

MARTA ALEKSANDROWICZ-TRZCIŃSKA

Określanie stopnia zmikoryzowania systemu korzeniowego rocznych sadzonek sosny na podstawie próby

Defining the level of mycorrhizing
the pine yearling root system as based on a sample

Abstract. Scots pine seedlings grown on 2 substrates: mycorrhized with *Hebeloma crustuliniforme* fungus (M) and non-mycorrhized one (C) were sprayed with fungicides: Bayleton 25 WP, Bravo 500S.C., Dithane M-45, Euparen 50WP, Topsin M70 WP, Zaprawa Funaben T. Using the method of counting both mycorrhizal and autotrophic tips over the whole length of root there was the mycorrhiza level in seedlings defined, and then there the difference was found in the results obtained from the samples of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, and 0.9 length of root. The greatest difference +22.6 % was noted for the C substrate in the control variant for the 0.2 root length sample, while the least 0% for the M substrate in the variant with Funaben T for the sample 0.9.

Keywords: Scots pine, root mycorrhiza level, sample size

Realizacja programu zwiększenia lesistości kraju, odnowienia w reglu górnym, rekultywacja różnych typów terenów, przebudowa drzewostanów powodują wzrost zapotrzebowania na wysokiej jakości materiał sadzeniowy. Jedną z cech charakterystycznych takiego materiału jest dobrze rozwinięty, zaopatrzony w ektomikoryzy system korzeniowy. Poprawę struktury ektomikoryz można uzyskać przez sztuczną inokulację, stosowaną głównie w produkcji sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym. Skuteczność tego zabiegu ocenia się m.in. na podstawie stopnia zmikoryzowania systemów korzeniowych. Jednym ze sposobów określania tej charakterystyki jest liczenie wierzchołków autotroficznym i mikoryzowym, przypadających na cały system korzeniowy, jego część lub na jednostkę objętości gleby. Metoda ta jest prosta lecz bardzo pracochłonna. Można również stosować metody alternatywne, polegające na oznaczaniu w korzeniach zawartości związków chemicznych specyficznych dla grzybów, a nie występujących w roślinie takich jak ergosterol, chityna, trechaloza (2). W badaniach nad identyfikacją morfotypów mikoryz

znajdują również zastosowanie nowoczesne techniki biologii molekularnej, oparte na analizie DNA (5). Są to jednak badania wymagające użycia specjalistycznej aparatury i odpowiednio wyposażonych laboratoriów. W praktyce leśnej stopień zmikoryzowania sadzonek będzie określany najczęściej na podstawie szacowania lub liczenia krótkich korzeni autotroficznych i mikoryzowych.

Celem pracy było określenie różnicy w ocenie stopnia zmikoryzowania korzeni rocznych sadzonek sosny na podstawie liczenia wierzchołków autotroficznych i mikoryzowych na całej długości systemu korzeniowego oraz jego różnej wielkości próby.

Materiał i metody

Materiał empiryczny pochodził z doświadczeń wykonanych w 1999 roku, testujących wpływ fungicydów stosowanych w ochronie szkótek leśnych na rozwój mikoryz sadzonek sosny zwyczajnej. Obiektem badań były roczne sadzonki z zakrytym systemem korzeniowym wyhodowane w namiocie foliowym. Do produkcji wykorzystano dwa rodzaje podłoża: torfowo-perlitowe (C) oraz torfowo-perlitowe ze szczepionką mikoryzową prof. S. Kowalskiego (Katedra Fitopatologii Leśnej AR Kraków) z grzybem *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quel. (M). Wariantami doświadczenia były sadzonki sosny traktowane sześcioma fungicydami (Bayleton 25 WP, Bravo 500 SC, Dithane M-45, Euparen 50 WP, Topsin M 70 WP, Zaprawa Funaben T) oraz jako porównanie sadzonki nieopryskiwane.

Szczegółową charakterystykę fungicydów oraz sposób aplikacji zamieszczono w innych opracowaniach autorki (1, 2).

W końcu października z każdego wariantu doświadczenia pobrano losowo 12 sadzonek (3 sadzonki z każdego z 4 bloków), łącznie analizie poddano 168 systemów korzeniowych. Po wypłukaniu podłoża, pobierając kolejne korzenie, za pomocą mikroskopu stereoskopowego zmierzono całkowitą długość systemu korzeniowego (4) oraz policzono wierzchołki autotroficzne i mikoryzowe. Stopień zmikoryzowania systemów korzeniowych w wariancie obliczono na podstawie ilorazu liczby wierzchołków mikoryzowych i ogólnej liczby korzeni krótkich wszystkich sadzonek. W identyczny sposób obliczono stopień zmikoryzowania sadzonek wyrosłych na podłożu inokulowanym i nieinokulowanym. Tak obliczoną wartość przyjęto za poziom odniesienia do oceny różnicy w stopniu zmikoryzowania określonym na podstawie próby 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 i 0,9 długości korzenia. Dla każdego wariantu podobnie jak na podstawie całego systemu korzeniowego, określono stopień jego zmikoryzowania przy pobieraniu coraz większej próby.

Wyniki i dyskusja

Długość korzeni oraz liczba wierzchołków autotroficznych i mikoryzowych

Średnia długość korzeni tworzących system korzeniowy rocznych sadzonek sosny na podłożu mikoryzowanym wynosiła 612,5 cm, natomiast w wariancie bez szczepienia była o 2,6 cm większa (tab. 1). Bardzo duże różnice w średniej długości korzeni wystąpiły między wariantami doświadczenia. Najmniejszą wartość tej cechy wykazały sadzonki w wariancie kontrolnym na podłożu inokulowanym 419,9 cm. Blisko dwukrotnie dłuższy

TABELA 1a

Średnia długość korzeni, liczba korzeni autotroficznych, mikoryzowych i krótkich (X) rocznych sadzonek sosny oraz współczynniki zmienności tych cech (V%).

Wariant	Podłoże inokulowane (M)							
	długość korzeni (cm)		liczba korzeni		mikoryzowych		krótkich	
	X	V%	X	V%	X	V%	X	V%
Bayleton								
25 WP	690,2	22,6	693	48,2	1414	29,1	2107	23,1
Bravo								
500 SC	562,4	47,9	891	69,9	1057	39,5	1948	32,5
Dithane								
M-45	825,5	28,2	1384	65,8	1352	20,5	2736	30,0
Euparen								
50 WP	503,1	47,3	886	71,6	802	26,3	1688	40,6
Topsin M								
70 WP	817,2	30,3	1687	32,8	1025	42,0	2712	26,5
Zapr.								
Funaben T	469,5	23,2	468	69,3	1190	31,9	1658	36,0
Kontrola	419,9	41,9	467	97,6	1038	46,9	1554	46,9
Podłoże	612,5	41,8	925	76,0	1125	37,2	2050	38,9

system korzeniowy miały sadzonki traktowane Dithanem i Topsinem. Na podłożu nieinokulowanym średnia długość korzeni między wariantami wykazywała znacznie mniejsze zróżnicowanie. Największą wartość tej cechy stwierdzono w wariantach, w których sadzonki opryskiwano Topsinem i Bravo, natomiast sadzonki traktowane Bayletonem i Euparenem miały mniejszą długość korzeni niż sosny wariantu kontrolnego.

Długość korzeni jest cechą bardzo zróżnicowaną. Współczynnik zmienności tej cechy dla obu podłoży wyniósł odpowiednio 41,8% (podłoże ze szczepionką); 38,4% (podłoże bez szczepionki). W obrębie podłoży stwierdzono duże różnice współczynnika zmienności długości korzeni sadzonek reprezentujących poszczególne warianty doświadczenia. Na podłożu inokulowanym wartość tej cechy wynosiła od 22,6% (Bayleton) do 47,9% (Bravo). W mniejszym zakresie zawarta była wartość współczynnika zmienności długości korzeni sosen traktowanych różnymi fungicydami na podłożu nieinokulowanym, od 28,2 do 45,1%.

Średnia liczba korzeni krótkich przypadająca na jedną sadzonkę wynosiła 2050 na podłożu inokulowanym i 1972 w wariacie bez szczepionki. Największą liczbę korzeni krótkich stwierdzono u sadzonek charakteryzujących się najdłuższymi systemami korzeniowymi. Na podłożu inokulowanym były to sadzonki opryskiwane Dithane (2736 szt.) i Topsinem (2712 szt.) oraz Bravo (2620 szt.) w wariacie bez szczepienia podłoża.

TABELA 1b

Średnia długość korzeni, liczba korzeni autotroficznych, mikoryzowych i krótkich (X) rocznych sadzonek sosny oraz współczynniki zmienności tych cech (V%).

Wariant	Podłoże nieinokulowane (C)							
	długość korzeni (cm)		liczba korzeni		mikoryzowych		krótkich	
	X	V%	X	V%	X	V%	X	V%
Bayleton								
25 WP	518,6	28,2	747	50,7	982	49,7	1729	26,6
Bravo								
500 SC	708,4	29,1	1212	47,9	1408	41,5	2620	26,5
Dithane								
M-45	628,4	44,8	995	63,0	1003	42,1	1998	40,7
Euparen								
50 WP	523,5	42,3	919	53,5	849	41,3	1768	45,9
Topsin M								
70 WP	711,3	37,4	1345	44,6	654	51,9	1999	26,2
Zapr.								
Funaben T	624,5	34,4	1094	50,7	854	37,6	1948	26,3
Kontrola	590,7	45,1	802	97,2	939	18,7	1741	41,4
Podłoże	615,1	38,4	1016	58,8	956	46,3	1972	35,7

Na korzeniach sadzonek obok mikoryz tworzonych przez sztucznie wprowadzony *H. crustuliniforme* (wyłącznie na podłożu M) stwierdzono mikoryzy z infekcji naturalnych (na podłożu M i C). Wyraźnie większą liczbą korzeni mikoryzowych charakteryzowały się sadzonki hodowane na podłożu M. Wartość tej cechy wynosiła od 802 sztuk u sosen opryskiwanych Euparenem, do 1414 sztuk w przeliczeniu na sadzonkę traktowaną Bayletonem. Większe średnio różnice liczby wierzchołków mikoryzowych wystąpiły między wariantami na podłożu bez szczepionki, najniższą liczbę tego typu korzeni stwierdzono u sadzonek opryskiwanych Topsinem.

Liczba korzeni autotroficznych i mikoryzowych jest cechą bardzo zmienną. Współczynnik zmienności wahał się w przedziale od 20,5 do 97,6% w wariantach na podłożu inokulowanym oraz od 18,7 do 97,2% na podłożu nieinokulowanym. Największą wartość miał współczynnik zmienności liczby korzeni autotroficznych w wariantcie kontrolnym na obu rodzajach podłoża.

Stosowane w szkółkach fungicydy wpływają na relacje między liczbą korzeni autotroficznych i mikoryzowanych systemu korzeniowego, a tym samym na stopień jego zmikoryzowania (2, 3). Udział wierzchołków mikoryzowych w ogólnej liczbie korzeni krótkich badanych wariantów doświadczenia wyniósł od 37,8% do 71,8% na podłożu inokulowanym oraz od 32,7% do 56,8% na podłożu nieinokulowanym (tab 2). Ogólnie wyższy stopień

TABELA 2
Procentowy udział korzeni mikoryzowych rocznych sadzonek sosny

Wariant	Procentowy udział korzeni mikoryzowanych na podłożu	
	M	C
Bayleton 25 WP	67,1	56,8
Bravo 500 SC	54,3	53,7
Dithane M-45	49,4	50,2
Euparen 50 WP	47,5	48,0
Topsin M 70 WP	37,8	32,7
Zapr. Funaben T	71,8	43,8
Kontrola	69,0	53,9
Podłoże	54,9	48,5

mikoryzacji stwierdzono u sadzonek hodowanych na podłożu ze szczepionką *H. crustuliniforme* – 54,9%. Wyraźnie ograniczający wpływ na udział korzeni mikoryzowych miał Topsin na obu podłożach.

Z przedstawionych danych wynika, że średnia łączna długość korzeni rocznych sadzonek sosny wyhodowanych z zakrytym systemem korzeniowym w namiocie foliowym wynosi ponad 6 m, a średnia liczba korzeni krótkich około 2 tys. Są to cechy wykazujące dużą zmienność. Stosowane w szkółkach fungicydy w celach ochrony sadzonek przed chorobami, wpływają na relacje między liczbą wierzchołków autotroficznych i mikoryzowych, bez wyraźnej zmiany ogólnej liczby korzeni krótkich. Określenie stopnia zmikoryzowania korzeni na podstawie liczby wszystkich korzeni autotroficznych i mikoryzowych jest bardzo pracochłonne, a dodatkowo duża zmienność tych cech sprawia, że dokładność ostatecznej oceny jest obciążona błędem.

Stopień zmikoryzowania korzeni sadzonek sosny określony na podstawie próby

Dążąc do zmniejszenia pracochłonności liczenia wszystkich korzeni autotroficznych i mikoryzowych postanowiono określić stopień zmikoryzowania na podstawie próby z systemu korzeniowego, pobranej ze stałej dla wariantu lub podłoża liczby sadzonek. Dla każdego wariantu pobrano 9 prób, najmniejsza stanowiła 0,1 łącznej długości korzeni, a każda następna była o 0,1 większa (największa stanowiła 0,9 długości korzeni). Dla wariantu na podstawie każdej z prób, określono stopień zmikoryzowania, a następnie obliczono różnicę w odniesieniu do stopnia zmikoryzowania określonego na podstawie liczenia wszystkich korzeni mikoryzowych i autotroficznych 12 sadzonek rocznej sosny. Obliczone różnice dla wariantów doświadczenia z uwzględnieniem wielkości próby i rodzaju podłoża zestawiono w tabeli 3.

TABELA 3a

Różnica (%) w określaniu stopnia zmikoryzowania sadzonek sosny w zależności od wielkości próby systemu korzeniowego

Wariant	Podłoże inokulowane (M)									
	Różnica (%) określania stopnia zmikoryzowania przy wielkości próby									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	
Bayleton 25 WP	+6,9	+2,9	+2,3	-3,1	-5,7	-4,1	-2,2	-1,9	-1,6	
Bravo 500 SC	-18,9	-14,4	-10,4	-11,8	-11,3	-9,2	-11,4	-8,0	-2,6	
Dithane M-45	-8,6	-17,1	-9,6	-4,7	-6,9	-6,7	-4,9	-2,6	-2,2	
Euparen 50 WP	+10,1	+10,3	+6,8	+4,6	+2,0	-1,0	-3,9	+0,1	-1,2	
Topsin M 70 WP	-0,8	-8,4	+0,4	+0,2	-1,8	-0,7	+0,5	+0,7	-0,1	
Zapr. Funaben T	-8,5	-2,9	-3,6	-1,2	-0,2	-1,8	-1,6	-1,5	0,0	
Kontrola	-0,1	-3,1	-5,7	-0,7	-5,3	-6,3	-8,6	-4,1	-2,0	
Podłoże	+9,0	+6,9	+5,6	+0,9	+1,3	-0,4	+2,2	+0,2	-1,7	

TABELA 3b

Różnica (%) w określaniu stopnia zmikoryzowania sadzonek sosny w zależności od wielkości próby systemu korzeniowego

Wariant	Podłoże nieinokulowane (C)									
	Różnica (%) określania stopnia zmikoryzowania przy wielkości próby									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	
Bayleton 25 WP	-8,4	-7,6	-14,1	-14,7	-12,3	-10,7	-7,0	-4,5	-1,2	
Bravo 500 SC	-2,3	+13,0	+8,8	+11,8	+7,2	+3,8	+1,5	+1,1	+0,6	
Dithane M-45	-18,9	-8,8	-3,0	+4,1	-1,6	-1,9	-3,4	-1,7	-0,8	
Euparen 50 WP	+0,6	+1,6	-0,2	1,5	-0,7	-0,6	-1,1	+0,3	+0,1	
Topsin M 70 WP	-13,7	-11,7	-18,3	-16,2	-13,3	-7,6	-5,3	-3,4	-1,7	
Zapr. Funaben T	-9,0	-14,1	-14,4	-18,3	-13,6	-7,6	-5,3	-3,2	-0,7	
Kontrola	+16,8	+22,6	+4,0	-6,0	-8,4	-7,2	-5,0	-2,5	-0,1	
Podłoże	-1,8	+0,7	+2,3	-4,0	-4,5	-3,3	-0,4	+0,9	-0,1	

Udział korzeni mikoryzowych w ogólnej liczbie korzeni krótkich określony na podstawie próby stanowiącej 0,1 całkowitej długości korzeni 12 sadzonek, reprezentujących warianty doświadczenia różni się od wartości rzeczywistej od +10,1% do -18,9% na podłożu inokulowanym oraz od +16,8% do -13,7% w doświadczeniu bez stosowania szczepionki.

Przy tej wielkości próby w zdecydowanej większości pojawiły się różnice ze znakiem ujemnym. Oznacza to, że stopień zmikoryzowania określony na podstawie próby był zaniżony w porównaniu z otrzymanym w wyniku liczenia wszystkich korzeni krótkich.

Zwiększając wielkość próby systemu korzeniowego różnice w ocenie stopnia zmikoryzowania zmieniają się zarówno pod względem wartości jak i znaku. Zwiększenie wielkości próby z 0,1 do 0,2 łącznej długości korzeni sadzonek reprezentujących wariant nie zawsze łączy się ze zmniejszeniem różnicy. W wariantach z Dithane i Topsinem na podłożu inokulowanym oraz Bravo, Funabenem i w kontroli na podłożu bez szczepienia różnice te bardzo wyraźnie zwiększyły się. Na podłożu inokulowanym w większości wariantów doświadczenia różnice w stopniu zmikoryzowania, niezależnie od wielkości próby przyjmują wartości ujemne. Ma to miejsce w wariantach z Bravo, Dithane, Funabenem i w kontroli. W pozostałych wariantach różnice przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Na podłożu nieinokulowanym w trzech wariantach: Bayleton, Topsin i Funaben niezależnie od wielkości próby stopień zmikoryzowania był niższy od wartości rzeczywistej.

Określając stopień zmikoryzowania na podstawie 12 sadzonek sosny, licząc korzenie krótkie i mikoryzowe na połowie długości systemu, otrzymamy na podłożu inokulowanym różnicę w odniesieniu do wartości rzeczywistej wynoszącą od +2,0% do -11,3%, z tym że poza sadzonkami opryskiwanymi Bravo różnica ta nie przekroczy -6,9%. Podobny efekt można uzyskać określając stopień zmikoryzowania sadzonek w wariantach na podłożu bez szczepionki, ale próbę należałoby zwiększyć do 0,6 ogólnej długości korzeni.

Mniejsze różnice w ocenie stopnia zmikoryzowania wystąpiły przy określeniu tej cechy dla sadzonek reprezentujących podłoża (tab 3). Należy jednak mieć na uwadze fakt, że stopień zmikoryzowania był obliczony na podstawie 84 sadzonek, co przy znacznej zmienności ma istotny wpływ na dokładność określenia tej cechy.

Na podłożu inokulowanym daje się zauważyć tendencję do zmniejszania wartości analizowanej różnicy wraz ze wzrostem wielkości próby, ale nie przekraczającej 0,4 ogólnej długości korzeni. Natomiast stopień zmikoryzowania sadzonek rosnących na podłożu bez szczepionki najbardziej różni się od wartości rzeczywistej, wówczas gdy wielkość próby stanowi od 0,4 do 0,6 ogólnej długości systemu korzeniowego.

Z analizy materiału empirycznego wynika, że określenia stopnia zmikoryzowania sadzonek reprezentujących wariant doświadczenia można dokonać pobierając odpowiednią próbę. Na wielkość próby ma wpływ zastosowany fungicyd. Generalnie mniejszą próbę można pobierać z sadzonek wyhodowanych na podłożu inokulowanym. Wyjątek stanowią sadzonki opryskiwane fungicydem Bravo. W tym wariantcie wielkość próby w zakresie od 0,2 do 0,8 ogólnej długości korzeni daje zbliżoną, ujemną rozbieżność wynoszącą około 10%. Na podłożu nieinokulowanym mała próba stanowiąca 0,3-0,4 ogólnej długości korzeni w wariantach z Bayletonem, Bravo, Topsinem i Funabenem daje rozbieżność oceny stopnia zmikoryzowania przekraczającą 10%.

Na podstawie analiz nie można jednoznacznie wskazać wielkości próby, która byłaby wystarczająca do określania stopnia zmikoryzowania korzeni z określonym błędem dla wszystkich fungicydów na obu rodzajach podłoża.

Ocenę stopnia zmikoryzowania systemów korzeniowych rocznych sadzonek sosny przeprowadzono na bazie materiału empirycznego pochodzącego z jednego doświadczenia. Podobne porównania większej liczby sadzonek pozwolą na bardziej precyzyjne określenie optymalnej wielkości próby. Wpłyne to w istotny sposób na zmniejszenie pracochłonności w określeniu bardzo dużej liczby korzeni krótkich z podziałem na autotroficzne i mikoryzowe.

Opracowanie prostej i niezbyt pracochłonnej metody oceny stopnia zmikoryzowania systemów korzeniowych jest jednym z pilnych zadań w badaniach ektomikoryz. Wykorzystanie w produkcji szkółkarskiej symbiozy mikoryzowej wymaga identyfikacji morfotypów występujących na korzeniach produkowanych sadzonek. Również i w tym przypadku istotnym ograniczeniem będzie pracochłonność analizy całego systemu korzeniowego sadzonki, a rozwiązaniem może być ograniczenie pomiaru do odpowiedniej wielkości próby.

*Katedra Ochrony Lasu i Ekologii SGGW
ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa
e-mail: aleksandrow@delta.sggw.waw.pl*

*Serdecznie dziękuję Panu dr. inż. Jackowi Zajączkowskiemu
za opracowanie programu komputerowego do wykonania obliczeń.*

Literatura

1. **Aleksandrowicz-Trzcńska M.:** The effect of fungicides on mycorrhized and non-mycorrhized seedlings of Scots pine. Part I. Growth performance of seedlings. *Fol. For. Pol. Ser. A.* 41: 105-114, 1999.
2. **Aleksandrowicz-Trzcńska M., Kieliszewska-Rokicka B.:** Wpływ fungicydów stosowanych w ochronie szkótek leśnych na rozwój mikoryz siewek sosny. Część. I. Badania zawartości ergosterolu w korzeniach. *Sylvan*6: 73-84, 1999.
3. **Aleksandrowicz-Trzcńska M.:** Wpływ fungicydów stosowanych w ochronie szkótek leśnych na rozwój mikoryz siewek sosny. Część. II. Udział korzeni mikoryzowych i autotroficznych. *Sylvan* 11: 37-46, 1999.
4. **Böhm W.:** Metody badania systemów korzeniowych. PWRiL Warszawa, 1985.
5. Rudawska M. (red.): Ektomikoryza jej znaczenie i zastosowanie w leśnictwie. Instytut Dendrologii PAN, Kórnik, 2000.

Summary

Defining the level of mycorrhizing the pine yearling root system as based on a sample

Scots pine seedlings were grown on two substrates: mycorrhized with the *Hebeloma crustuliniforme* fungus (M) and unmycorrhized one (C). The Bayleton 25WP, Bravo 500SC, Dithane M-45, Euparen 50WP, Topsin M70WP, and Zaprawa Funaben T fungicides were used for spraying. The mycorrhiza level in seedlings was defined using the method of counting both mycorrhizal and autotrophic tips over the whole length of root. Then the difference was found in the results obtained from the samples of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, and 0.9 length of root. The root mycorrhiza level found from the sample differs from the real value from +22.6% to -18.9%. The sort of used fungicide influences the size of the difference. The sample size enlarging does not always accompany the resulting precision increase.