

DOROTA HILSZCZAŃSKA, ZBIGNIEW SIEROTA

Wpływ inokulum mikoryzowego grzyba *Thelephora terrestris* na wzrost sadzonek sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L.* II. Badania polowe

The role of *Thelephora terrestris* fungus in mycorrhization on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings
II. Field study

ABSTRACT

Hilszczańska D., Sierota Z. 2006. Wpływ inokulum mikoryzowego grzyba *Thelephora terrestris* na wzrost sadzonek sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. II. Badania polowe. Sylwan 2: 20-28.

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings which were inoculated with ectomycorrhizal fungus – *Thelephora terrestris* and grown in different regimes of N fertilization [Hilszczańska, Sierota 2006], next year were planted out on post-agricultural land. The development of fine roots after 6 months of vegetation, number of mycorrhizas, identity of some mycorrhizas and growth parameters of Scots pine seedlings were studied. Mycorrhizal abundance was higher in the inoculated previously variants than in non-inoculated ones. PCR RFLP analysis confirmed share of two different isolates of *Thelephora* engaged in mycorrhizal symbiosis. Growth parameters was higher in non-inoculated seedlings. Vitality of seedlings was lower at lower level of N fertilization in non-inoculated treatment.

KEY WORDS

Pinus sylvestris, *Thelephora terrestris*, ectomycorrhiza, soil recultivation

ADDRESSES

Dorota Hilszczańska – Zakład Fitopatologii Leśnej; Instytut Badawczy Leśnictwa;
ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3; 00-973 Warszawa; e-mail: D.Hilszczanska@ibles.waw.pl

Zbigniew Sierota – Zakład Fitopatologii Leśnej; Instytut Badawczy Leśnictwa;
ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3; 00-973 Warszawa; e-mail: Z.Sierota@ibles.waw.pl

Wstęp

System korzeniowy sosny obligatoryjnie tworzy w mikrośrodkowisku glebowym z obecnym komponentem grzybowym charakterystyczne dla niego ektomikoryzy (ECM). Stopień kolonizacji ektomikoryzowej i skład gatunkowy tworzących ją grzybów, szczególnie na glebach rekultywowanych, decyduje w znacznym stopniu o udatności upraw i stabilności tworzących się później ekosystemów leśnych [Haselwandter, Bowen 1996; Mullins i in. 1989].

W celu przyspieszenia i ukierunkowania tworzenia symbioz mikoryzowych coraz powszechniej w praktyce gospodarczej stosuje się sztuczną mikoryzację siewek [Dunabeitia i in. 2003; Cairney, Chambers 1999; Kowalski 1997; Parlade i in. 1996a].

Zwykle wprowadza się te gatunki grzybów mikoryzowych, które są charakterystyczne dla młodego wieku drzew i tworzą symbiozy z wieloma roślinami. Jak wynika z opisywanych w literaturze technologii [Kowalski 1997] najbardziej efektywne dla sztucznej mikoryzacji są szczepionki

* Badania finansowane ze środków Komitetu Badań Naukowych w ramach projektu 3 PO6L 047 24

w postaci grzybni wegetatywnej. Szczepionki zarodnikowe grzybów, np. z rodzaju *Scleroderma*, *Rhizopogon* czy stosowanego w cieplejszych strefach geograficznych *Pisolithus tinctorius*, są co prawda tańszym i prostszym sposobem mikoryzacji, lecz jednocześnie mniej efektywnym [Hilszczańska 2000].

Różnorakie strategie życiowe grzybów mikoryzowych, duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe i wpływ czynników zewnętrznych zmuszają do ciągłych poszukiwań aktywnych szczepów grzybów i doskonalenia sposobów mikoryzacji.

Selekcja szczepów jest niezbędna do minimalizacji prawdopodobieństwa niezgodności między rośliną a występującym w danym środowisku glebowym grzybem ektomikoryzowym, czy też między grzybem ektomikoryzowym a zbiorowiskiem innych grzybów glebowych, w tym saprotroficznych oraz bakterii [Dodd, Thomson 1994]. Stąd grzybnia mateczna stosowana w szczepionkach, niezależnie od formy ich aplikacji w terenie, powinna być pozyskiwana z podobnych warunków edaficznych i klimatycznych, z uwzględnieniem lokalizacji powierzchni, okresu trwania wegetacji, odczynu i wilgotności gleby, jej struktury i zasobności w składniki pokarmowe, jak i historii użytkowania danego podłoża [Bowen 1994].

Uniwersalny, wszędobylski charakter oraz stosunkowo duża tolerancja na wysoką zawartość azotu w glebie grzyba ECM *Thelephora terrestris* Fr. [Colpaert 1999] stały się przesłankami do wykorzystania tego gatunku w sztucznej mikoryzacji siewek sosny, które przeznaczone zostały do wysadzenia na gruncie uprzednio użytkowanym rolniczo. Celem pracy było określenie efektywności sztucznej mikoryzacji, wyrażonej liczbą mikoryz z udziałem *T. terrestris* oraz struktury mikoryz utworzonych u sadzonek sosny po ich wysadzeniu na gruncie porolnym. Wykorzystano w tym celu jednoroczne sadzonki, które były mikoryzowane w roku poprzednim i hodowane w warunkach kontrolowanych w następujących wariantach: 1 – inokulacja +0,2 g N; 2 – 0,2 g N bez inokulacji; 3 – inokulacja +0,3 g N; 4 – 0,3 g N bez inokulacji [Hilszczańska, Sierota 2006].

Material i metody

Powierzchnię badawczą założono na gruncie porolnym na terenie Nadleśnictwa Jabłonna oddział 327. Glebę stanowił piasek słabogliniasty; zawartość węgla i azotu organicznego oraz wybranych pierwiastków i odczynu gleby przedstawiono w tabeli 1. Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym wykorzystując te same 4 warianty doświadczenia laboratoryjnego [Hilszczańska, Sierota 2006]. Wiosną 7 kwietnia 2004 r., kiedy wysadzano sadzonki, opady deszczu były intensywne i wynosiły 27 mm, a temperatura powietrza wahała się od 8 do 10°C. Roczna suma opadów atmosferycznych dla danej powierzchni wynosiła 522,8 mm, a średnia roczna temperatura powietrza 8,4°C.

Na początku września z każdego wariantu pobrano losowo po 10 sadzonek do oceny wielkości parametrów wzrostu (długość pędu i grubość szyi korzeniowej) oraz do oceny liczebności mikoryz. Mikoryzy liczone w całym systemie korzeniowym sadzonek. Cechy morfologiczne mikoryz analizowano według Agerera [1987-1997], Ingleby'ego i in. [1990], Parlade i in. [1996b].

Tabela 1.

Średnia zawartość pierwiastków w glebie na głębokości 20 cm ($g \times kg^{-1}$) i odczyn podłoża
Mean nutrient contents in soil at a depth of 20 cm ($g \times kg^{-1}$) and soil pH

C	N	Ca	Mg	K	P	S	Al	pHKCL
8,3	0,85	1,17	0,67	0,75	0,63	0,10	5,55	4,48

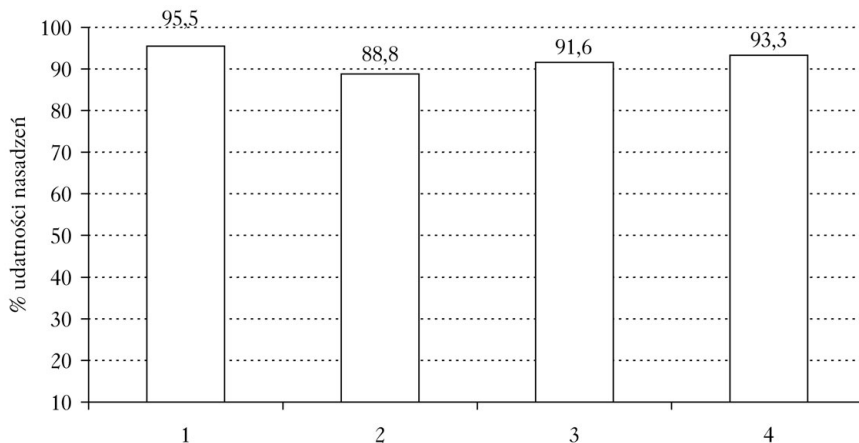
W celu potwierdzenia identyfikacji mikoryz wykonanej metodą tradycyjną, wybrane korzenie krótkie z każdego wariantu analizowano metodą PCR RFLP, badając rDNA partnera grzybowego [White i in. 1990]. Do ekstrakcji DNA z pojedynczego wierzchołka mikoryzowego użyto buforu 2% CTAB (hexadecytrimethylammonium bromide), następnie próbki potraktowane buforem podgrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 65°C (od 45 min. do 1 h). Po odwirowaniu przy 13 000 obr/min. przez 5 min., przenoszono górną fazę do próbówki i oczyszczano chloroformem fenolowym (600 µl przy 600 µl 2% CTAB). Po powtórnym wirowaniu DNA strącano przez dodanie 1,5 objętości isopropanolu (750 µl przy 600 µl 2% CTAB), DNA rozcieńczono w 50 µl TE (10 mM Tris HCl buffer, pH 8,1 mM EDTA). Ekstrakty przechowywano w temperaturze -20°C do chwili zastosowania analizy PCR.

Do zwielokrotnienia (amplifikacji) regionu ITS (wewnętrznej sekwencji niekodującej DNA) zastosowano startery opisane przez White'a i in. [1990]: ITS1-o sekwencji TCCGTAGGT-GAACCTGCGG i ITS4-o sekwencji TCCTCCGCT-TA-TTGATATGC [Erland i in. 1999]. Składniki wymagane dla reakcji PCR zostały przedstawione przez Henrion i in. [1994]. Zwielokrotnione odcinki ITS poddano analizie RFLP, polegającej na cięciu enzymami restrykcyjnymi *Hinf* I, *Mbo* I i *Taq* I, następnie dokonano rozdziału elektroforetycznego uzyskanych fragmentów restrykcyjnych DNA. Produkty analizy restrykcyjnej rozdzielono na 2,4% żelu agarozowym przy napięciu 110 V, a następnie wybarwiono je w bromku etydyny. Fragmenty restrykcyjne obserwowano w świetle UV, a następnie sfotografowano aparatem Polaroid i analizowano za pomocą programu komputerowego Gel-Scan 1.2. Analizy wykonane zostały przez dr. A. Pałuchę w IBiB PAN.

Dane pomiarowe parametrów wzrostu sadzonek analizowano przy użyciu programu Statistica v. 98, według testu Anova; istotność różnic porównywano używając testu NIR.

Wyniki

Największą udatnością nasadzeń (95,5%) charakteryzowały się sadzonki sosny w wariancie 1 (inokulowane w laboratorium +0,2 g N), najmniejszą zaś (88,8%) sadzonki rosnące w wariancie 2 (0,2 g N bez inokulacji). Udatność nasadzeń sadzonki w wariantach 3 (inokulacja +0,3 g N) i 4 (0,3 g N bez inokulacji) była podobna, odpowiednio 93 i 92% (ryc. 1).



Ryc. 1.

Przeżywalność sadzonek sosny na gruncie porolnym: 1 – *Thelephora terrestris* (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N

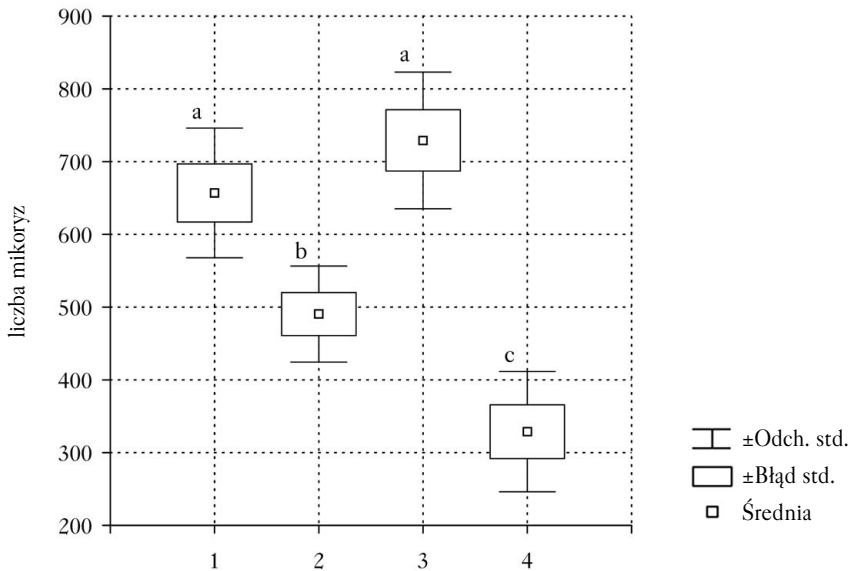
Survival of Scots pine seedlings on the ex-farmland: 1 – *Thelephora terrestris* (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N

Niezależnie od wyjściowych warunków do tworzenia mikoryz (dawki azotu) większą liczebnością mikoryz w terenie charakteryzowały się sadzonki uprzednio inokulowane (ryc. 2). W wariancie 1 średnia liczebność mikoryz wynosiła 659, a w wariancie 3 – 728 szt. Różnice w liczbie mikoryz między wariantami mikoryzowanymi a niemikoryzowanymi były statystycznie istotne. Z kolei w wariancie niskiego nawożenia azotem (2) odnotowano 489 mikoryz, w wariancie (4) wysokiego nawożenia zaś – 328 mikoryz. Między ostatnimi dwoma wariantami różnice w średniej liczbie mikoryz były również statystycznie istotne.

Największą długość pędu stwierdzono u sadzonek niemikoryzowanych z wariantu 2; nieco niższe od nich były sadzonki niemikoryzowane, utworzone w warunkach większego nawożenia – wariant 4 (ryc. 3). Sadzonki mikoryzowane i nawożone większą dawką azotu (wariant 3) uzyskały najmniejszą długość pędu. Różnice między średnimi były statystycznie istotne.

Podobnie kształtowały się różnice między wariantami pod względem parametru grubości szyi korzeniowej. Najmniejszą wartość charakteryzowały się sadzonki z wariantu 3 (ryc. 4).

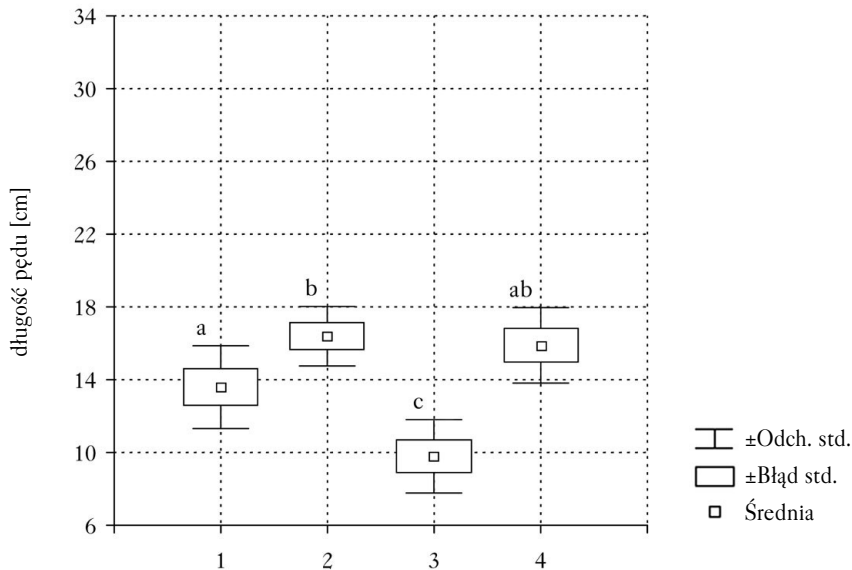
Przedstawione na rycinie 5 mikoryzy należą do rodzaju *Thelephora*, co potwierdza wynik analizy PCR RFLP (tab. 2). Mikoryzy tego samego rodzaju odnotowano również u sadzonek sosny, które nie były uprzednio inokulowane grzybem *T. terrestris*. Ich ogólna liczba była jednak większa o około 35% u sadzonek uprzednio mikoryzowanych i nawożonych 0,2 g N, niż u sadzonek niemikoryzowanych oraz większa o około 30% u sadzonek nawożonych 0,3g N. Określenie liczebności mikoryz należących do *Thelephora* (I) i *Thelephora* (II) (tab. 2) nie było możliwe, z uwagi na brak różnic morfologicznych w ocenie tradycyjnej. Z 22 mikoryz analizowanych metodą PCR RFLP szczep *Thelephora* (I), czyli mikoryzy powstałe w wyniku mikoryzacji,



Ryc. 2.

Średnia liczebność mikoryz u sadzonek sosny po 5. miesiącach od wysadzenia na gruncie porolnym: 1 – *Thelephora terrestris* (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N. Jednakowe litery oznaczają brak istotnych różnic

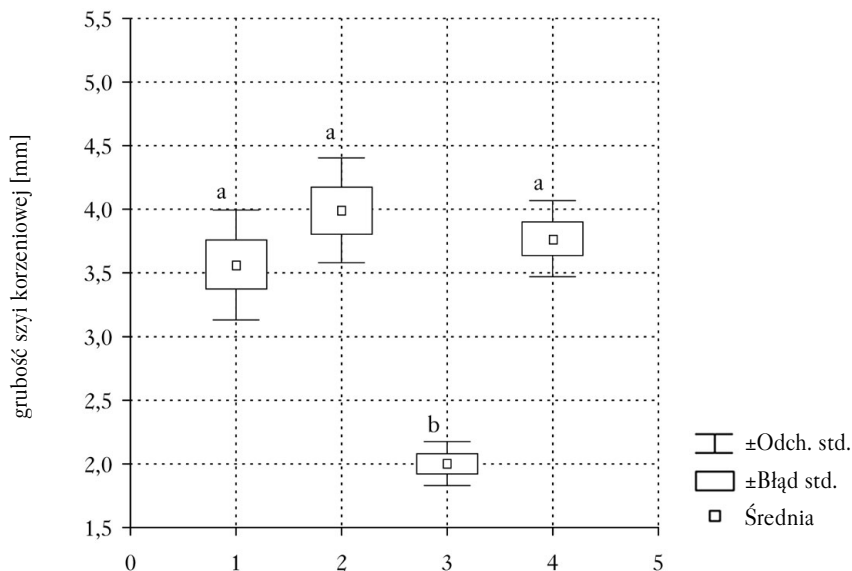
Mean number of mycorrhizas on pine seedlings 5 months after outplanting on the ex-farmland: 1 – *Thelephora terrestris* (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N. The same letters indicate lack of significant differences



Ryc. 3.

Wysokość pędu sadzonek sosny zwyczajnej rosnących na gruncie porolnym. Warianty: 1 – (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N

Stem height of Scots pine seedlings growing on ex-farmland. Variants: 1 – (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N



Ryc. 4.

Grubość szyi korzeniowej u sadzonek sosny Warianty: 1 – (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N

Root collar diameter of pine seedling. Variants: 1 – (Tt) +0,2 g N; 2 – 0,2 g N; 3 – Tt + 0,3 g N; 4 – 0,3 g N



Ryc. 5.

Mikoryzy siewek sosny zwyczajnej tworzone przez grzyb *Thelephora terrestris*

Mycorrhizas of Scots pine seedlings formed by *Thelephora terrestris*

Tabela 2.

Średnie wielkości fragmentu restrykcyjnego (pary zasad) wewnętrznej sekcji kodującej ITS w badanych morfotypach ektomikoryzowych

Average restriction fragment (base pair) sizes of the ITS external coding section in ectomycorrhizal morphotypes under analysis

Typ mikoryzy	ITS	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Tag</i> I
<i>Thelephora terrestris</i> – czysta kultura	680	315 240 103	360 225 60	295 270 65
<i>Thelephora</i> (I)	663	318 242 105	365 226 58	297 270 65
<i>Thelephora</i> (II)	718	228 208 134 115	245 236 155 67	295 224 108 98

stanowił 36% badanych próbek, natomiast *Thelephora* (II), czyli mikoryzy autochtoniczne powstałe z grzybni obecnej w glebie gruntu porolnego – 64%.

U sadzonek we wszystkich wariantach zabiegowych stwierdzono także obecność mikoryz typu *Hebeloma* i ektendomikoryz utworzonych w sposób samoistny z korzeniami wprowadzonej na grunt porolny sosny.

Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że zabieg mikoryzacji (inokulacji korzeni w warunkach laboratoryjnych) oraz specyficzna dawka nawożenia azotowego miały pozytywny wpływ na kształtowanie się mikoryz po wysadzeniu sosny na grunt porolny. Większy o 34% udział mikoryz u sadzonek przy mniejszym nawożeniu azotowym w okresie inokulacji i ponad dwukrotny w przypadku większej dawki nawożenia świadczy, że tak mikoryzowane sadzonki adaptują się do niekorzystnych warunków gleb uprzednio użytkowanych rolniczo i łatwiej są zasiedlane przez inne grzyby ektomikoryzowe – tu: typu *Hebeloma*, czy też grzyby ektendomikoryzowe. Jednakże grzyb *T. terrestris*, mimo dużej efektywności kolonizacyjnej korzeni, a przez to pozytywnego oddziaływania na roślinę pod względem zaopatrzenia jej w wodę, może równocześnie hamować wzrost roślin, zwłaszcza w początkowej fazie, podobnie jak *Laccaria laccata* [Thomson 1996], czy *Hebeloma crustuliniforme* [Stenström, Ek 1990]. W prezentowanych badaniach taki

efekt był wyraźnie widoczny w przypadku sadzonek mikoryzowanych przy większym poziomie nawożenia azotowego (ryc. 3, 4). Natomiast w przypadku sadzonek mikoryzowanych przy mniejszym nawożeniu różnice w parametrach wzrostu między sadzonkami mikoryzowanymi a niemikoryzowanymi były niewielkie.

Mniejsze przyrosty pędu i szyi korzeniowej u sadzonek w wieku juvenilnym wydają się w pełni uzasadnione, gdyż korzenie pozostające w symbiozie odprowadzają produkty fotosyntezy (węglowodany) do partnera grzybowego. Harley [1989] odnotował, że około 30% węglowodanów umiejscawia się w grzybni mikoryzowej. Tempo tego procesu zależy od gatunku grzyba i warunków ekologicznych (rodzaj podłoża, zawartość i rodzaj składników pokarmowych w glebie, czy przebieg pogody).

Prowadzone badania są wstępem do dalszych analiz, gdyż ocena korzyści wynikających ze sztucznej mikoryzacji możliwa jest dopiero po dłuższym niż jeden rok okresie obserwacji. Należy mieć przy tym na uwadze fakt, że większość mikoryz żyje zwykle około 4 miesięcy. Tammi i in. [2001] podają, że po tym okresie grzyby tworzące dana mikoryzę „wegetują” w stanie uśpionia i ponownie kolonizują korzenie – lub ustępują (częściowo, a niekiedy zupełnie) miejsce innym gatunkom grzybów. Głównym powodem zmian w strukturze mikoryz jest starzenie się i zamieranie populacji danego zbiorowiska grzybów. Korzenie krótkie, zasiedlane przez grzyby mikoryzowe przeważnie zamierają wraz z populacją grzyba lub utrzymują się w stanie niemikoryzowym [Danielson, Visser 1989], „oczekując” na nowy zestaw gatunków mikoryzowych zdolnych do kolonizacji następnej generacji korzeni krótkich.

Konkurencyjne zastępowanie jednego grzyba przez inny nie jest częstym procesem. Fox [1986] uważa, że tylko grzyby tzw. wczesnego stadium (do których należy także *T. terrestris*) kolonizacji korzeni młodych drzew są zdolne zasiedlać siewki wysadzone do gleby mineralnej. Podobnego spostrzeżenia dokonali Deacon i in. [1983], wysadzając siewki do gleby pobranej spod owocników grzybów reprezentujących różne stadia; tylko grzyby wczesnego stadium utworzyły symbiozy ektomikoryzowe.

Wybór grzyba *T. terrestris* do mikoryzacji sadzonek przeznaczonych do zalesień gruntów porolnych znajduje więc uzasadnienie, zwłaszcza, że wykonane przez Tammi i in. [2001] badania molekularne potwierdzają obecność mikoryz *T. terrestris* również w dorosłym drzewostanie sosnowym i świerkowym. Prawdopodobnie gatunek ten może utrzymywać się na korzeniach nawet kilkadziesiąt lat, podobnie jak grzyb *Rhizopogon* spp. [Borches, Perry 1990].

Wzorce restrykcyjne uzyskane z przebadanych mikoryz po okresie wegetacyjnym różniąc się nieco pod względem genetycznym (liczba par zasad) od wzorca uzyskanego dla czystej kultury *T. terrestris*, z której sporządzono szczepionkę mikoryzową, wskazują na wytworzenie mikoryz z grzybni autochtonicznej tego gatunku. Z kolei podobna liczba par zasad dla czystej kultury użytej do inokulacji siewek w laboratorium [Hilszczańska, Sierota 2006] oraz mikoryz *Thelephora* (I) wskazuje na utrzymywanie się tego szczepu grzybni w mikoryzach nawet w dwa lata od mikoryzacji. Pewne różnice we wzorcach restrykcyjnych wynikają nie tylko z polimorfizmu *T. terrestris*, typowego dla wielu grzybów, lecz także z naturalnej eliminacji przez grzyby autochtoniczne szczepów (izolatów) obcych w danym zbiorowisku. Przypomnieć należy, że zastosowana czysta kultura *T. terrestris* nie pochodziła z terenu, na który została wprowadzona w formie szczepionki mikoryzowej. Kären i in. [1997] wskazują, że najbezpieczniejszą metodą identyfikacji mikoryz jest porównywanie wzorów ich RFLP do wzorów RFLP uzyskanych z owocników, co jednak również nie zawsze daje dobre rezultaty. W takiej sytuacji najlepiej jest zwielokrotnić i sekwencjonować odcinek ML5/ML6, stanowiący region mitochondrialnej podjednostki rDNA, a następnie porównać z bazami danych [Horton, Bruns 2001]. Jednak ze względu na koszty i czas

jakiego wymagają takie analizy, tylko mała część ektomikoryz może zostać zidentyfikowana w ten sposób.

Cennym spostrzeżeniem wydaje się być potwierdzenie przeprowadzonej metodą tradycyjną klasyfikacji morfologicznej, która pełni nadal podstawową rolę w ilościowym opisie ektomikoryz, metodami genetycznymi, które wykazały dominującą obecność mikoryz *Thelephora* na korzeniach badanych sosen.

W kolejnych latach planowane jest dalsze sukcesywne badanie struktury mikoryz oraz kształtowania się relacji wzrostowych u mikoryzowanych i niemikoryzowanych w wieku juwenilnym sadzonek sosny wysadzonej na grunt porolny.

Wnioski

- ✦ Mikoryzowane siewki sosny wyhodowane w podłożu zawierającym 0,2 g azotu po wysadzeniu na gruncie porolnym charakteryzowały się większą przeżywalnością niż siewki niemikoryzowane oraz siewki mikoryzowane w podłożu zawierającym 0,3 g N.
- ✦ Liczebność mikoryz u mikoryzowanych sadzonek sosny (niezależnie od poziomu nawożenia) była istotnie większa niż u sadzonek uprzednio nie mikoryzowanych.
- ✦ Większą długością pędu charakteryzowały się sadzonki nie mikoryzowane przed wysadzeniem.
- ✦ Grzybnia *T. terrestris*, którą mikoryzowano siewki sosny wykazała dużą żywotność, mikoryzy z jej udziałem stwierdzono jeszcze po dwuletnim okresie od inokulacji.

Literatura

- Agerer R. 1987-1997. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn Verlag, Schwabisch-Gmünd.
- Borchers S. L., Perry D. A. 1990. Growth and ectomycorrhiza formation of Douglas-fir seedlings grown in soils collected at different distances from pioneering hardwoods in southwest Oregon clear-cuts. *Can. J. of For. Res.* 20: 717-721.
- Bowen G. D. 1994. The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. *Plant and Soil* 159: 61-67.
- Cairney J. W. G., Chambers S. M. 1999. Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile. Springer, Berlin, Heilderberg, New York.
- Colpaert J. V. 1999. *Thelephora*. In: Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile. [red.]. J. W.G Cairney, SM Chambers, Springer
- Danielson R. M., Visser S. 1989. Effects of forest soil acidification on ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal development. *New Phytol.* 112:41-47.
- Deacon J. W., Donaldson S. J., Last F. T. 1983. Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch. *Plant Soil* 71: 257-262.
- Dodd J. C., Thomson B. D. 1994. The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 159: 149-158.
- Dunabeitia M. K., Hormilla S., Garcia-Plazaola J. I., Txarterina K., Arteche U., Becerril J. M. 2003. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14: 11-18.
- Erland S., Jonsson T., Mahmood S., Finlay R. D. 1999. Below-ground ectomycorrhizal community structure in two *Picea abies* forests in Southern Sweden. *Scand. J. For. Res.* 14: 209-217.
- Fox F. M. 1986. Groupings of ectomycorrhizal fungi of birch and pine, based on establishment of mycorrhizas on seedlings from spores in unsterile soils. *Trans. of Brit. Mycol Soc.* 87: 371-380.
- Haselwandter K., Bowen G. D. 1996. Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. *For. Ecol. Manage* 81:1-17.
- Harley J. L. 1989. The significance of mycorrhiza. *Mycol. Res.* 92:129-139.
- Henrion B., Di Battista C., Bouchard D., Vairalles D., Thomson B. D., Le Tacon F. and Martin F. 1994. Monitoring the persistence of *Laccaria bicolor* as an ectomycorrhizal symbiont of nursery-grown Douglas fir by PCR of the rDNA intergenic spacer. *Mol. Ecol.* 3: 571-578.
- Hilszczańska D. 2000. Prezentacja metody szczepień mikoryzowych za pomocą zarodników. *Postępy techniki w leśnictwie*, nr 76: 39-43.
- Hilszczańska D., Sierota Z. 2006. Wpływ inokulum mikoryzowego grzyba na wzrost sadzonek sosny *Pinus sylvestris* L. I. Badania laboratoryjne. *Sylwan* (w druku).

- Horton T. R., Bruns T. D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol. Ecol.* 10: 1855-1877.
- Ingleby K., Mason P. A., Last F. T., Fleming L. V. 1990. Identification of ectomycorrhizas. ITE research publication no.5. Institute of Terrestrial Ecology. London:HMSO.
- Kåren O., Hogberg N., Dahlberg A., Jonsson L., Nylund J. E. 1997. Inter- and intraspecific variation in the ITS-region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected endonuclease analysis. *New Phytol.* 142: 577-585.
- Kowalski S. 1997. Praktyczne aspekty mikrotrofizmu w szkółkach leśnych. *Sylvan* 6: 5-15.
- Mullins J., Bruckner E., Evans R., Moditz P. 1989. Extending loblolly and Virginia pine planting seasons on strip mine spoils in east Tennessee. *Tenn. Farm. Home Sci.* 151: 24-27.
- Parlade J., Alvarez I. F., Pera J. 1996a. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza* 6: 51-55.
- Parlade J., Alvarez I. F., Pera J. 1996b. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 237-245.
- Stenström E., Ek M. 1990. Field growth of *Pinus sylvestris* following nursery inoculation with mycorrhizal fungi. *Can. J. of For. Res.* 20: 914-918.
- Tammi H., Timonen S., Sen R. 2001. Spatiotemporal colonization of Scots pine roots by introduced and indigenous ectomycorrhizal fungi in forest humus and nursery Sphagnum peat microcosm. *Can. J. of For. Res.* 31 (20): 746-756.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. & White T., J. [red.]. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Amplifications.* Academic Press. 315-322.

SUMMARY

The role of *Thelephora terrestris* fungus in mycorrhization on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings.

II. Field study

The study were conducted in post-agricultural land. Scots pine seedlings grew under two regimes of N fertilization [see: Hilszczańska, Sierota 2006], and were inoculated with *Thelephora terrestris* fungus. One month after out-planting lower vitality of seedlings was in non-inoculated treatment with low level of fertilization. After 6 months of growth, mycorrhizal abundance and increment of stem and root collar diameter were studied. Higher number of mycorrhizas possessed seedlings from inoculated treatments, irrespective of N fertilization level. Mycorrhizas identified as *Thelephora* dominated on root systems and belong to two different isolates of *Thelephora*. Adverse results were with regards to growth parameters, which were lower in inoculated treatments.