

Próby wykorzystania reakcji barwnych odczynnika EP w grzybach z rodzaju *Lactarius* do celów taksonomii

APOLONIUSZ RYMKIEWICZ

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Akademii Medycznej we Wrocławiu

Rymkiewicz A.: (Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Medical Academy, Kochanowskiego 10, 51-601 Wrocław, Poland). *Attempts to use coloured reactions of the EP reagent for taxonomic purposes in fungi of genus Lactarius*, Acta Mycol. 16(2): 231-236, 1980.

Species of fungi in genus *Lactarius* were tested for reaction with Stahl's EP—reagent. The reagent turned blue, green, yellow, violet or brown. This can be used for taxonomic purposes.

WSTĘP

Wykonywane próby reakcji barwnych jakie daje odczynnik EP Stahla z mięszem owocników grzybów z rodzaju *Lactarius* sugerują, że można będzie reakcje te wykorzystać do celów taksonomicznych (Nespiak, Rymkiewicz 1977). Staże się to szczególnie interesujące w odniesieniu do materiałów zielnikowych, reakcji takich bowiem dotąd nie stosowano, względnie nie dawały one żadnych wartościowych rezultatów. Matheis (1972, 1975, 1977) podaje w tym względzie obszerną literaturę mówiącą przede wszystkim o wykorzystaniu reakcji barwnych miąższu owocników świeżych grzybów jako pomocniczych cech diagnostycznych. Prace chemików dotyczące gatunków z rodzaju *Lactarius* stwierdzają występowanie w tych grzybach związków o charakterze seskwiterpenów oraz wyjaśniają strukturę i budowę chemiczną niektórych związków (Daniewski, Kocór 1970, 1971; List, Hackenberg 1973; Magnusson i Thoren 1972, 1973, 1974 i in.).

Możliwość zastosowania reakcji z odczynnikiem EP pozwala na korzystanie z materiałów zielnikowych bez większej szkody dla zbiorów, gdyż wymaga minimalnej ilości (50 mg) materiału. Wyniki uzyskane dotychczas wskazują, że w obrębie przebadanych 29 gatunków z rodzaju *Lactarius* tylko jeden (*L. porninsis*) nie dawał reakcji barwnej z tym odczynnikiem (Nespiak, Rymkiewicz 1977).

Barwne reakcje odczynnika EP z miąższem
Coloured reactions of EP reagent with

Gatunek Species	Miejsce zbioru i siedlisko Place of collection and habitat
<i>L. aspideus</i> Fr.	Krościenko, P., las liściasty na wapieniu — deciduous forest on calcium
— <i>aurantiacus</i> Fr.	Białowieża, P., pod dębami — under oaks
— <i>blennius</i> Fr. f. <i>virescens</i> Lge.	Krościenko, P., las bukowy — beech forest
— <i>bresadolianus</i> Sing.	Tatry, P., pod świerkami — under spruces
— <i>circelatus</i> Fr.	Białowieża, P., pod dębami — under oaks
— <i>controversus</i> Pers. ex Fr.	Vockerode, D., pod topolami — under poplars
— <i>deliciosus</i> Fr.	Torgelow, D., pod świerkami — under spruces
— <i>fluens</i> Boud.	Beskid Żywiecki, P., pod grabami — under hornbeams
— <i>fuscus</i> Rol.	Harkłowa k. Nowego Targu, P., las świerkowy zatorfiony — boggy spruce forest
— <i>fuscus</i> Rol.	Harkłowa k. Nowego Targu, P., torfowisko przy świerkach — peat bog by spruce trees
— <i>glutinopallens</i> Moell. et Lge.	Pieniny, P., pod jodłami — under firs
— <i>ichoratus</i> Batsch ex Fr.	Trzebnica k. Wrocławia, P., pod dębami — under oaks
— <i>lilacinus</i> (Lasch) Fr.	Bieszczady (Wetlina), P., olszyna — under alders
— <i>lilacinus</i> (Lasch) Fr.	Bieszczady, P., olszyna — under alders
— <i>lilacinus</i> (Lasch) Fr.	Bieszczady (Moczarne), P., olszyna — under alders
— <i>obscuratus</i> (Lasch) Fr.	Bieszczady, P., olszyny — under alders
— <i>obscuratus</i> (Lasch) Fr.	Torgelow, D., olszyny — under alders
— <i>pergamenus</i> (Swartz ex Fr.) Fr.	Krościenko, P., leszczyny i buki — alders and beechs
— <i>picinus</i> Fr.	Pieniny, P., świerki, jodły — spruces and first
— <i>picinus</i> Fr.	Zakopane, P., las świerkowy — spruce forest
— <i>piperatus</i> Scop. ex Fr.	Wetlina (Bieszczady), P., las bukowy — beech forest
— <i>piperatus</i> Scop. ex Fr.	Strandża, T., las bukowy — beech forest
— <i>pterosporus</i> Romagn.	Krościenko, P., pod bukami — under beechs
— <i>subdulcis</i> Bull. ex Fr.	Wetlina (Bieszczady), P., pod bukami — under beechs
— <i>subdulcis</i> Bull. ex Fr.	Torgelow, D., pod bukami — under beechs
— <i>torminosus</i> Schaeff. Ex Fr.	Białowieża, P., brzozy i świerki — beek and spruces
— <i>trivialis</i> Fr.	Białowieża, P., las iglasty — coniferous forest
— <i>vellerus</i> Fr. var. <i>velutinus</i> Bert.	Bieszczady, P., las bukowy — beech forest
— <i>vellerus</i> Fr. var. <i>velutinus</i> Bert.	Torgelow, D., las bukowy — beech forest
— <i>vietus</i> Fr.	Białowieża, P., pod brzożami — under beeks
— <i>volemus</i> Fr.	Krościenko, P., las liściasty — deciduous forest

Table 1

następujących gatunków mleczai (*Lactarius*)
pulp of the following *Lactarius* species

Zabarwienie odczynnika EP po: Colour of EP reagent after:	
3-4 min.	5-7 min.
ciemnoniebieskie — dark-blue fioletowe — violet ciemnoniebieskie — dark-blue brak zabarwienia — without reaction rdzawe — rusty ciemnoniebieskie — dark-blue jasnozielone — bright green	ciemnoniebieskie — dark-blue ciemnobrązowe — dark-brown ciemnoniebieskie — dark-blue brak zabarwienia — without reaction ciemnobrązowe — dark-brown ciemnoniebieskie — dark-blue jasnozielone — bright-green
niebieskie — blue	niebieskie — blue
fioletowoniebieskie — violet-blue	szaroniebieskie — gray-blue
szaroniebieskie — gray-blue ciemnoniebieskie — dark-blue	szaroniebieskie — gray-blue ciemnoniebieskie — dark-blue
ciemnofioletowe — dark-violet niebieskie — blue niebieskie — blue	czekoladowe — chocolate-brown szarobrązowe — gray-brown szarobrązowe — gray-brown
niebieskie — blue brązowe — brown brązowe — brown	szarobrązowe — gray-brown brązowe — brown brązowe — brown
jasnoniebieskie — bright-blue jasnobrązowe — bright-brown jasnobrązowe — bright-brown	jasnoniebieskie — bright-blue jasnobrązowe — bright-brown jasnobrązowe — bright-brown
niebieskie — blue niebieskie — blue brązowożółte — brown-yellow	niebieskie — blue niebieskie — blue brązowożółte — brown-yellow
niebieskofioletowe — blue-violet niebieskofioletowe — blue-violet	niebieskofioletowe — blue-violet niebieskofioletowe — blue-violet
szaroniebieskie — gray-blue rdzawe — rust	szaroniebieskie — gray-blue rdzawe — rust
ciemnoniebieskie — dark-blue	ciemnoniebieskie — dark-blue
ciemnoniebieskie — dark-blue rdzawe — rust jasnożółte — bright-yellow	ciemnoniebieskie — dark-blue rdzawe — rust jasnożółte — bright-yellow

METODY I MATERIAŁ BADAŃ

Przeanalizowanym obecnie materiałem były suszone owocniki 23 dalszych gatunków z rodzaju *Lactarius* zebranych z różnych siedlisk w Polsce i państwach ościennych. Owocniki suszono na wolnym powietrzu w temp. ok. 35-40°C. Materiał analizowano po 9-10 miesiącach licząc od daty zbioru. Naważki 50 mg suszonych owocników zadawano 3 ml odczynnika EP i ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej w próbkach zabezpieczonych chłodniczkami powietrznymi. Zmianę zabarwienia określano przy pomocy skali barw Bondarceva (1953). Stwierdzono doświadczalnie, że obserwacje zabarwienia należy prowadzić dwukrotnie, tj. po 3-4 i 5-7 min. ogrzewania. W czasie krótszym od 3 min. reakcja nie zachodzi jeszcze w pełni i w niektórych przypadkach nie daje zabarwienia lub, jak jest najczęściej, barwa jest ustalona, ale o mniejszym natężeniu. Po 3-4 min. ogrzewania uzyskuje się właściwe natężenie barwy. Dalsze ogrzewanie, 5-7 min., powoduje często zasadniczą zmianę zabarwienia roztworu. Stwierdzono, że ogrzewanie dłuższe niż 7 min. nie wpływa na zmianę barwy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wśród przebadanych 23 gatunków z rodzaju *Lactarius* można zdecydowanie wyróżnić grupę grzybów, u których — niezależnie od czasu ogrzewania — występuje niebieskie zabarwienie roztworu. Są to: *L. aspidus*, *L. blennius* var. *virescens*, *L. controversus*, *L. fluens*, *L. glutinopallens*, *L. piperatus*, *L. vellereus* var. *velutinus* oraz *L. pergamenus*. Ten ostatni w porównaniu z poprzednimi barwi roztwór odczynnika na kolor jasnoniebieski. *Lactarius lilacinus*, który w początkowej fazie daje barwę niebieską, wyróżnia się w końcowym etapie reakcji zdecydowanie brązowym zabarwieniem. Do drugiej grupy można zaliczyć gatunki, które dają zabarwienie fioletowe lub fioletowoniebieskie, niezależnie od czasu ogrzewania. Są to: *L. fuscus*, *L. torminosus*, *L. subdulcis*. Identyczne zabarwienie w początkowym okresie ogrzewania dają *L. aurantiacus* i *L. ichoratus*, ale zabarwienie to zmienia się na brązowe w trakcie dalszego ogrzewania. Odrębną grupę tworzą gatunki, u których reakcja przebiega w kierunku tworzenia barwy brązowej, niezależnie od czasu ogrzewania. Są to: *Lactarius obscuratus*, *L. circelatus*, *L. picinus*, *L. pterosporus*, *L. trivialis*, *L. vietus*.

Żadnej reakcji barwnej z odczynnikiem nie dawał tylko *L. bresadolianus*, natomiast *L. volemus* barwił go na kolor żółty. Zdecydowanie od pozostałych gatunków wyróżniał się również *L. deliciosus*, który niezależnie od czasu ogrzewania wybarwiał roztwór na kolor zielony.

Wyniki badań barwnych reakcji z odczynnikiem EP, wykonane po-

przednio na 29 gatunkach (Nespiak, Rymkiewicz 1977) i obecnie dla 23 gatunków, pozwalają stwierdzić, że w obrębie wszystkich 52 przebadanych gatunków 15 daje reakcję niebieską, w tym wszystkie zaliczane do sekcji *Albati* s.s. Singer (1975). Mleczaje posiadające mleczko o barwie czerwonej (sekcja *Dapetes* Fr.) wybarwiają odczynnik na kolor zielony. Gatunki z grupy *Camphoratus* (Neuhoff 1956) reagowały specyficznym dając zabarwienie żółte, które następnie przechodzi w brązowe.

Zabarwienie niebieskofioletowe lub fioletowe niezależnie od czasu ogrzewania wykazuje pięć gatunków (*L. glyciosmus*, *L. pyrogalus*, *L. fuscus*, *L. torminosus* i *L. subdulcis*).

Barwę podobną w początkowym okresie, lecz zmieniającą się następnie w brązową lub czekoladową, daje dziewięć gatunków. Zabarwienie rdzawe z odcieniem brązowym uzyskano w ośmiu gatunkach, w tym u trzech (*L. picinus*, *L. lyngyotus*, *L. pterosporus*) należących do sekcji *Plinthogali* ss. Singer. Niezmiennie na kolor żółty wybarwiały odczynnik tylko trzy gatunki (*L. helvus*, *L. serifluus*, *L. volemus*). Dwa gatunki (*L. porninsis* i *L. bresadolianus*) z grupy *Zonarius* nie dawały barwnej reakcji.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazują, że odczynnik EP może być w pewnym stopniu przydatny do analizy materiałów zielnikowych grzybów z rodzaju *Lactarius*. Natomiast odnośnie określenia przy jego pomocy cech natury chemicznej poszczególnych gatunków nie można dać pozytywnej odpowiedzi. Wymaga to dalszych badań chemicznych.

SUMMARY

We have found that heating the pulp of dried carpophores of fungi from the genus *Lactarius* with Stahl's EP reagent causes the solution to become blue, green, purple, yellow or brown. Some species have a coloured reaction independent of the heating time, while in others a two-step reaction depending on the time of heating takes place. Among the 52 species examined we found that fungi from section *Dapetes* Fr. make the reagent green. 15 species, including all from the section *Albati* ss. Singer (1975) gave a blue colour. Species from the group *Camphoratus* (Neuhoff 1956) react specifically giving a yellow colour which subsequently turned to brown. The brown colouring of various intensity was observed in 8 species of which 3 belonged to the section *Plinthogali* Singer 1942). Only 2 species belonging to group *Zonarius* (in the sense of Neuhoff 1956) did not give a coloured reaction.

LITERATURA

- Bondarcev A.S., 1958, Trutovyje griby evropejskoj časti ZSRR i Kavkaza. Izd. Akad. Nauk, Moskwa-Leningrad.

- Daniewski W., Kocór M., 1970, Isolation and structure of some new sesquiterpens from *Lactarius rufus*. Bull. Acad. Polon. Sci. 18: 585-593.
- Daniewski W., Kocór M., 1971, Constituents of higher fungi. II. Structure of lactarorufin, A. Bull. Acad. Polon. Sci. 19: 553-561.
- List P., Hackenberg H., 1973, Die scharf schmeckenden Stoffe von *Lactarius vellereus* Fr., Zeitschr. Pilzk. 39: 97-102.
- Magnusson G., Thoren S., Wickberg B., 1972, Fungal extractives I. Tetrahedron Lett. 12: 1105-1108.
- Magnusson G., Thoren S., Drakenberg T., 1973, Fungal extractives. IV. Tetrahedron Lett. 29: 1621-1624.
- Magnusson G., Thoren S., 1973, Fungal extractives III. Acta Chem. Scand. 37: 1573-1578.
- Matheis W., 1977, Anthracen-grün der vergessene Farbstoff. Zeitschr. Pilzkunde Zeitschr. Pilzkunde 38: 33-47.
- Matheis W., 1972, Chemische Reagenzien in der Hand des Mykologen. 43: 105-106.
- Neuhoff W., 1956, Die Milchlinge. Bad Heilbrunn.
- Nespiak A., Rymkiewicz A., 1977, Próby wykorzystania reakcji odczynnika EP na obecność związków azulenowych w grzybach z rodzaju *Lactarius* do celów taksonomii. Acta Mycol. 13: 263-270.