

Grzyby towarzyszące ryzomorfom *Armillaria* spp. na *Populus tremula* L.

Fungi associated with *Armillaria* spp. rhizomorphs on *Populus tremula* L.

Marta Damszel* , Sebastian Przemieniecki, Katarzyna Dyczewska, Jędrzej Mastalerz

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej,
ul. R. Prawocheńskiego 17, 10-721 Olsztyn, Polska

*Tel. +48 89 5234546, e-mail: marta.damszel@uwm.edu.pl

Abstract. The economic significance of aspen *Populus tremula* L. is only marginal, which is the main reason for its low share in the structure of stands. However, aspen can play a decisive ecological role as a pioneer tree in the succession of forest communities and may decrease the occurrence of pathogenic fungi.

Aspen is also dying out and in order to determine possible biotic causes, we examined taxa of fungi using classical and molecular methods in the area of the Czerwony Dwór Forest District, Subdistrict Rogale, compartments 74b and 75j. The health of aspen trees and the quantitative and qualitative structure of microorganisms associated with *Armillaria* spp. was evaluated.

Based on our health assessment of the aspen, we conclude that the main reason for its dying out is the intensification of root rot, which is a result of *Armillaria* spp weakening the trees. In the general pool of *Armillaria*-associated microorganisms, saprotrophs were dominating, and the fungus *Fomitopsis pinicola* commonly inhabited the poplar stems, whereas pathogen antagonists comprised the lowest proportion. In the quantitative and qualitative structure of fungi found in rhizomorphs, the composition of ecological groups inhabiting stumps was found to be favourable nevertheless. The increasing frequency of pathogens on the logs is a major premise for removing trees affected by *Armillaria*, because aspen stumps are a good food base for *A. cepistipes* and *A. ostoyae* which ultimately spread within the stand. Treatment of stumps with preparations stimulating the decomposition of wood is not recommended for logs that form the food base for pathogenic fungi.

Keywords: Common Aspen, *Armillaria cepistipes*, *Armillaria ostoyae*

Słowa kluczowe: topola osika, *Armillaria cepistipes*, *Armillaria ostoyae*

1. Wstęp

Topola osika *Populus tremula* L. ma szeroki zasięg występowania, zajmuje obszar od Europy, z wyjątkiem południowej Hiszpanii, po Syberię oraz północną Afrykę i Azję Mniejszą (Caudullo, De Rigo 2016). W Polsce topola osika jest drzewem pospolitym, a jej ekotyp górski występuje aż po regiel górny (Gorzela 1999). Udział arealu osiki w Polsce wynosi około 1%, przy czym w Państwowym Gospodarstwie Leśnym Lasy Państwowe (PGL LP) – 0,4%, a w lasach prywatnych – 3% (Milewski 2017).

Gatunki o marginalnym znaczeniu gospodarczym, takie jak topola osika, cenione są w drzewostanach jako szybko kolonizujące stanowiska zalesiane, np. nieużytki, rekultywowane

źwirowiska czy hałdy. Mogą stanowić przedplon w sukcesji zbiorowisk leśnych, będąc naturalnym podgonem pełniącym rolę osłony towarzyszących gatunków, poprawiając tempo ich wzrostu oraz przyspieszając oczyszczanie strzał. Korzenie topoli osiki, podobnie jak brzozy, spulchniają głębokie poziomy gleby, które w przyszłości w naturalnym odnowieniu może zasiedlić sosna (Jaworski 2011). Warto podkreślić, że topola osika jest atrakcyjnym pokarmem dla zwierzyny płowej, wywołującej poważne szkody w uprawach leśnych, dlatego też na stanowiskach poddanych presji ze strony zwierzyny zaleca się jej pozostawianie (Białobok et al. 1973; Gach 2013; Murat 2014). Topola stanowi także drzewo zgrzyzowe dla bobra europejskiego *Castor fiber* L., a jej liście są pokarmem głuszców *Tetrao urogallus* L. (Czyżowski et al. 2009).

Wpłynęło: 22.07.2020 r., recenzowano: 4.08.2020 r., zaakceptowano: 24.08.2020 r.

Eliminacja *P. tremula* z upraw czy drzewostanów gospodarczych podyktowana jest jej podatnością na infekcje i pełnią rolę – drugiego gospodarza grzybów patogenicznych sosny, np. *Melampsora populnea* (Pers.) P. Karst. Dodatkowo, drzewa topoli osiki mogą być zasiedlane przez polifagiczne patogeny: *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. i *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. (Domański 1983; Siemota, Szczepkowski 2014). Inne grzyby notowane na topoli to *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst., *Armillaria* spp. i mniej groźne gospodarczo *Fomes fomentarius* (L.) Fr. i *Phellinus igniarius* (L.) Quél. Topola może być także zasiedlana przez wirusy, powodujące mozaikę topoli (wirusowa mozaika topoli) oraz bakterie *Xanthomonas populi* Ride, powodujące raka tarczowatego topoli (Mańka 2005, 2011).

Celem badań było określenie zdrowotności drzew *P. tremula* oraz identyfikacja zbiorowiska grzybów zasiedlających liczne ryzomorfy stwierdzonych grzybów rodzaju *Armillaria*.

2. Teren, materiał i metody badań

Badania prowadzono na terenie województwa warmińsko-mazurskiego w granicach Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Białymstoku. Zdrowotność 50 losowo wybranych drzew *P. tremula* oceniano w okresie letnim i jesienią 2017 r. w Nadleśnictwie Czerwonny Dwór w Leśn. Rogale. Według regionalizacji przyrodniczo-leśnej nadleśnictwo jest położone w II Mazursko-Podlaskiej krainie przyrodniczo-leśnej, w Dzielnicy 1 Pojezierza Mazurskiego, mezoregionach: Pojezierza Elckiego, Krainy Węgorapy oraz Krainy Wielkich Jezior Mazurskich (Bańkowski et al. 2003). Leśnictwo Rogale usytuowane jest w północnej części nadleśnictwa i należy do obrębu Skalisko, a stanowiska drzew objętych obserwacją, z których pobrano materiał do badań, były zlokalizowane w wydzieleniach 74j (GPS 54,2943; 22,0863) oraz 75b (GPS 54,2915; 22,0831). Wydzielenia te to drzewostany gospodarcze zajmujące siedlisko lasu świeżego, o powierzchni odpowiednio 1,47 ha i 20,79 ha. Udział topoli osiki w pierwszym wydzieleniu wynosił poniżej 5%, a w drugim – 10%.

Ocenę zdrowotności topoli weryfikowano w terenie, określając udział drzew zasiedlonych przez grzyby, a kolejno pobrane próbki drewna z oznakami etiologicznymi występowania grzybów transportowano do laboratorium. Materiał ten stanowiły głównie ryzomorfy opieńki pobrane z dwóch stanowisk zlokalizowanych w każdym z wytypowanych oddziałów leśnych.

W wydzieleniu 74j ryzomorfy pobrano w 2017 r. z pniaka oraz z kłody pozostałych po cięciu w 2016 r., natomiast w wydzieleniu 75b pobrano materiał z dwóch miejsc – z wywrotu z 2014 r. w drugiej klasie rozkładu według pięciostopniowej skali Masera (Maser et al. 1979) oraz pniaka (cięcia w 2016 r.). W celu weryfikacji gatunku z rodzaju *Armillaria* próby reprezentacyjne z powierzchni oznaczono symbolem AR oraz kodem lokalizacji i pochodzenia materiału biologicznego, gdzie cyfra 1 oznaczała wywrot (75b), 2 – pniak (75b), 3, 5 – pniak (74j), 4 – kłodę (74j).

Materiał badawczy w postaci 0,5 cm fragmentów pociętych ryzomorf wkładano na pożywkę agarowo-maltozową (po 7 odcinków) na płytkach Petriego. Każdy fragment sterylizowano powierzchownie w płomieniu palnika. Tak przygotowany materiał (po 10 powtórzeń dla jednego punktu poboru materiału) pozostawiono w termostacie na pożywce przez 10 dni, po czym czyste kultury przeszczepiono na skosy glukozowo-ziemniaczane. Następnie korzystając z mikroskopu Axio Imager A2 firmy Carl Zeiss, oznaczano gatunki lub rodzaje grzybów (Ellis 1971; Domsch, Gams 1993; Kubicek, Harman 1998; Watanabe 2002; Leslie, Summerell 2006).

Kolejnym krokiem była identyfikacja molekularna gatunków *Armillaria* z fragmentów ryzomorf pobranych z czterech wymienionych stanowisk. Protokół prac obejmował izolację DNA za pomocą zestawu GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit (2008) i identyfikację gatunków *Armillaria* z próbki z wyizolowanym DNA za pomocą zagnieżdżonego PCR (nested PCR). Produkty PCR otrzymane przy użyciu starterów AR1 i AR2 (rozdział z nested PCR) poddano sekwencjonowaniu w firmie Genomed SA. Otrzymane sekwencje nukleotydowe regionu ITS1-5.8S-ITS2 porównano z bazą danych GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) za pomocą programu Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Lochman et al. 2004), opracowanego przez Altschul i in. (1990). Z bazy danych National Center for Biotechnology Information (NCBI-GenBank) pozyskano zdeponowane sekwencje innych grzybów rodzaju *Armillaria* i wykonano analizę filogenetyczną w programie MEGA 6 (Tamura et al. 2013). Dopasowanie sekwencji wykonano za pomocą wbudowanej w program funkcji ClustalW (Thompson et al. 1994). W następnym etapie ustalono model ewolucyjny wyliczony na podstawie dopasowanych sekwencji, co umożliwiło wybór metody budowy drzewa filogenetycznego. W celu ukorzenienia drzewa wykorzystano sekwencję ITS należącą do *Fomes fomentarius* o numerze akcesyjnym AY849306. Izolaty *A. cepistipes* zdeponowano w GenBank pod numerami akcesyjnymi MT764333, MT764334, MT764335, MT764336, zaś *A. ostoyae* – pod numerem MT765062 (NCBI Taxonomy Browser, Index Fungorum).

3. Wyniki

Ocena zdrowotności topoli osiki w terenie pozwoliła na określenie potencjalnych zagrożeń gatunku w drzewostanie. Wśród czynników biotycznych na uwagę zasługiwały typowe i specyficzne objawy w postaci owocników grzybów wielkoowocnikowych. Spośród ocenionych 50 stojących drzew 37 (74%) zasiedlonych było przez grzyby. Gatunkiem zidentyfikowanym na podstawie cech morfologicznych owocnika był pniarek obrzeżony *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., powodujący silny rozkład brunatny twardzieli oraz bielu. W wydzieleniu 75b owocniki tego taksonu licznie notowano na całej długości pnia 70-letnich okazów. Drugim, stwierdzonym na podstawie makroskopo-

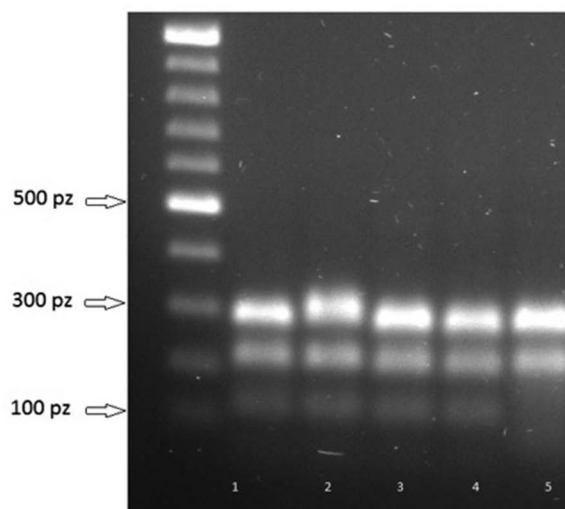
wych oznak etiologicznych, rodzajem były grzyby *Armillaria* spp., których owocniki i ryzomorfy licznie występowały na 13 żywych drzewach (26% obserwowanych) i martwym drewnie *P. tremula*. Różnowiekowe ryzomorfy występowały zarówno na pniu pod korą, jak i na korzeniach. Młode ryzomorfy były cienkie, o białym przekroju, natomiast starsze charakteryzowały się znacznie większą średnicą oraz ciemniejszym przekrojem. Sznury grzybniowe oraz grzybnia zasiedlały kłody oraz pniaki i korzenie, które pozostały w drzewostanie po wycince.

W badaniach genetycznych wzory szczepów od AR1 do AR4 wskazywały na obecność opieńki maczugowatej *A. cepistipes*, natomiast szczep AR5 posiadał odmienny wzór RFLP podjednostki ITS. Testowanie dopasowanych sekwencji pod względem modelu ewolucyjnego ujawniło, że najlepszym sposobem do określenia zmienności analizowanych sekwencji był 2-parametryczny model Kimury z rozkładem Gamma +0,28 (Kimura 1980). Pozwoliło to na ustalenie efektywnej rekonstrukcji zależności filogenetycznych dla użytych sekwencji metodą najbliższych sąsiadów (ang. Neighbor-joining). Podobieństwo izolatów AR1–AR4 było w 100% identyczne z sekwencjami *A. cepistipes*, natomiast najlepszy wynik uzyskany dla izolatu AR5 był przypisany opieńce ciemnej *A. ostoyae* (99%).

Rekonstrukcja filogenetyczna wykazała, że zróżnicowanie w obrębie użytych sekwencji ITS *Armillaria* spp. było niewielkie (największe zaobserwowane zróżnicowanie wynosiło około 0,1 zmian nukleotydów na miejsce). Materiał genetyczny *A. cepistipes* był homogeniczny pod względem sekwencji ITS oraz metody ITS-RFLP. Wskazuje to na wysokie prawdopodobieństwo występowania jednego osobnika na danym siedlisku lub na małe zróżnicowanie genetyczne występujące pomiędzy szczepami tego gatunku. Badany izolat *A. ostoyae* był nieznacznie zróżnicowany w stosunku do szczepu testowego *A. ostoyae* NC1091-B.

Analiza zasiedlenia pobranych ryzomorf przez mikroorganizmy pozwoliła na oznaczenie rodzajów lub gatunków grzybów, które przyporządkowano do odpowiednich grup ekologicznych. W wydzieleniu 75b, biorąc pod uwagę zarówno mykobiotę ryzomorf zasiedlających wywrot, jak i pniak, oznaczono łącznie 91 izolatów mikroorganizmów, w tym 17 taksonów grzybów uzyskano z wywrotu, a 11 z pniaka oraz jeden organizm grzybopodobny (tab. 1). Dominującymi gatunkami w tej lokalizacji były *Mortierella isabelina* (16%) oraz *Trichoderma* spp. (12%) i *Artrihinium phaeosphaerum* (8%). Udział pozostałych gatunków i rodzajów nie przekroczył 7%.

W próbach pobranych w wydzieleniu 74j oznaczono łącznie 136 izolatów mikroorganizmów, w tym z kłody wyizolowano 19 grzybów i 4 taksony grzybopodobne oraz z pniaka 10 taksonów grzybów i jeden organizm grzybopodobny. Najczęściej identyfikowano przedstawicieli rodzaju *Aspergillus* spp. (21%), następnie gatunek *Pythium echinulatum* (15%) oraz rodzaj *Penicillium* spp. (10%). Udział pozostałych mikroorganizmów ze zbiorowiska w wydzieleniu 74j nie przekraczał 8%.



Rycina 1. Rozkład par zasad (pz) sekwencji DNA w wyniku cięcia restrykcyjnego enzymem HinfI. (1 – DNA ryzomorfy z wywrotu (75b), 2 – z pniaka (75b), 3, 5 – z pniaka (74j), 4 – z kłody (74j)

Figure 1. Distribution of base pairs (pz) of a DNA sequence by restriction cleavage with the HinfI enzyme (1 – rhizomorph from tree fall (75b), 2 – from stump (75b), 3, 5 – from stump (74j), 4 – from log (74j))

Na podstawie analizy frekwencji wszystkich zidentyfikowanych gatunków i rodzajów stwierdzono, że dominującą grupą ekologiczną były saprotrofy, stanowiące ogółem 54%. Kolejną grupą były patogeny (27%), a mikroorganizmy antagonistyczne stanowiły mniej liczne zbiorowisko (19%). Na każdym stanowisku badawczym mikroorganizmy antagonistyczne wystąpiły w podobnym udziale, po 15,3% na pniaku i 17,7% na kłodzie w oddziale 74j oraz 20,3% na wywrocie w wydzieleniu 75b i 28,1% na pniaku w tej samej lokalizacji. Udział patogenów różnił się znacząco w przypadku kłody, jako głównej bazy pokarmowej w wydzieleniu 74j, gdyż stanowił aż 45,8% wszystkich mikroorganizmów. Dominującym taksonem zbiorowiska uzyskanych izolatów był rodzaj *Pythium* stwierdzany głównie z prób ryzomorf pochodzących ze stanowisk w wydzieleniu 74j. W pozostałych obiektach wykazano zbliżoną frekwencję patogenów od 16,1 do 21,9% (tab. 1, ryc. 2).

W hodowli na sztucznym podłożu uzyskano również izolaty reprezentujące rodzaj *Trichoderma*, które mogą wykazywać cechy antagonistyczne względem patogenów należących do Oomycetes. W wydzieleniu 75b na wywrocie oraz na pniaku w wydzieleniu 74j dominowały grzyby saprotroficzne, których udział wynosił odpowiednio 28% oraz 35%. Na pniaku w wydzieleniu 75b stwierdzono 50% udział saprotrofów, natomiast na kłodzie w wydzieleniu 74j, stanowiącej bogate źródło związków węgla, wynosił on 38,9%. Porównując udział patogenów na pniaku i wywrocie z wydzielenia 75b, uzyskano podobną frekwencję tej grupy ekologicznej (ryc. 3).



Rycina 2. Drzewo filogenetyczne i zakorzeniecie uzyskanych izolatów AR1–AR5
 Figure 2. Phylogenetic tree and rooting of obtained isolates AR1–AR5

4. Dyskusja i podsumowanie

Właściwości drewna *P. tremula* decydują o marginalnej roli tego gatunku w drzewostanach gospodarczych. Chociaż topola osika jest gatunkiem typowo leśnym, pełni jedynie rolę domieszkową o charakterze przedplonu (Gil 1999). Jej dominujący udział na powierzchniach otwartych i obrzeżach drzewostanów wynika z cech światłożądności oraz odporności na wysokie amplitudy termiczne, następujące po sobie upały i przymrozki, a także z niskich wymagań glebowych (Murat 2014). Na badanym siedlisku lasu świeżego topola osika ustępowała brzozie, sośnie i świerkowi, dochodząc w zależności od lokalizacji do 5–10% udziału w składzie gatunkowym. Udział ten oznacza, że w danym drzewostanie osika mogła mieć znaczący wpływ na sąsiadujące gatunki drzew, zarówno z uwagi na zjawisko konkurencji, jak i na udział korzeni wraz biotą ryzosfery i ryzoplany w profilu glebowym.

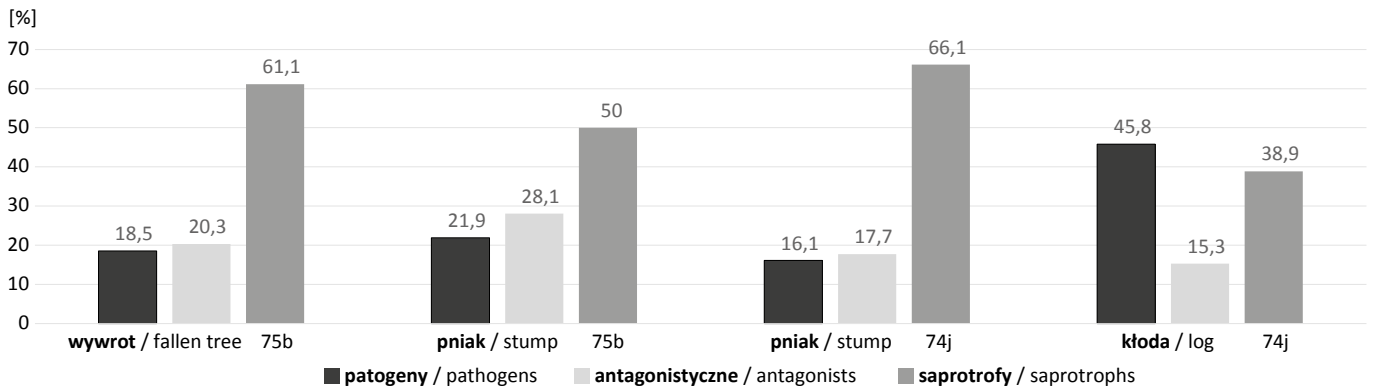
Zagrożeniem kondycji drzewostanów w obu wydzieleniach były grzyby rodzaju *Armillaria*. Topola stanowiła substrat zarówno dla stwierdzonej *A. cepistipes*, jak i *A. ostroyae*, co potwierdzono identyfikując taksony metodami molekularnymi. Te patogeny stanowią poważny problem gospodarczy upraw i drzewostanów głównie iglastych, ale

też liściastych w różnych stadiach rozwojowych (Żółciak 2002), co wskazuje na trudności udatnego odnowienia danej powierzchni. Sznury grzybniowe są długowieczne i charakteryzują się zdolnością pozostawania w glebie w stanie uśpionej aktywności przez wiele lat do momentu stymulowania chemotroficznym sygnałem świeżego substratu lub ich uszkodzenia, np. przez buchtujące w ściółce dziki czy mechaniczne przygotowanie gleby (Wrzosek, Sierota 2012). Obecność ryzomorf na pniakach, wywrotach i kłodach topoli stwierdzono na wszystkich analizowanych stanowiskach. Zdolność wzrostu wierzchołkowego ryzomorf i enzymatycznego rozkładu tkanek strefy przykambialnej potwierdza, że ryzomorfy, jako aktywne inkulum obu gatunków *Armillaria*, mogą penetrować glebę i być zagrożeniem zdrowotności drzew innych gatunków.

Trendy zmian klimatycznych z licznymi ekstremami przebiegu warunków pogodowych oraz zerowanie szkodników czy też niewłaściwy dobór siedliska sprzyjają nasilaniu opieńkowej zgnilizny korzeni (Basham 1988; Kubiak et al. 2017). Według Żółciak (2003) *A. cepistipes* masowo występuje w miejscach, w których nie prowadzi się intensywnej gospodarki leśnej, czyli najczęściej objętych ochroną bierną lub czynną, a badane stanowiska miały przeznaczenie gospodarcze. Należy także podkreślić, że występowaniu *A. cepistipes* sprzyja duże nagro-

Tabela 1. Mikroorganizmy wyizolowane z ryzomorfy *Armillaria* spp. w badanych lokalizacjachTable 1. Isolate microorganisms from *Armillaria* spp. rhizomorphs in the studied locations

Takson / Taxon	Wydz. / Subcomp. 75b		[%]	Wydz. / Subcomp. 74j		[%]
	wywrot	pniak		kloda	pniak	
	fallen tree	stump		log	stump	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	2,00	3,00	5,50	0,00	0,00	0,00
<i>Arthrinium phaeosphaerum</i> (Corda) M.B. Ellis	4,00	3,00	7,70	1,00	7,00	5,80
<i>Arthrobotrys</i> spp.	3,00	0,00	3,30	0,00	0,00	0,00
<i>Aspergillus</i> spp.	0,00	0,00	0,00	6,00	22,00	20,60
<i>Aureobasidium pullulans</i> (De Bary) Arn.	3,00	0,00	3,30	8,00	3,00	8,10
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,72
<i>Cheatomium</i> spp.	6,00	0,00	6,60	2,00	2,00	3,00
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,72
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	3,00	0,00	3,30	0,00	0,00	0,00
<i>Fusarium</i> spp.	5,00	1,00	6,60	0,00	0,00	0,00
<i>Gliomastix cerealis</i> (P. Karst.) C.H. Dickinson	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,72
<i>Gliomastix</i> sp.	1,00	0,00	1,10	0,00	0,00	0,00
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,72
<i>Mortierella isabellina</i> Oudem.	9,00	6,00	16,50	0,00	1,00	0,72
<i>Mucor racemosus</i> Bull.	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	2,20
<i>Mucor</i> spp.	1,00	0,00	1,10	1,00	0,00	0,72
<i>Oidiodendron</i> spp.	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,50
<i>Paecilomyces</i> sp.	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,72
<i>Penicillium</i> spp.	3,00	0,00	3,30	5,00	9,00	10,30
<i>Periconia</i> spp.	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	2,20
<i>Phoma</i> spp.	2,00	0,00	2,20	3,00	0,00	2,20
<i>Pythium catenulatum</i> V.D. Matthews	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	1,50
<i>Pythium debaryanum</i> R. Hesse	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,72
<i>Pythium echinulatum</i> V.D. Matthews	0,00	0,00	0,00	10,00	10,00	14,70
<i>Pythium</i> spp.	0,00	2,00	2,20	6,00	0,00	4,40
<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn	0,00	1,00	1,10	0,00	0,00	0,00
<i>Rhizopus</i> spp.	0,00	3,00	3,30	0,00	4,00	3,00
<i>Scopulariopsis</i> spp.	1,00	1,00	2,20	0,00	0,00	0,00
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	2,20
<i>Trichoderma</i> spp.	4,00	7,00	12,00	0,00	0,00	0,00
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	0,00	0,00	0,00	2,00	1,00	2,20
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai	1,00	0,00	1,10	0,00	1,00	0,72
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainer	3,00	2,00	5,50	1,00	0,00	0,72
<i>Verticillium</i> spp.	3,00	3,00	6,60	10,00	0,00	7,40
Grzybnia niezarodnikująca / Non sporulating mycelium	2,00	3,00	5,50	2,00	0,00	1,50
Ogółem liczba izolatów / Total numer of isolates	56,00	35,00	100,00	74,00	62,00	100,00



Rycina 3. Udział [%] grup ekologicznych mikroorganizmów izolowanych z ryzomorf
 Figure 3. Percentage [%] of ecological groups of microorganisms isolated from rhizomorphs

madzenie materiału organicznego w formie leżaniny, pniaków i wywrotów oraz duża wilgotność podłoża. Gatunek ten występuje częściej na stanowiskach o wyższej zawartości azotu niż *A. ostoyae* (Oliva et al. 2009). Ponadto opieńka maczugowata *A. cepistipes* najczęściej spotykana jest w starych, silnie rozłożonych pniakach, zarówno liściastych, jak i iglastych. Fakt ten ma odzwierciedlenie w badaniach własnych, gdzie stanowiskami poboru ryzomorf były wywroty i pniaki. Oliva i in. (2009) podają, że buk zwyczajny, brzoza brodawkowata czy topola osika w hiszpańskich Pirenejach stanowią łącznie zaledwie 7% domieszki w drzewostanach jodłowych, stąd też niewiele jest badań dotyczących zasiedlenia tych gatunków przez *Armillaria* spp. (Oliva, Colinas 2007; Oliva et al. 2009). W praktyce gospodarki leśnej byłoby zatem konieczne monitorowanie stanowisk z topolą osiką, która zainfekowana przez sprawcę opieńkowej zgnilizny korzeni może być potencjalnym rezerwuarem inokulum gatunków patogenicznych w odnowieniach.

Armillaria cepistipes jest często patogenem wtórnym, pogarszającym stan zdrowotny drzew już osłabionych i współwystępującym z *A. ostoyae*. W badaniach Żółciak (2007) prowadzonych na terenie Nadleśnictwa Czerwony Dwór wykazano obecność *A. cepistipes*, *A. borealis* i *A. ostoyae* na świerku i jodle, na sośnie zaś jedynie *A. ostoyae*. Zatem przygotowując glebę pod odnowienie, gdzie na powierzchni stwierdzono ryzomorfy *Armillaria* spp., należy unikać wyorywania bruzd, a tym samym rozrywania ryzomorf, co mogłoby być czynnikiem stymulującym patogen do wzrostu i rozwoju w glebie (Rykowski 1985; Baumgartner et al. 2011; Kubiak et al. 2017).

Analiza mykologiczna mikroorganizmów towarzyszących *A. cepistipes* i *A. ostoyae* wykazała, że łącznie saprotrofy stanowiły najwyższy odsetek taksonów w zbiorowisku, zarówno w pniaku, jak i w kłodzie; niższy udział wykazały mikroorganizmy antagonistyczne, a najniższy odsetek przypisano patogenom. Dominującym taksonem decydującym o frekwencji mikroorganizmów chorobotwórczych był rodzaj *Pythium*. Przedstawiciele rodzaju *Pythium* oraz *Phytophythium* wraz z *Phytophthora* (należące do Oomycetes) mogą być czynnikami stymulującymi pogorszenie zdrowotności drzew liściastych, np. dębów (Jankowiak et al. 2015). Obfite opady

atmosferyczne w sezonie mogą stymulować udział tych mikroorganizmów w zbiorowisku towarzyszącym *Armillaria* spp. Jest to zarówno wynikiem tworzonych przez Oomycetes zoospor, jak i specyficznej budowy ryzomorf, w których pusta przestrzeń rdzeniowa pełni nie tylko rolę w wymianie gazowej, ale jest także wykorzystywana przez entomofaunę – wektory innych mikroorganizmów (Tomalak et al. 2013; Tomalak 2017).

Wykazany udział *Trichoderma* mógł równoważyć potencjał patogenów, co potwierdzono w doświadczeniu Leforta i in. (2013), gdzie izolaty rodzaju *Pythium* i *Phytophthora* pochodzące z drzew liściastych – dębu i buka, ograniczano przy pomocy saprotrofów o cechach antagonistów, np. rodzaju *Trichoderma* i *Gliocladium*. W analizie mykologicznej i ocenie frekwencji poszczególnych grup ekologicznych na pniakach wykazano, że udział grzybów o potencjale antagonistycznym względem patogenów jest korzystniejszy w porównaniu do zbiorowiska z badanej kłody, na której nie uzyskano równowagi liczebności patogenów i ich potencjalnych antagonistów. Udział patogenów związanych z *Armillaria* spp. na kłodzie był ponad trzykrotnie wyższy niż na pniakach i wywrocie. Może to oznaczać, że pozostawienie w drzewostanie gospodarczym martwego drewna zasiedlonego przez *Armillaria* spp. może dodatkowo zwiększać zagrożenie chorobowe drzew przez organizmy należące do Oomycetes obecne w ryzomorfach opieniek oraz świadczy o konieczności terminowego odbioru i wywozu surowca z powierzchni zrębowej.

Stwierdzony na monitorowanych powierzchniach pniarek obrzeżony zasiedlający topolę osikę, znany ze współwystępowania z innymi grzybami pogarszającymi stan zdrowotny drzew, cechował osobniki osłabione i zamierające. Obecność *Fomitopsis pinicola* jako pasożyta słabości skutkowałą silnym rozkładem brunatnym drewna topoli. Wymieniony pasożyt, wykorzystując głównie celulozę i hemicelulozę ścian komórkowych, zarówno gatunków drzew liściastych, jak i iglastych, może przez zranienia infekować współwystępujące osobniki. Po uwzględnieniu składu gatunkowego w weryfikowanych wydzieleniach pniarek obrzeżony może niekorzystnie kształtować kondy-

cję drzew dominujących, które są eksponowane na licznie uwalniane z owocników zarodniki (BULiGL 2013; Łakomy, Kwaśna 2015).

Na podstawie oceny zdrowotności topoli osiki w obu wydzieleniach (74j oraz 75b) stwierdzono, że najbardziej prawdopodobną przyczyną zamierania topoli osiki były opieńki: *A. cepistipes* i *A. ostoyae*. W ogólnej puli mikroorganizmów towarzyszących ryzomorfozom badanych gatunków *Armillaria* dominantami były grzyby, należące do grupy saprotrofów, a z najniższym udziałem odnotowano grzyby antagonistyczne względem patogenów. W strukturze ilościowej i jakościowej grzybów występujących w ryzomorfozach stwierdzono korzystną dla bilansu obiegu materii i energii proporcję grup ekologicznych: saprotrofów, w tym grzybów antagonistycznych zasiedlających pniaki, w stosunku do niekorzystnego trendu wzrostu frekwencji patogenów na kłodzie. Choć wzajemne oddziaływanie grzybów rodzajów *Armillaria* i *Phlebiopsis* nie jest jednoznaczne, a w warunkach *in vitro* wykazano, że rodzaje te po interakcji grzybni hamują wzajemnie wzrost i tracą biologiczny potencjał, to jednak grzybnia i metabolity *P. gigantea* działają inhibycyjnie na ryzomorfy (Keča 2009). Rykowski i Sierota (1997) wykazali, że oba gatunki grzybów: *P. gigantea* i *A. mellea* sensu lato powodują równie intensywny rozkład drewna, a na drewnie bukowym udowodniono podobne tempo rozkładu drewna przez te grzyby. Może to być praktyczną przesłanką do usuwania z powierzchni drzew porażonych przez *Armillaria* spp. oraz konieczności zabezpieczenia pniaków biopreparatami stymulującymi rozkład drewna w celu wykluczenia bazy pokarmowej grzybów chorobotwórczych.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

Źródło finansowania badań

Badania sfinansowano ze środków własnych autorów.

Literatura

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* 215: 403–410.
- Bańkowski J., Cieśla A., Czerepko J., Czepińska-Kamińska D., Kliczkowska A., Kowalkowski A., Krzyżanowski A., Mąkosa K., Sikora E., Zielony R. 2003. Siedliskowe podstawy hodowli lasu. Dyrekcja Generalna Lasów Państwowych, Warszawa, 282 s.
- Białobok S., Bugała W., Hejnowicz A., Jakuszewski T., Jankiewicz L.J., Obmiński Z., Siwecki R., Środoń A., Surmiński J., Suszka B., Wojterski T., Zabielski S., Żelawski W. 1973. Topole *Populus* L. Tom 12. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa – Poznań, 515 s.
- Basham J.T. 1988. Decay and stain 10 years later in aspen suckers subjected to scarification at age 3. *Canadian Journal of Forest Research* 18: 1507–1521. DOI 10.1139/x88-232.
- Baumgartner K., Coetzee M.P.A., Hoffmeister D. 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology* 12: 515–534. DOI 10.1111/j.1364-3703.2010.00693.x.
- BULiGL. 2013. Plan Urządzenia Lasu Nadleśnictwa Czerwoną Dwór, Obrębu Skalisko, Leśnictwo Rogale na okres 01.01.2014–31.12.2023. Opisy taksacyjne i wykazy. Tom 2. Biuro Urządzenia Lasu i Geodezji Leśnej, Białystok.
- Caudullo G., de Rigo D., 2016. *Populus tremula* in Europe: distribution, habitat, usage and threats, in: San-Miguel-Ayaz J., de Rigo D., Caudullo G., Houston Durrant T., Mauri A. (eds.) European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxemburg, 138–139. ISBN 978-92-79-36740-3.
- Czyżowski P., Karpiński M., Drozd L. 2009. Preferencje pokarmowe bobra europejskiego (*Castor fiber*) na terenach zurbanizowanych oraz chronionych. *Sylvan* 153(6): 425–432
- Domański S. 1983. Fungi that destroyed a *Populus tremula* stand in Lagow Lubuski. *Forest Pathology* 13(3): 166–173. DOI 10.1111/j.1439-0329.1983.tb01414.x.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. 1993. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, London, 1264 s. ISBN 9783980308380.
- Ellis M.B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. X. *Mycological Papers* 125: 1–30.
- Gach P. 2013. http://drzewa.nk4.netmark.pl/atlas/topola/topola_osika/topola_osika.php [15.11.2018].
- GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit. 2008. Zestaw do izolacji DNA z ziemi. Protokół prac molekularnych. Eurx. Molecular Biology Products. Kat. Nr E3570.
- Gorzela A. (red.) 1999. Zalesianie terenów porolnych. Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa, 174 s. ISBN 83-87647-08-X.
- Jankowiak R., Stępniewska H., Bilański P. 2015. Notes on some *Phytophthora* and *Pythium* species occurring in oak forests in southern Poland. *Acta Mycologica* 50(1): 1052. DOI 10.5586/am.1052.
- Jaworski A. 2011. Charakterystyka hodowlana drzew i krzewów leśnych. Tom 3. Powszechnie Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa, 556 s. ISBN 978-83-09-01076-0.
- Keča N. 2009. In vitro interactions between *Armillaria* species and potential biocontrol fungi. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 100: 129–142. DOI 10.2298/GSF0900129K.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Kubiak K., Żółciak A., Damszel M., Lech P., Sierota Z. 2017. *Armillaria* pathogenesis under climate changes. *Forests* 8: 100. DOI 10.3390/f8040100.
- Kubicek Ch.P., Harman G.E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy, and genetics. Volume 1. Taylor and Francis, London, 293 s. DOI 10.1201/9781482295320.
- Łakomy P., Kwaśna H. 2015. Atlas hub. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa, 181 s. ISBN 978-83-7763-336-6.
- Lefort F., Pralon T., Nowakowska J., Oszako T. 2013. Screening of bacteria and fungi antagonist to *Phytophthora* and *Pythium* species pathogenic of forest trees. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. IOBC-WPRS Bulletin* 86: 185–186.
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 402 s. ISBN 1-281-31794-2.
- Lochman J., Sery O., Mikes V. 2004. The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *FEMS Microbiology* 1(237): 105–110.
- Mańka K. 2005. Fitopatologia leśna. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 350 s. ISBN 83-09-01793-6.
- Mańka M. 2011. Choroby drzew leśnych. Powszechnie Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa, 113 s. ISBN 978-83-09-01071-5.

- Maser C., Anderson R.G., Cromack K. Jr., Williams J.T., Martin R.E. 1979. Dead and down woody material, w: Wildlife habitats in managed forests. The Blue Mountains of Oregon and Washington, Thomas J.W. (red. techn.). USDA Forest Service, Agriculture Handbook No. 553, Portland – Washington D.C., 78–95.
- Milewski W. 2017. Lasy w Polsce 2017. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa. ISBN 978-83-65659-22-4.
- Murat E. 2014. Brzoza, olsza, topola – hodowla. Eko-Las, Pruszków, 303 s. ISBN 9788393592944.
- Oliva J., Suz L. M., Colinas C. 2009. Ecology of *Armillaria* species on silver fir (*Abies alba*) in the Spanish Pyrenees. *Annals of Forest Science* 66: 603. DOI 10.1051/forest/2009046.
- Oliva J., Colinas C. 2007. Decline of silver fir (*Abies alba* Mill.) stands in the Spanish Pyrenees: Role of management, historic dynamics and pathogens. *Forest Ecology and Management* 252: 84–97. DOI 10.1016/j.foreco.2007.06.017.
- Product information HinFI. Thermo Scientific. Lot: 00558656. Expiry date: 08.2020.
- Rykowski K. 1985. Niektóre troficzne uwarunkowania patogeniczności *Armillaria mellea* (Vahl) Quèl. w uprawach sosnowych. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa* 640: 1–140
- Rykowski K., Sierota Z. 1997. Badania nad przygotowaniem do produkcji biopreparatu z grzybem *Phlebia gigantea* (Fr.) Donk. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa* 534: 73–90.
- Sierota Z., Szczepkowski A. 2014. Rozpoznawanie chorób infekcyjnych drzew leśnych. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa, 120 s. ISBN 978-83-63895-37-2.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiak A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2750. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673–80. DOI 10.1093/nar/22.22.4673.
- Tomalak M. 2017. Parasite association of the mycetophagous wood nematode, *Bursaphelenchus fraudulentus* with the honey fungus *Armillaria ostoyae*. *Forest Pathology* 47(3): 1–10. DOI 10.1111/efp.12325.
- Tomalak M., Worrall J., Filipiak A. 2013. *Bursaphelenchus masseyi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae) – a nematode associate of the bark beetle, *Trypophloeus populi* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in aspen, *Populus tremuloides* Michx. affected by sudden aspen decline in Colorado. *Nematology* 15(8): 907–924. DOI 10.1163/15685411-00002729.
- Watanabe T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. CRC Press.
- Wrzosek M., Sierota Z. 2012. Grzyby jakich nie znamy. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa, 160 s. ISBN 978-83-61633-87-7.
- Żółciak A. 2002. Rozkład drewna różnych gatunków drzew leśnych przez *Armillaria* sp. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa. Seria A* 936: 111–123.
- Żółciak A. 2003. Rozmieszczenie grzybów z rodzaju *Armillaria* w Polsce oraz ich rośliny żywicielskie. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa. Seria A* 956: 7–22.
- Żółciak A. 2007. *Armillaria* species in coniferous stands. *Acta Mycologica* 42(2): 211–217. DOI 10.5586/am.2007.024.
- Żółciak A. 2015. Zagrożenia upraw i drzewostanów przez grzyby z rodzaju opieńka (*Armillaria*). *Biblioteczka Leśniczego* 375, 18 s.

Wkład autorów

M.D. – opracowanie koncepcji, prace terenowe i laboratoryjne, przegląd literatury, pisanie pracy; S.P. – prace laboratoryjne, opracowanie grafiki; K.D. – prace terenowe i laboratoryjne, przegląd literatury; J.M. – przegląd literatury.