efektu Bullera).

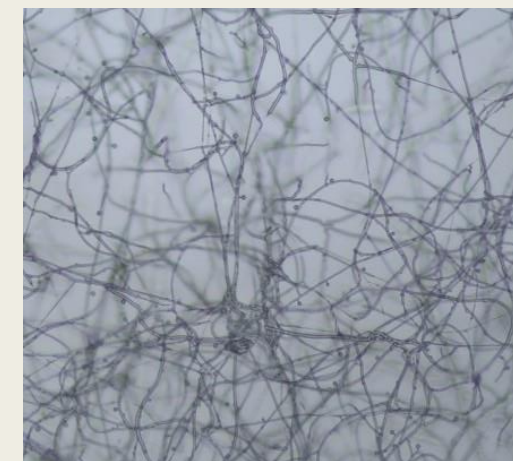
Tabela 1. Wpływ glebowej inkubacji inokulowanych grzybni *Pleurotus ostreatus* (Po1, Po2, Po4) na liczebność populacji nicienia *Heterodera schachtii* (*Pi – liczebność inicjalna populacji nicienia; **Pf- liczebność finalna populacji nicienia)

Szczep	Po1 mateczny	Po2 mateczny	Po4 mateczny
Pi*	5 244	3 451	3 960
Pf/Pi**	0,84	1,00	0,98
Przyrost/ ubytek jaj i larw w %	-16,4	0,2	-2,0

Wyraźne działanie mątwikobójcze przejawiał tylko wariant z zastosowaniem szczepu Po1.



Rysunek 9. Podsumowanie - Średni stopień oplatania cyst *Heterodera schachtii* przez grzybnie badanych grup szczepów bocznika (*Pleurotus ostreatus*) w skali: 0-3 (0 - brak reakcji strzępek na obecność cyst; 1 - strzępki grzybni skierowane ku cyście; 2 - drobne strzępki oplatające cystę; 3 - cysta opleciona przez rosnące strzępki).



Fot. 9. wypustki toksynotwórcze wytworzone pod wpływem obecności *H. schachtii* przez grzybnie heterokariotyczną szczepu Po4-3dix17

Wnioski

- Badane szczepy bocznika cechowały się zróżnicowaną aktywnością pod względem ich oddziaływania nicieniobójczego (*C. elegans*) i mątwikobójczego (*H. schachtii*).
- Liczebność wytworzonych przez grzybnię wypustek toksynotwórczych nie była skorelowana ze zdolnością do oplatania i unicestwiania cyst, ani nicieniobójczością.
- Wykazano, że na podstawie uzyskanych danych, możliwe jest wskazanie szczepów o największym potencjale bójczym, które mogą zostać wykorzystane do dalszych badań:
 - względem *C. elegans*: Po4-21(homokarion Po4), Po4-14x17, Po4-22x18 (heterokariony Po4), a spośród heterokarionów typu Bullera **Po1 5dix27**, Po1 5dix32, Po2-14dix21, Po2-20dix21, Po2-15dix17, Po4-1dix30, Po4-3dix7
 - względem *H. schachtii*; na wyróżnienie zasługują następujące szczepy: Po4 (szczep mateczny), Po4-8, Po4-24 i Po4-30 (homokariony Po4), a także **Po1-5dixx27**, Po2-20dix23 oraz Po4-3dix17 (szczepy pozyskane na drodze krzyżowania z wykorzystaniem efektu Bullera).
- Dobrym wzrostem w temp. 15 - 20°C cechowały się Po4-6, Po4-9, Po4-10 (podobne genetycznie), Po4-18 i heterokariony Po4.
- Proponowanym dodatkiem organicznym do gleby jest słoma stosowana do gleby w warstwie, inokulowana ziarnem przerośniętym grzybnią. Z uwagi na intensywne i łatwe zakażenie się pulpa buraczana nie powinna być stosowana.
- Obserwowano pojedyncze ruchliwe larwy *H. schachtii* opuszczające cysty i wykazujące żywotność, pomimo obecności grzybni *Pleurotus ostreatus* oraz wytwarzanych przez nią wypustek toksynotwórczych, jednak w praktyce nie powinno to stanowić przeszkody w potencjalnym zastosowaniu *P. ostreatus* do ograniczania populacji *H. schachtii*, ponieważ na początku sezonu wegetacyjnego duża pula nicieni znajduje się wewnątrz cyst, które stanowią materiał służący do analizy liczebności populacji, a potencjalne zastosowanie tej metody połączonej z jednoczesną uprawą antymątwikowych odmian gatunków takich jak gorczyca biała lub rzodkiew oleista, które wykorzystując tzw. mechanizm pułapkowy, zwabiają opuszczające cysty larwy mątwika burakowego i modyfikują ich biologię rozwoju w celu uniemożliwienia dymorfizmu płciowego, eliminując tym samym ich potencjał jako agrofagów.