

ZBIGNIEW SIEROTA

## Wpływ grzyba *Phlebiopsis gigantea* (Fr.:Fr.) Jülich na rozkład zabarwianego drewna pniaków sosny zwyczajnej

The Influence of the *Phlebiopsis gigantea* Fungus  
on the Distribution on Dyed Wood in Scots Pine Stumps

### Wprowadzenie

Stosowanie grzyba *Phlebiopsis gigantea* jest obligatoryjnym zabiegiem profilaktycznym w drzewostanach sosnowych na gruntach porolnych, mającym na celu ograniczenie pierwotnych i wtórnych infekcji patogena *Heterobasidion annosum*, sprawcy huby korzeni (3, 6). Aplikacja preparatu biologicznego typu PgIBL, zawierającego żywą, zarodnikującą kulturę grzyba *P. gigantea*, poprzedzona jest uprzednim nacięciem ochranianego pniaka. Po zabiegu pniak powinien być nakryty mchem lub ściółą w celu zwiększenia skuteczności kolonizacji grzybni. Te dwa fakty wynikające z instrukcji stosowania preparatu oraz obecność w nacięciu przerośniętych grzybnią trocinek bukowych stanowiących podłoże, powinny być wystarczającym argumentem dla osób sprawdzających wykonanie zabiegu ochronnego. Według opinii wielu użytkowników, lepszym wskaźnikiem wykonania tego zabiegu byłby zabarwiony preparat PgIBL, zabarwiona jego forma robocza (zawiesina wodna), lub zabarwiony pniak.

W prezentowanej pracy przedstawione są wyniki rozpoczętych przed laty badań uwzględniających niektóre z postulowanych wątpliwości (2). Oceniono rozkład drewna sosnowego przez *P. gigantea* po uprzednim zabarwieniu próbek bezpośrednio lub po rozpuszczeniu barwnika w zawieszynie wodnej. Przyjęto, że barwniki takie powinny łatwo rozpuszczać się w wodzie, być mało toksyczne dla organizmu grzybowego, stosunkowo trwałe i niezbyt kosztowne. W przypadku pozytywnego wyniku testów barwienie preparatu lub zawieszyny mogłoby być zalecane jako dodatkowa czynność kontrolna wykonania zabiegu, abstrahując od zwiększonych kosztów zabiegu i jego pracochłonności.

# Materiały i metody

## a. Test pożywkowy

Do pożywki maltozowo-agarowej (MEA) dodano barwniki wykorzystywane zwykle w badaniach mikrobiologicznych – 0,4% błękit bromotymolowy (dwubromotymolosulfoftaleina  $C_{27}H_{28}O_5Br_2S$ ), 0,25% zieleń malachitową (pochodną diaminotriarylometanu) lub 0,3% czerwień obojętną (chlorowodorek czerwieni toluylenu) (1). Przy wyborze tych barwników uwzględniono także fakt metachromazji, tzn. zmiany zabarwienia zależnie od odczynu podłoża. Przykładowo, czerwień obojętna w roztworze o odczynie kwaśnym zmienia barwę na niebieską, zaś w zasadowym – na żółtą.

Na zestaloną w szalkach pożywkę wyłożono centralnie fragment ( $1\text{ cm}^2$ ) 14-dniowej kultury *P. gigantea* i po 14 dniach oceniono stopień rozwoju grzybni, zarodnikowanie oraz zmiany barwy podłoża w porównaniu z pożywkami kontrolnymi, bez barwnika.

## b. Barwienie zawiesiny roboczej biopreparatu

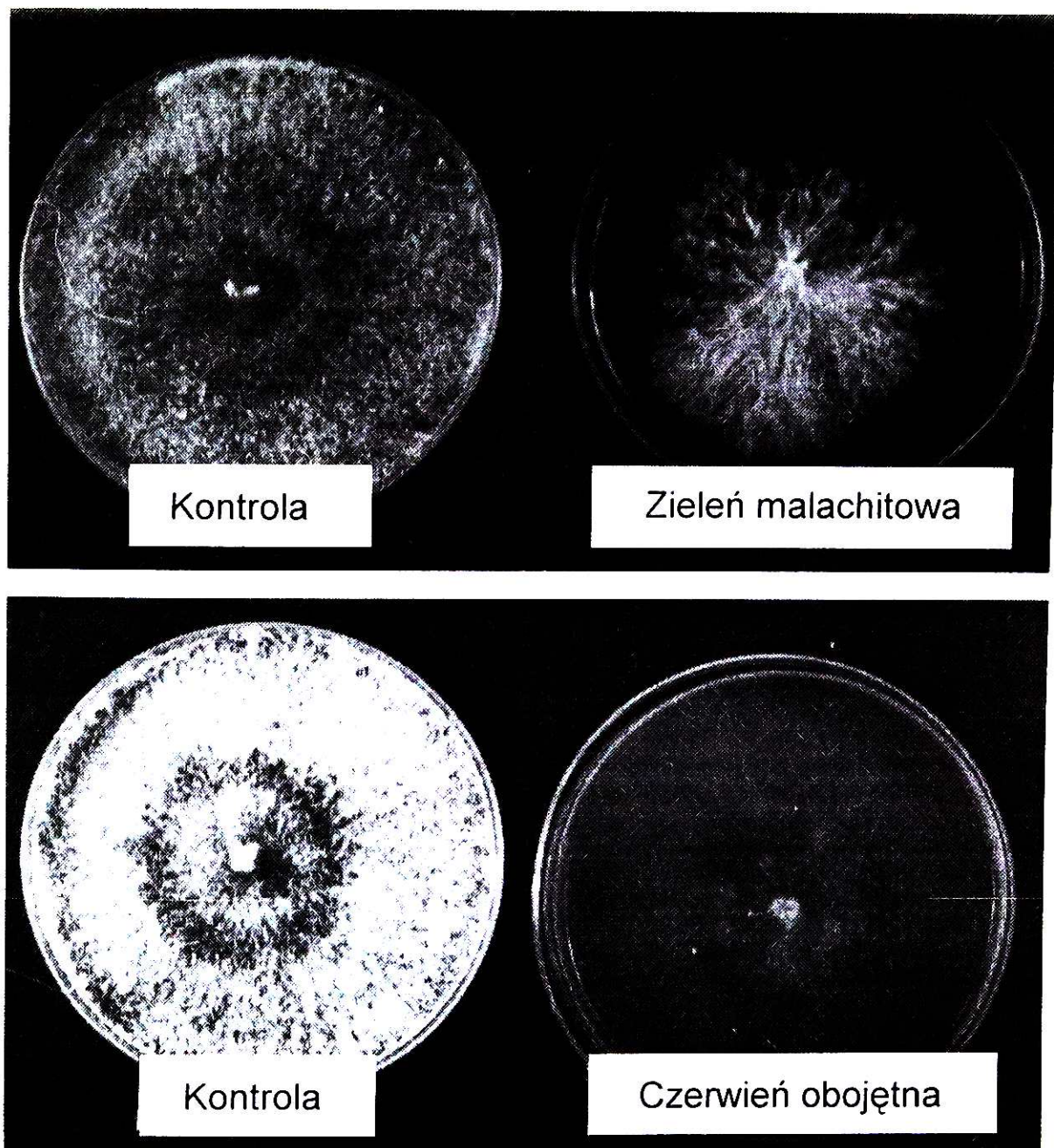
Do takiej samej ilości wody, z jakiej uzyskuje się zawiesinę roboczą preparatu z grzybem *P. gigantea* (typu „PgIBL”) dodano zieleń malachitową lub czerwień obojętną uzyskując jej wyraźne zabarwienie. Wpływ odczynnika na rozkład drewna określano analizując ubytek suchej masy próbek. Próbki stanowiły wysuszone uprzednio do stałej masy i nawilżone do wilgotności około 70%: 1) patyczki sosnowe o wymiarach 7x50 mm lub 2) klocki sosnowe o wymiarach 1,5x2,5x5,0 cm, umieszczone na 1 godz. w zabarwionej cieczy roboczej preparatu. Próbki w 10 powtórzeniach wyłożono do kolb Kollego na rosnącą kulturę *P. gigantea* i po dwóch (patyczki) lub trzech (klocki) miesiącach inkubacji w temperaturze 20°C ponownie je wysuszono w temperaturze 105°C i zważono (metoda suszarkowo – wagowa). Wariant kontrolny stanowiły próbki traktowane analogicznie, jednak bez barwnika w cieczy roboczej.

## c. Barwienie powierzchni ścięcia pniaka

Próbki drewna, analogiczne jak w doświadczeniu b), pomalowane odpowiednim barwnikiem w rozcieńczeniu z wodą 1:10, po lekkim podsuszeniu jałową bibułą filtracyjną również wyłożono na rosnącą kulturę *P. gigantea*. Ocenę ubytku suchej masy drewna próbek określono w tym samym okresie (po 2 lub 3 miesiącach). Uzyskane wyniki oceniono wykonując analizę wariancji (test F).

## Wyniki badań

Ocena stopnia rozwoju grzybni *P. gigantea* na pożywkach zawierających barwniki wykazała, że nastąpiło całkowite odbarwienie pożywek z błękitem bromotymolowym i zieleń malachitową. Jedynie na pożywce z czerwieńią obojętną nie stwierdzono zmiany zabarwienia pożywki, w porównaniu z pożywką nieszczepioną. Na pożywce zawierającej błękit bromotymolowy i zieleń malachitową stwierdzono także wyraźne zahamowanie wzrostu grzybni i brak jej fragmentacji na zarodniki oidialne. Zarodnikowanie grzybni na podłożu z czerwieńią obojętną było natomiast większe, niż na pożywce kontrolnej ( $6,8 \times 10^8$  oidiów/ml) (ryc.).



RYC. Wygląd grzybni *Phlebiopsis gigantea* na pożywkach agarowych zawierających zieleń malachitową lub czerwień obojętną oraz na pożywkach kontrolnych

Obecność barwników w zawieszynie roboczej spowodowała zmniejszenie aktywności rozkładu drewna przez *P. gigantea*. Ubytek suchej masy drewna patyczków sosnowych po 2 miesiącach inkubacji wyniósł średnio 12,08% dla barwnika czerwonego i 10,76% dla barwnika zielonego. W wariancie kontrolnym średni ubytek suchej masy drewna wynosił 14,43% i był, odpowiednio, o 15,6% lub o 24,9% większy niż po zastosowaniu barwników (tab. 1). Barwione klocki sosnowe, o większych parametrach niż patyczki, poddane oddziaływaniu *P. gigantea* przez 3 miesiące, również były w mniejszym stopniu rozkładane, niż klocki kontrolne. Różnice te wyniosły 10,1% w wariancie z czerwiecią obojętną i aż 58,7% w wariancie z zielenią malachitową.

TABELA 1

Średni ubytek (%) suchej masy drewna próbek po zabarwieniu zawiesiny roboczej (wariant b) oraz próbek kontrolnych zasiedlonych przez *P. gigantea*

Rodzaj próbki	Wariant barwienia zawiesiny	Ubytek suchej masy drewna	Ubytek jako %kontroli	Różnica: kontrola-barwnik
Patyczki <sup>x</sup>	Czerwień	12,08	84,4	15,6
	Zieleń	10,76	75,1	24,9
	Kontrola	14,43	100,0	–
Klocki <sup>y</sup>	Czerwień	9,41	89,9	10,1
	Zieleń	4,32	41,3	58,7
	Kontrola	10,47	100,0	–

x – ocena ubytku suchej masy drewna po dwóch miesiącach; y – ocena po trzech miesiącach

TABELA 2

Średni ubytek (%) suchej masy drewna próbek po ich zabarwieniu (wariant c) oraz próbek kontrolnych zasiedlonych przez *P. gigantea*

Rodzaj próbki	Wariant barwienia zawiesiny	Ubytek suchej masy drewna	Ubytek jako %kontroli	Różnica: kontrola-barwnik
Patyczki <sup>x</sup>	Czerwień	7,40	51,7	48,3
	Zieleń	9,78	68,3	31,7
	Kontrola	14,32	100,0	–
Klocki <sup>y</sup>	Czerwień	8,13	77,7	22,3
	Zieleń	4,25	40,6	59,4
	Kontrola	10,47	100,0	–

x – ocena ubytku suchej masy drewna po dwóch miesiącach; y – ocena po trzech miesiącach

TABELA 3

Analiza wariancji średniego ubytku suchej masy drewna klocków zależnie od rodzaju barwnika oraz wariantu barwienia w porównaniu z kontrolą

Źródło zmienności	Średni kwadrat	F obl.	F 0,05
Barwnik	20,42	78,9*	19,0
Barwienie	0,30	1,17	18,5
Błąd	0,26	19,0	

Zabarwienie drewna (patyczków lub klocków) przez ich pomalowanie również wpłynęło na znaczne ograniczenie jego rozkładu przez *P. gigantea*. W przypadku barwnika zielonego ubytek suchej masy drewna, w porównaniu z kontrolą, był mniejszy o 48,3% dla patyczków i o 22,3% dla klocków (tab. 2). Czerwień obojętna wpłynęła ograniczająco na *P. gigantea*, co wyraziło się zmniejszeniem rozkładu drewna odpowiednio o 31,7% i 59,4%.

Jak wykazano w analizie wariancji (tab. 3), sposób barwienia drewna próbek (przez zabarwienie zawiesiny wodnej lub bezpośrednio zabarwienie drewna) nie był tak istotny dla stopnia rozkładu drewna, ocenianego na podstawie ubytku suchej masy klocków, jak rodzaj barwnika (zielony, czerwony). W przypadku czerwieni obojętnej barwienie zawiesiny roboczej było mniej korzystne (ubytek 10,1%), niż w przypadku malowania drewna (ubytek 22,3%). W obydwu wariantach barwienia zielenią malachitową aktywność grzybni *P. gigantea* była zbliżona (58,7% i 59,4%).

## Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują, że obecność zastosowanych w tej pracy barwników wpłynęła ograniczająco na rozwój grzyba *Phlebiopsis gigantea*, znanego z szybkiego tempa kolonizacji substratu i rozkładu drewna (3, 4). Czerwień obojętna spowodowała szybkie odbarwienie podłoża, zaś zieleń malachitowa nie tylko wpłynęła na ograniczenie rozwoju grzybni na pożywce, lecz także istotnie zmniejszyła tempo rozkładu drewna. Oznacza to, że struktura chemiczna barwników istotnie wpływa na metabolizm grzyba i wytwarzanie przez niego odpowiednich enzymów (3); syntetyczny barwnik zieleni malachitowej (z grupy triarylometanowej) okazał się mało przydatny jako marker wykonania zabiegu.

Dobór barwników pozostaje sprawą dyskusyjną – w przedstawionych badaniach był on wypadkową dostępności, ceny, labilności pod wpływem pH podłoża i światła. Być może wskazane byłoby podjęcie dalszych studiów nad oddziaływaniem innych barwników, także naturalnych (np. sok z buraków, z aronii), których ślady na pniaku byłyby dodatkowym świadectwem wykonania zabiegu inokulacji pniaków. Jedynie dla celów kontrolnych możliwe jest także stosowanie innych rozwiązań – na przykład dodawanie do zawiesiny roboczej drobnoziarnistych kulek styropianu. Jest to jednak, zdaniem autora, podobnie jak barwienie – czynność zbędna. Przeświadczenie bezpośrednich wykonawców zabiegu i służb leśnych o konieczności zabezpieczania pniaków i o korzystnym wpływie tego zabiegu na drzewostan (5) oraz sprawna organizacja przebiegu szczepienia pniaków (6) są rzeczywistym gwarantem wysokiej jakości wykonanego zabiegu.

## Literatura

1. **Bagiński S.:** Technika mikroskopowa. PWN Warszawa 1965.
2. **Sierota Z.:** Zastosowanie barwników w biopreparacie PgIBL Las Pol. 1989, nr 18
3. **Sierota Z.:** Rola grzyba *Phlebiopsis gigantea* (Fr.:Fr.)Julich w ograniczaniu huby korzeni w drzewostanach sosny zwyczajnej (*P. sylvestris* L.) na gruntach porolnych. Prace IBL ser. A 1995, nr 810

4. Sierota Z.: Dry weight loss of wood after the inoculation of Scots pine stumps with *Phlebiopsis gigantea*. Eur. J. For. Path. 1997, nr 27
5. Sierota Z.: Wpływ zabiegu ochronnego na zmniejszenie strat powstających w drzewostanie sosnowym na gruncie porolnym. Sylwan 1997, nr 11.
6. Zastosowanie biopreparatów przeciwko grzybom korzeniowym. Znowelizowane wytyczne postępowania ochronnego. DGLP-IBL Warszawa 1993.

## Summary

### **The influence of the *Phlebiopsis gigantea* fungus on the distribution of dyed wood in Scots pine stumps**

The report presents the results of dyeing Scots pine wood on its decay by the *Phlebiopsis gigantea* fungus, as an element of monitoring the performance of biological; control treatments of stumps and trees against root on former agricultural land. First of all there was the impact of malachite green and neutral red assessed. The impact of dyestuffs on *Phlebiopsis gigantea* fungus was assessed on nutrient medium (variant a) and with the aid of an analysis of losses in wood sample dry mass.

The samples (sticks or bloks) dyed in the way appropriate to prepare working suspended preparation containing *Phlebiopsis gigantea* fungus (variant b) and those immediately dyed (variant c) had been placed on a nutrient medium containing *Phlebiopsis gigantea* fungus, and after 2 or 3 months differences in wood decay were assessed and compared with control samples. It was found that neutral red in agar nutrient caused a discolouration of the substrate, while malachite green refrained the fungus culture development (Fig.1).

The influence of the wood-dye variant was less important than the kind of dyestuff. Malachite green refrained the decay of wood samples (blocks) by about 60%, if compared to the control, while neutral red – to about 22,3% (Tabs. 1 and 2). The author does not recommend dyeing as control element, but he postulates to perform preservation treatments according to the guidelines being in force.