

TYTUŁ ZADANIA:
**WPLYW 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 – pozyskanie efektywnych grzybni dikariotycznych *P. ostreatus* o właściwościach nicieniobójczych mogących stanowić bazę dla dalszych badań.
- Cele pośrednie:
 - Wyselekcjonowanie ze środowiska izolatów *P. ostreatus*.
 - Otrzymanie owocników z pozyskanych grzybni oraz zbiór basidiospor.
 - Wyprowadzenie kultur monokariotycznych z basidiospor *P. ostreatus*, ich krzyżowanie, i wyprowadzenie tą drogą nowych grzybni heterokariotycznych.
 - Charakterystyka uzyskanych grzybni, w tym molekularna grzybni.
 - Ocena właściwości (efektywności) nicieniobójczych w warunkach laboratoryjnych grzybni (grzybnie mateczne i potomne).

Cele zrealizowano.

Materiały i metody badań

Materiał badań

1. Grzybnie *P. ostreatus* dzikie oraz ich grzybnie potomne
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)

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

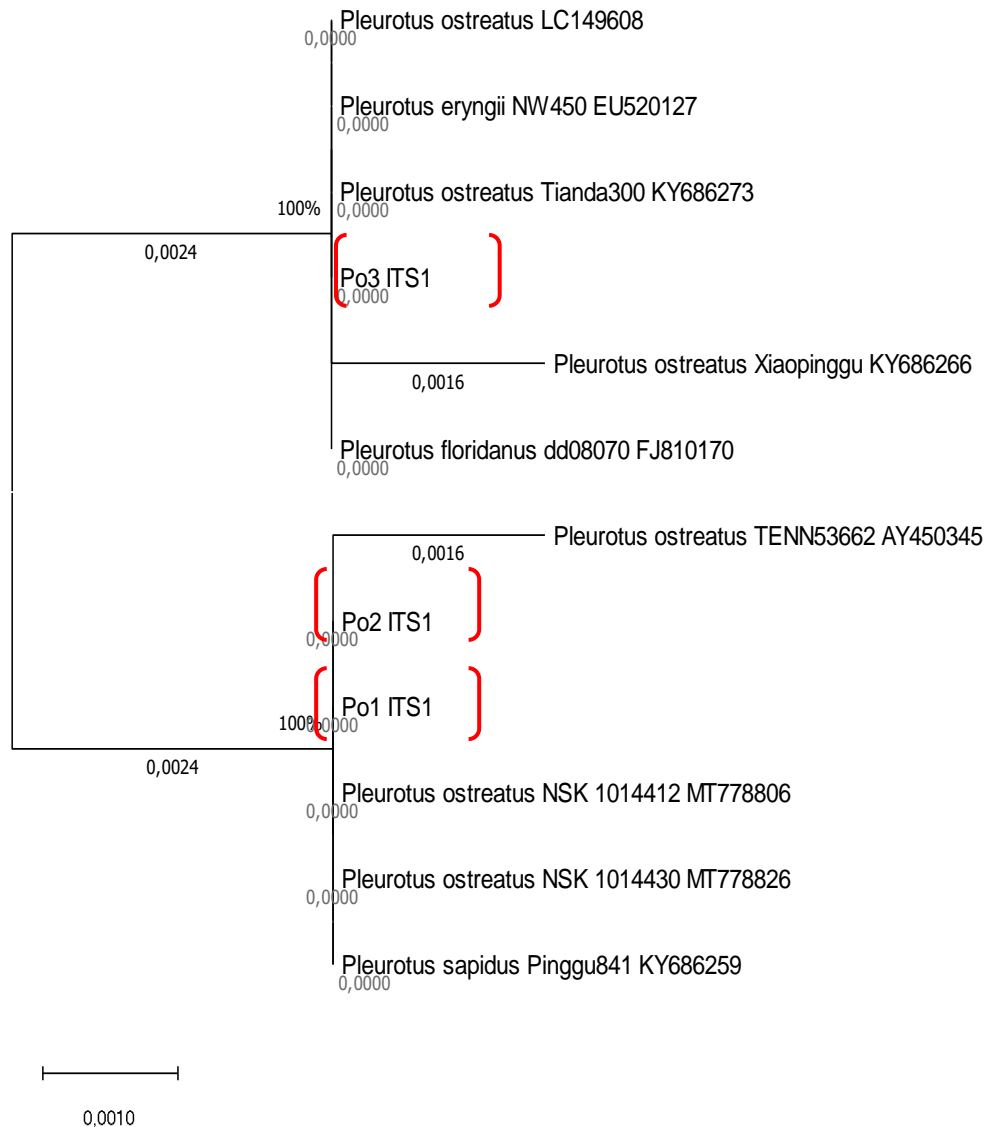
Identyfikacja grzybni wizualna i molekularna na podstawie sekwencji regionu ITS1-ITS2

Charakterystyka grzybni – 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 i wspólna inkubacja; obserwacja mikroskopowa indukcji wytwarzania wypustek toksynotwórczych w czasie po potraktowaniu nicieniami

Wszystkie organizmy zabezpieczono do przechowywania.



Rysunek 1. Identyfikacja molekularna badanych grzybni matecznych Po1 i Po2

- Owocniki dzikie *P. ostreatus* zebrano w Opolu oraz w rejonie pozamiejskim okolic Opolu, ich grzybnie oznaczono jako Po1 i Po2
- Identyfikacji grzybów dokonano wizualnie na podstawie cech morfologicznych oraz potwierdzono molekularnie (region ITS1-ITS2)
- Jako porównania użyto *P. ostreatus* pochodzący z handlu (oznaczenie Po3)
- Badanie aktywności wobec dziko występujących nicieni glebowych wykazało istnienie działania toksycznego wobec nich obu grzybni



Wyhodowane owocniki *P. ostreatus*



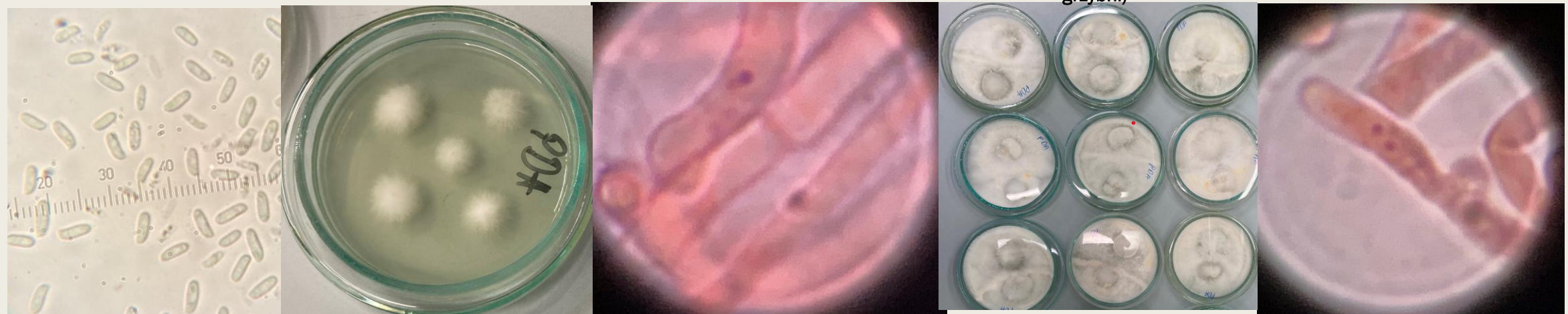
Pleurotus ostreatus w warunkach naturalnych

Fot. 1-3. Owocniki *P. ostreatus*

WYNIKI

Pozyskanie monokarionów oraz heterokarionów

- Monokariony – pozyskano z wysianych basidiospor, w badaniach użyto po 30 grzybni
- Heterokariony pozyskano poprzez parowanie monokarionów Po1xPo1; Po2xPo2 oraz Po1xPo2, w badaniach uwzględniono odpowiednio po 10 sztuk i 30 szt.
- Cechy morfologiczne grzybni wykazywały zróżnicowanie, z reguły grzybnie monokariotyczne były bardziej bujne/puszyste, a heterokariotyczne zbite/filcowate; niektóre z nich wytwarzały pomarańczowy/żółtawy barwnik.



Basidiospory

monokariony

grzybnia monokariotyczna

krzyżowanie monokarionów

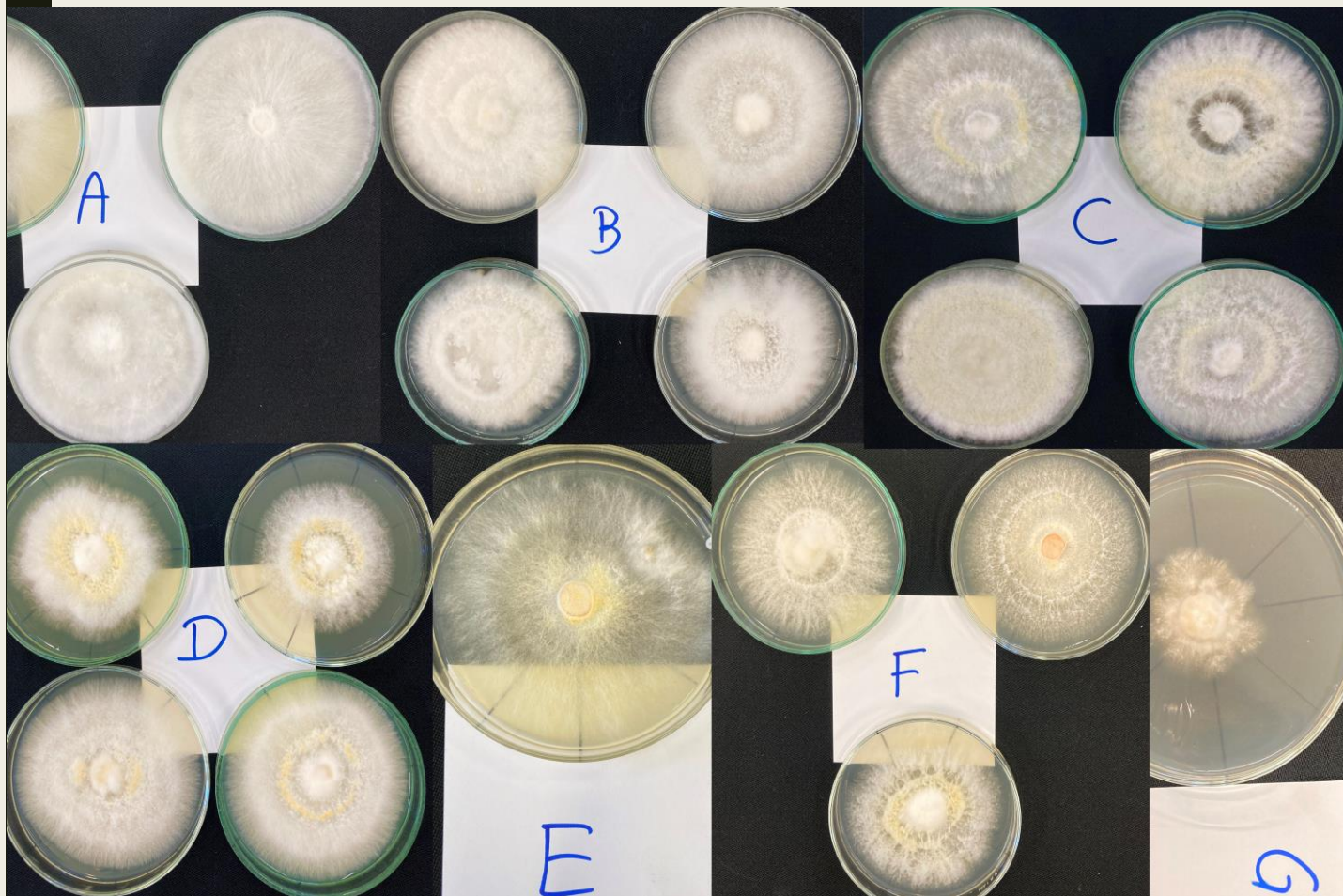
dikarion

Fot. 4-8. Pozyskiwanie potomstwa *P. ostreatus*

WYNIKI

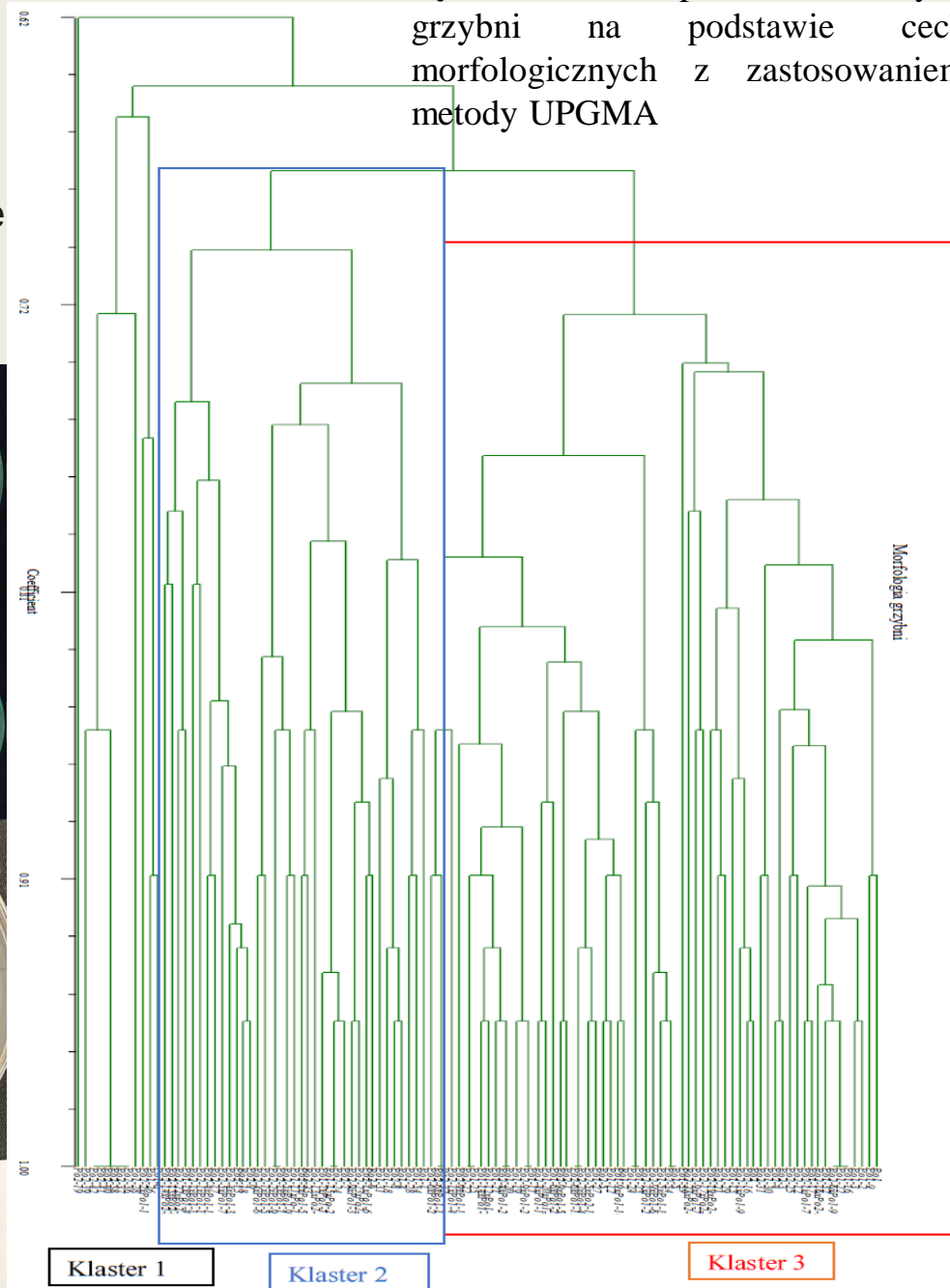
Charakterystyka grzybni

Nie wykazano cechy morfologicznej jednoznacznie grupującej grzybnie, na podstawie morfologii wyróżniono trzy klastry (Rys. 2). Grzybnie wytwarzające pomarańczowy barwnik występowały w różnych klastrach.



Fot. 9. Morfologia grzybni w temp. 20°C

Rysunek 2. Grupowanie badanych grzybni na podstawie cech morfologicznych z zastosowaniem metody UPGMA



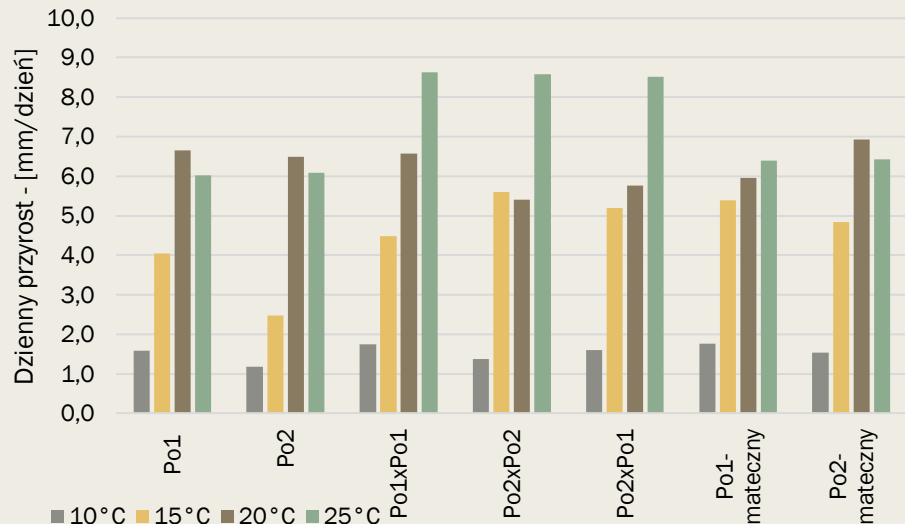
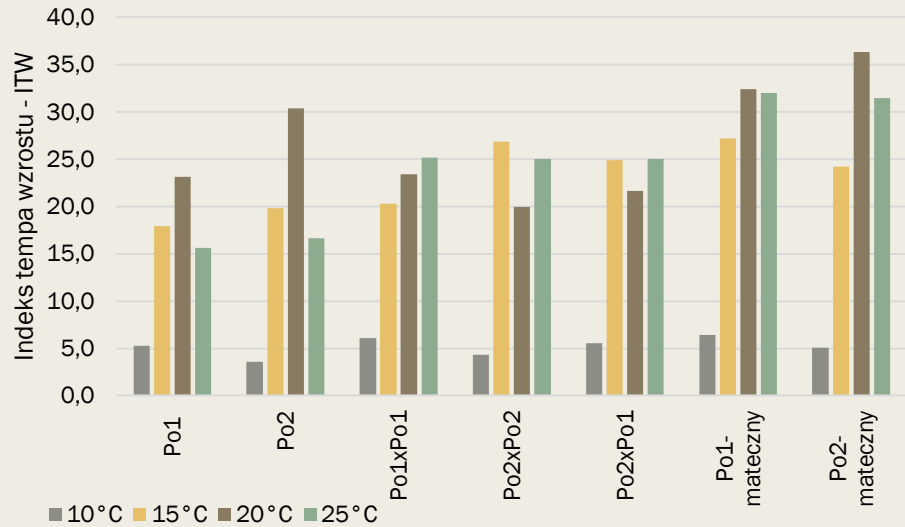
WYNIKI

Charakterystyka grzybni

Charakterystyka – tempo wzrostu w różnych temperaturach:

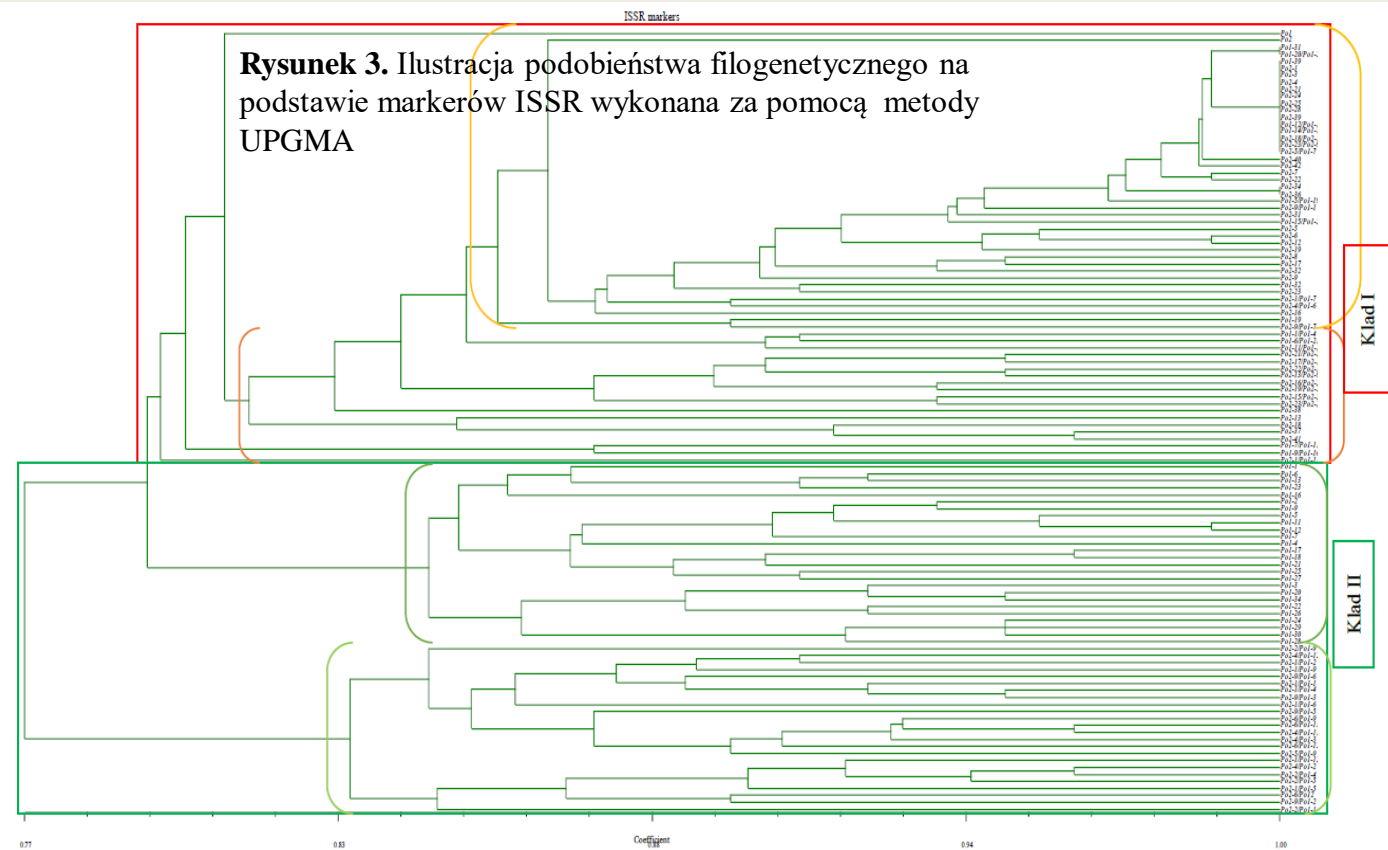
Badane grzybnie z reguły lepiej rosną w temperaturze 20-25 °C, choć niektóre szczepy wykazywały się dobrym wzrostem w temperaturze 15 °C

Dzięki markerom molekularnym ISSR wyodrębniono dwa główne kłady, z których jeden grupuje monokariony Po1 i heterokariony Po2xPo1 (Kład II), a drugi pozostałe grzybnie (Kład I)



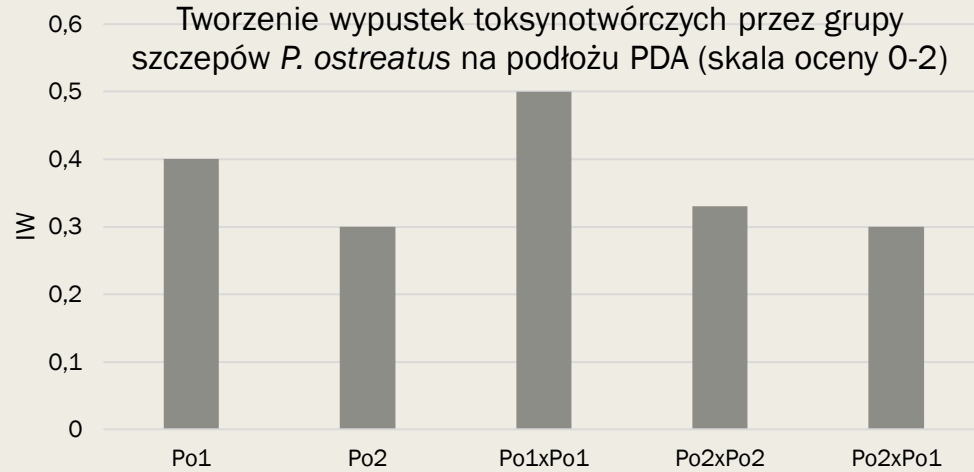
Wykres 1-2. Indeks tempa wzrostu oraz wartości dziennego przyrostu grzybni w różnych temperaturach

Objaśnienia: Po1, Po2 – monokariony Po1 i Po2,; Po1xPo1, Po2xPo2, Po2xPo1 – odpowiednie heterokariony

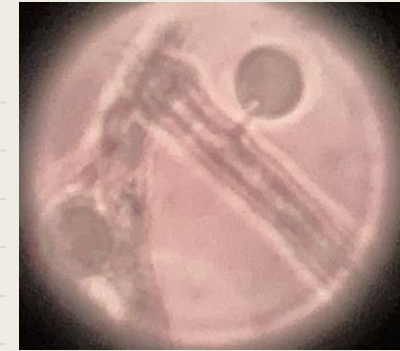
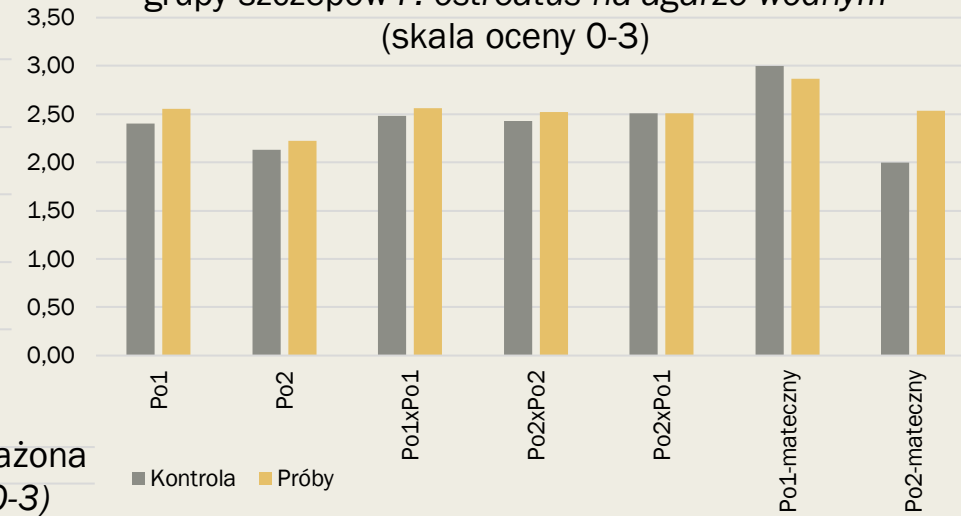




■ Aktywność nicieniobójcza względem *C. elegans*

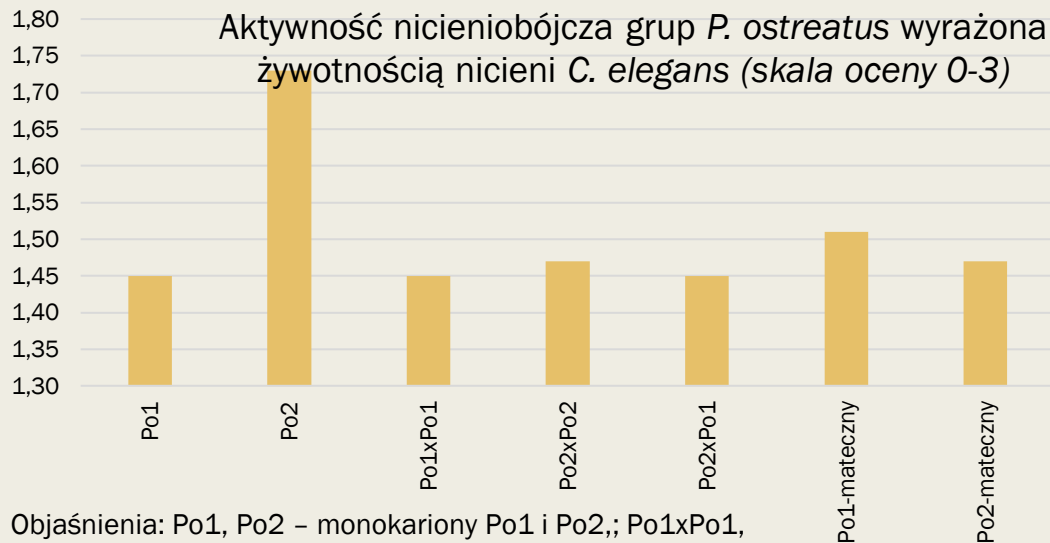


Wytwarzanie wypustek nicieniobójczych przez grupy szczepów *P. ostreatus* na agarze wodnym (skala oceny 0-3)

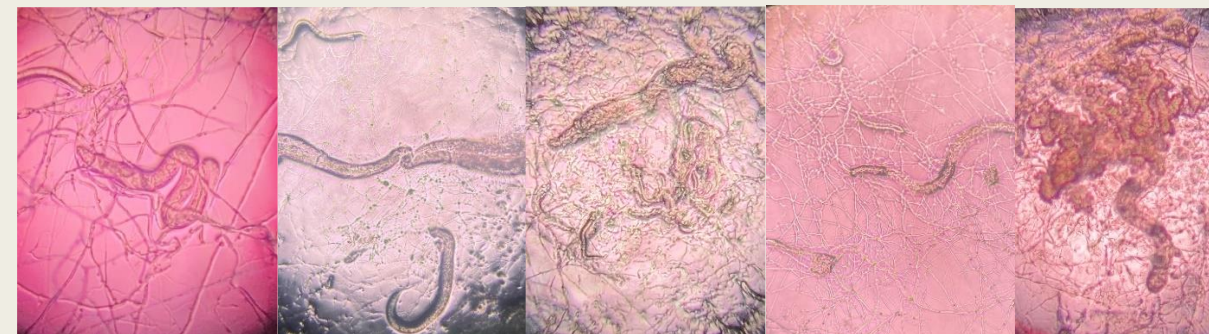


Fot. 10-11. Wypustki z toksyną wytwarzane przez *P. ostreatus* na agarze wodnym (pow. 100x, 1000x)

Aktywność nicieniobójcza grup *P. ostreatus* wyrażona żywotnością nicieni *C. elegans* (skala oceny 0-3)



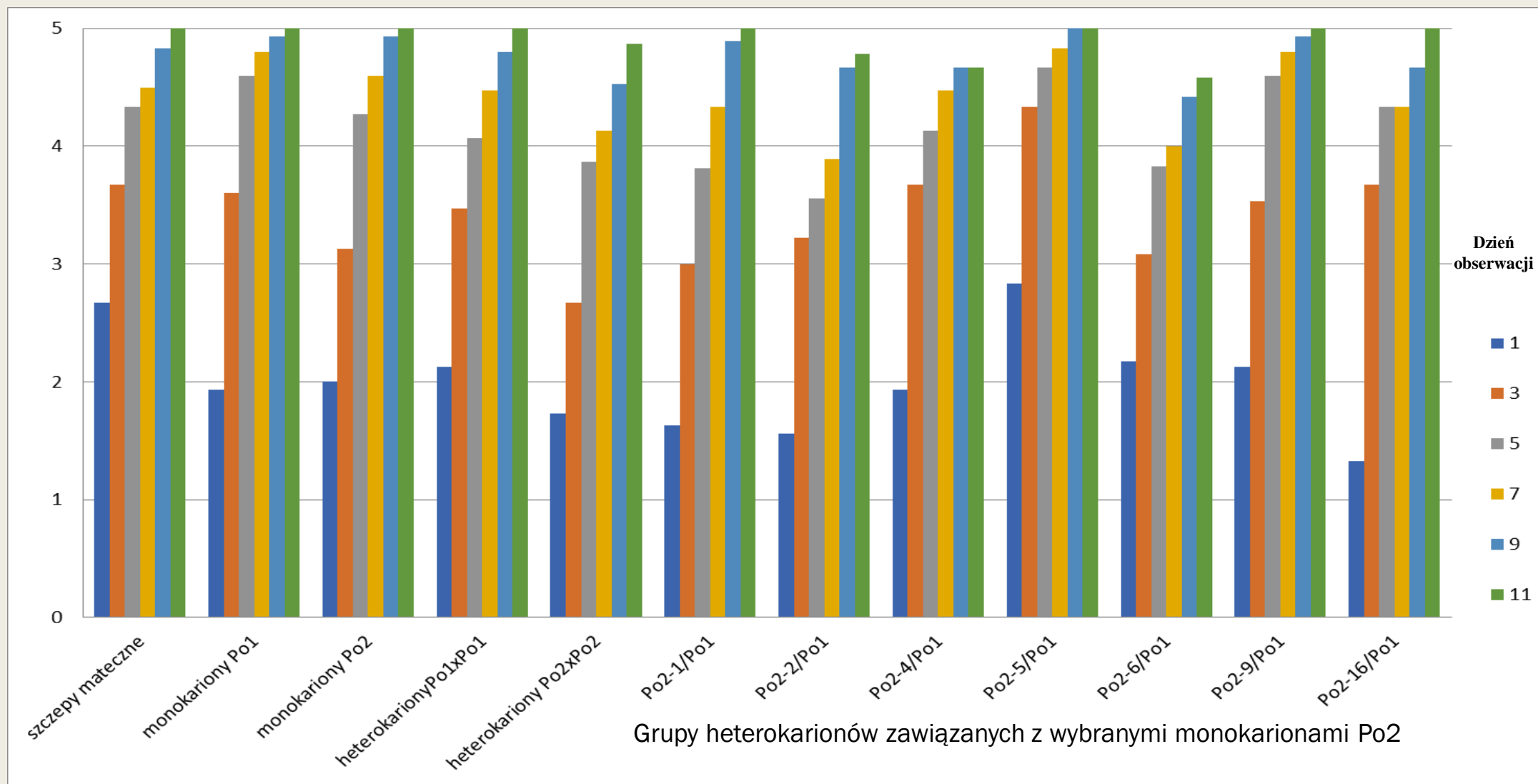
Objaśnienia: Po1, Po2 – monokariony Po1 i Po2,; Po1xPo1, Po2xPo2, Po2xPo1 – odpowiednie heterokariony



Fot. 12. Różne stopnie zniszczenia nicieni *C. elegans* obserwowane w interakcji z grzybniami *P. ostreatus*

Charakterystyka grzybni

- Aktywność nicieniobójcza grup szczepów *P. ostreatus* względem *H. schachtii* (skala oceny 1-5)



Wnioski

Na podstawie interakcji *H. schachtii* z grzybniami bocznika można wskazać potencjalne grzybnie kandydackie do dalszych badań, są to: Po1-11, Po2-1, Po2-4, Po2-9, a także heterokariony: Po2xPo2 13/9, 23/9, Po2xPo1 4/3, 5,9, 6/2. Warto także zwrócić uwagę na heterokariony z grupy Po2-5/Po1 oraz na grzybnie mateczne. Są to grzybnie o wysokiej skuteczności wobec *H. schachtii*, a także reprezentujące różne cechy, m.in.: reprezentują wszystkie cztery klady wyodrębniane na podstawie cech molekularnych, a także oba klastry wyróżnione na podstawie cech morfologicznych (po 5 sztuk z każdego klastru). Pośród nich przeważają izolaty zdolne do tworzenia żółtego/pomarańczowego barwnika (6 izolatów), choć tworzony jest on w różnych temperaturach, cztery izolaty (Po2xPo2 23/9, Po2xPo1 6/2, Po2-1, Po2-4) nie wytwarzały barwnika.

Uzyskane wyniki, można uznać za obiecujące i warte dalszej weryfikacji w kolejnych badaniach, gdyż stwarzają one nadzieję na możliwość zastosowania w praktyce rolniczej wybranych szczepów bocznika do zahamowania rozwoju populacji mątwika burakowego w glebie na stanowiskach silnie zasiedlonych nicieniami. Przeprowadzone badania potwierdzają potencjał nicieniobójczy bocznika ale jednocześnie ukazują dużą różnorodność cech w potomstwie. Dalsze badania powinny skupić się na selekcjonowaniu grzybni efektywnych bójczo wobec nicieni, na opracowaniu efektywnych możliwości pomiaru tej cechy, w tym wpływu podłoża, gdyż aktualne eksperymenty wskazują na wpływ warunków wzrostu grzybni (najprawdopodobniej w kontekście źródła azotu – różnica pomiędzy podłożem PDA i agar wodny) oraz na określeniu warunków rozwoju i funkcjonowania takich grzybni w środowisku glebowym.