

Łukasz Furmanek

Wpływ kompleksu substancji porostowych na wybrane grzyby glebowe

Streszczenie

Głównym celem przeprowadzonych eksperymentów było określenie wpływu wyekstrahowanego wodą deszczową kompleksu substancji porostowych na dynamikę wzrostu mycelium trzech wybranych przedstawicieli wielkoowocnikowych Basidiomycota – *Armillaria borealis*, *Heterobasidion parviporum* i *Hebeloma crustuliniforme*. W celu optymalizacji warunków doświadczalnych, przeprowadzono wstępne eksperymenty mające na celu określenie: (1) typu pożywki i temperatury hodowli kultur grzybowych, (2) użyteczności trocin drzewnych w hodowli izolatów *A. borealis*, (3) skutecznej metody ekstrakcji wodnej, czasu ekstrakcji i wpływu odczynu pH rozpuszczalnika w trzech wartościach – pH 3 (zakwaszony), pH naturalne i pH 9 (alkalizowany), (4) gatunków porostów, jako źródła różnorodnych substancji porostowych w hodowlach zasadniczych, (5) określenia dawki ekstraktu oraz czasu pomiędzy jego suplementowaniem a szczepieniem inokulatów grzybowych na podłożu hodowlanym. Finalnie, do dalszych eksperymentów wybrano sześć gatunków porostów epigeicznych, t.j.: *Cetraria islandica*, *Cladonia arbuscula*, *C. mitis*, *C. digitata*, *C. rangiferina* i *C. uncialis* oraz jeden gatunek epifityczny – *Pseudevernia furfuracea*, z których uzyskiwano ekstrakty jednogatunkowe oraz ekstrakty ze zmieszanych plech w dwóch zestawach: (1) *Cladonia mitis* + *C. digitata* + *C. rangiferina* i (2) *Cetraria islandica* + *Cladonia mitis* + *C. digitata* + *C. rangiferina* + *C. uncialis*. Ekstrakcji wodnych (w odczynie pH 9) w fazie finalnej eksperymentów dokonywano dwoma metodami: 1) metodą ogrzewanej żarówką kąpeli wodnej plech porostów, zwanej „metodą żarówkową” i 2) metodą gotowania plech porostów w kąpeli wodnej, zwanej „metodą herbacianą”.

Przed założeniem właściwej hodowli kultur grzybowych *in vitro* wszystkie ekstrakty wodne z plech porostów suplementowano w dawkach 1 ml, 2 ml, 3 ml i 4 ml dwoma sposobami: 1) na powierzchnię zestalonej pożywki Hansena oraz 2) przez wymieszanie ich z pożywką. Uzyskiwane wyniki dynamiki wzrostu mycelium rejestrowano za pomocą Techniki Zatrutej Żywności (PFT). Przeprowadzono analizę chromatograficzną UPLC-PDA-ESI-MS ekstraktów, w celu określenia profilu chemicznego metabolitów wtórnych porostów, wpływających na wzrost kultur grzybowych testowanych trzech gatunków *macromycetes*.

Rezultaty doświadczeń *in vitro* pokazały, że efektem „ekstrakcji żarówkowej”, która odzwierciedla w pewnym stopniu okoliczności możliwe do zaistnienia w warunkach naturalnych, jest uzyskanie takich stężeń kompleksów substancji porostowych, w tym metabolitów wtórnych, które częściej stymulują niż inhibują rozwój grzybni testowanych reprezentantów Basidiomycota. Hodowle

zasuplementowane ekstraktami uzyskanymi „metodą herbacianą”, potwierdziły pro-witalne oddziaływanie kompleksu substancji porostowych, szczególnie wobec kultur *A. borealis*.

Obserwowane efekty (stymulacja-inhibicja) były równocześnie zdeterminowane poziomem dyspersji wyekstrahowanych wodą substancji w podłożu hodowlanym. Większy potencjał ograniczający wzrost kultur *Heterobasidium parviporum* i *Hebeloma crustuliniforme* obserwowano w metodzie suplementacji ekstraktu do pożywki, podczas gdy kultury *A. borealis* rosły porównywalnie w obu sposobach suplementacji. Nie stwierdzono efektów grzybobójczych w żadnej z testowanych kombinacji.

Reakcja grzybni na substancje porostowe jest efektem specyfiki gatunku, ale zależy również od zastosowanej metody ekstrakcji czy sposobu rozprowadzenia substancji porostowych – powierzchniowo na zestalonej pożywce lub włąębnie. Ogólnie, największy potencjał stymulujący dynamikę wzrostu testowanych myceliów zmierzono w hodowlach z „wyciągiem żarówkowym” z plech *Cetraria islandica*, *Cladonia arbuscula* i *C. uncialis*, zaś najwyższy stopień ograniczenia dynamiki wzrostu grzybni miał miejsce w próbach z ekstraktem z plech *Cladonia digitata* i *Pseudevernia furfuracea*. Analogicznie, hodowle suplementowane „ekstraktem herbacianym”, w największym stopniu wzrastały w próbach z ekstraktem z plech *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiferina* i *C. digitata*; najslabszy rozrost grzybni zmierzono w wariantach z ekstraktem z plech *Cladonia arbuscula*, *Pseudevernia furfuracea* oraz – z nieco słabszym poziomem ograniczenia wzrostu mycelium – z plech *C. uncialis*. Ekstrakty ze zmieszanych plech epigeitów, podobnie jak wyciągi na bazie plech jednogatunkowych, wykazały podobne specyficzno-metodologiczne zależności oddziaływania na dynamikę wzrostu mycelium testowanych grzybów.

Największe rozmiary grzybni hodowanych *macromycetes* w próbach dawkowanych ekstraktami wodnymi z plech porostów dochodziły do blisko 190% średnich dymensji grzybni w próbach kontrolnych, natomiast najwyższy poziom inhibicji ograniczył ich rozmiary do około 30% średnich dymensji kultur w próbach kontrolnych. W ujęciu ogólnym, najmniejszą amplitudę dynamiki wzrostu (największą oporność na potencjał kompleksu substancji porostowych) obserwowano dla izolatów *H. crustuliniforme*.

Uzyskane wyniki doświadczeń w oparciu o „ekstrakcję żarówkową” wskazują na konieczność zmiany paradygmatu, mówiącego o allelopatycznej roli metabolitów wtórnych porostów w przyrodzie, jako substancji wyłącznie hamujących rozwój mikroorganizmów, w tym grzybów. Wyekstrahowane wodą pierwotne i wtórne metabolity porostowe (kompleks substancji), w stężeniach takich, jakie uzyskano w przeprowadzonych eksperymentach, wydają się oddziaływać w środowisku naturalnym bardziej jako stymulatory wzrostu mycelium glebowych grzybów wielkoowocnikowych – przynajmniej w świetle trzech poddanych eksperymentom gatunków.

Ekstrakty uzyskane „metodą herbacianą” wydają się być nie tylko skutecznym, ale i bezpiecznym środkiem grzybostatycznym względem patogena *Heterobasidium parviporum*. Jednocześnie, przeciwko *A. borealis*, obiecujące wydają się być wyciągi wodne z plech *P. furfuracea*.

Względem *Hebeloma crustuliniforme* przyszłościowe wydaje się zastosowanie niskich dawek substancji porostowych jako środków promikoryzowych.

Opisane w niniejszej pracy wyniki przeprowadzonych eksperymentów stanowią obiecujący kierunek badań nad rolą i wykorzystaniem substancji porostowych ekstrahowanych wodą, na wielu płaszczyznach, włączając ekologiczną, fitofarmakologiczną, medyczną i gospodarczą.

.....
Data złożenia

.....
podpis autora pracy