

Jolanta Behnke-Borowczyk, Justyna Cichoń, Daria Wołowska, Maciej Hałuszczak,
Marlena Baranowska-Wasilewska

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, e-mail: jbehnke@up.poznan.pl

**ZASTOSOWANIE METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ
DO IDENTYFIKACJI GRZYBÓW ZASIEDLAJĄCYCH
MARTWE DREWNO SOSNY ZWYCZAJNEJ
(*PINUS SYLVESTRIS* L.)**

*APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGY METHODS
TO IDENTIFY FUNGI INHABITING DEAD WOOD OF SCOTS
PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.)*

Słowa kluczowe: bioróżnorodność, zbiorowiska grzybowe, martwe drewno

Key words: biodiversity, fungi communities, dead wood

Abstract. The aim of this study was to evaluate the biodiversity of fungi, found in the dead wood of pine. The material for the study was divided into three individual stages of wood decomposition. The analysed wood samples were obtained from two areas in managed forest and protected area. Fungal communities were selected using a molecular method, which based on polymerase chain reaction (PCR), cloned and sequenced by Sangar. The results have shown that the species composition of fungi communities was varied, depending on the stage of wood decomposition. The most numerous was phylum Ascomycota.

WSTĘP

Drzewa i drewno są siedliskiem życia wielu organizmów żywych. Martwe drewno stanowi istotny element niezbędny dla istnienia ponad 1500 gatunków grzybów, 1300 gatunków owadów i około 100 gatunków zwierząt kręgowych [Bobieci in. 2005]. Prawie 90% gatunków grzybów występuje wyłącznie w lasach (lub także w lasach). Około 40% gatunków grzybów rozkłada drewno na różnych etapach jego biodeterioracji [Grzywacz 2008]. Istnieje przekonanie, że martwe drewno daje życie licznym organizmom tak długo, ile miało lat za życia, 100-letnia sosna – 100 lat, 200-letni dąb – 200 lat itd. [Grzywacz 2014]. Organizmy należące do królestwa grzybów są nieodłącznym ogniwem w procesach dekompozycji martwej materii organicznej [Bartnik 2007]. Niektóre gatunki grzybów odpowiadają za inicjację procesu dekompozycji drewna. Po nich pojawiają się kolejne gatunki, które wnikają w mocno rozłożone drewno [Łakomy

i in. 2011]. Zbiorowisko grzybowe to pewna grupa grzybów występujących razem w określonej przestrzeni i czasie, jego skład gatunkowy nie jest stały, zmienia się wraz z upływem czasu i przechodzeniem drewna w kolejne stopnie rozkładu. Skład gatunkowy zbiorowisk grzybów może w dużej mierze zależeć od kolejności zasiedlania danych siedlisk [Ottosson i in. 2013]. Obecność bogatych w gatunki zbiorowisk grzybów na martwym leżącym drewnie jest niezbędna dla niezakłóconego krążenia materii w lesie. W odpowiednich warunkach ponad 20% grzybów mikoryzowych, niezbędnych dla prawidłowego rozwoju drzew, kolonizuje martwe pnie [Franklini in. 1981]. Zagadnienie roli martwego drewna w polskich lasach do niedawna nie stanowiło priorytetowego zadania badawczego [Solon 2002]. Aktualnie obowiązująca Instrukcja Ochrony Lasu [2011] zobowiązuje gospodarzy lasu do pozostawienia określonej ilości martwego drewna w lesie. Ponadto w gospodarce leśnej kładzie się coraz większy nacisk na ochronę organizmów saproksylicznych (w tym grzybów), co podkreślają zobowiązania podjęte przez Polskę (Konwencja Berneńska, Dyrektywa habitatowa) i co odgrywa ważną rolę w zasadach certyfikacji [Czerepko i in. 2014]. Zamiarom pozostawiania martwego drewna w lasach gospodarczych powinny towarzyszyć wskazówki co do jego ilości oparte na badaniach naukowych. Zalecenia takie precyzowane są rzadko i oparte są zazwyczaj na trosce o los pojedynczych gatunków ptaków lub owadów. Badania naukowe z zakresu mykologii wykonywane są sporadycznie i lokalnie [Kwaśna i in. 2016a]. Aktualnie problem martwego drewna i grzybów, jakie je zasiedlają, był poruszany między innymi przez Łakomego i in. [2011], Czerepko i in. [2014], Kwaśną i in. [2017], Kwaśną i in. [2016a,b], Pusza i in. [2017]. Natomiast na świecie temat martwego drewna i grzybów, które je zasiedlają był poruszany in. przez Jönsson i in. [2008], Nordén i in. [2013], Ottosson [2013], Rajala i in. [2010, 2015], Valentín i in. [2015]. W celu określania składu gatunkowego grzybów w środowisku naturalnym wykorzystuje się metody klasyczne oraz metody techniki biologii molekularnej. Dotychczasowe badania zbiorowisk grzybów oparte na morfotypowaniu pomijały mikrogrzyby, które również pełnią znaczącą rolę w rozkładzie drewna. Podstawową metodą biologii molekularnej jest łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction- PCR). Jednak coraz częściej wykorzystuje się sekwencjonowanie nowej (następnej) generacji (NGS), które pozwala na prowadzenie równocześnie wielu sekwencjonowań, co skutkuje znacznym przyspieszeniem procesu analizy [Behnke-Borowczyk i in. 2012]. Najnowsze wyniki badań dotyczące identyfikacji zbiorowisk grzybowych występujących na martwym drewnie opierają się właśnie na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS) [Horisawa i in. 2017, Vazi in. 2017].

Biorąc pod uwagę istotę powyższego zagadnienia, celem naszej pracy było podjęcie próby określenia gatunkowego składu zbiorowisk grzybów rozkładających drewno sosny zwyczajnej, przy uwzględnieniu różnic w trzech stopniach rozkładu drewna oraz poznanie zbiorowisk grzybów w drzewostanie gospodarczym rezerwacie wykorzystując metody molekularne. Przyjęto, że zbiorowisko grzybów w martwym drewnie sosny zwyczajnej będzie różne

w każdym badanym stopniu rozkładu drewna, ze względu na różne preferencje pokarmowe występujących na nim grzybów (i). Zbiorowisko grzybów w martwym drewnie sosny zwyczajnej pochodzącym z rezerwatu będzie bardziej zróżnicowane niż w martwym drewnie pochodzącym z drzewostanu gospodarczego (ii). W zbiorowisku grzybowym martwego drewna sosny zwyczajnej będą dominowały gatunki saproksylistyczne (iii). Biorąc pod uwagę konieczność pozostawiania martwego drewna w lasach, realizacja powyższych celów przyczyni się do wypracowania skuteczniejszych zasad gospodarowania. Pozwoli na uzyskanie kompromisu między potrzebami gospodarki leśnej i ochrony przyrody oraz wpłynie na decyzje związane z określeniem ilości pozostawianego martwego drewna w lasach gospodarczych.

MATERIAŁY I METODY

Analizowane próby pochodziły z dwóch powierzchni w Nadleśnictwie Torzym (52°31'N, 15°08'E). Próby martwego drewna pobrano z 87-letnich drzewostanów sosny zwyczajnej. Próby pobrano w październiku 2014 roku z drzewostanu gospodarczego (P3; dziewięć prób z pniaków, cztery próby z kłód i trzy z gałęzi) i z rezerwatu przyrody Dolina Ilanki (P4; cztery próby z pniaków, dziesięć prób z kłód i cztery z gałęzi). Próby drewna pobrano metodą tradycyjną (za pomocą uprzednio sterylizowanych wiertel wkrętarki akumulatorowej), mechanicznie oddzielając fragmenty drewna. Określono stopień rozkładu drewna pobranych prób według Huntera [1990]. Drewno w pierwszym stopniu rozkładu nie wykazywało zmiany struktury, jego barwa była naturalna (1-3 lat od zamarcia). W drugim stopniu rozkładu barwa drewna była jaśniejsza, drewno było bardziej miękkie i mniej trwałe (30% drewna z objawami rozkładu, 5-20 lat od zamarcia). Struktura drewna w trzecim stopniu rozkładu wykazywała znaczny rozkład, a jego barwa przyjmowała odcień od brązowego do ciemnobrunatnego (ponad 30% drewna z objawami rozkładu, całkowite wykruszenie kory, 20-30 lat od zamarcia). Pobrane próby transportowano w papierowych torbach, a następnie przechowywano je w chłodni.

Pobrane próby zmielono w młynku kriogenicznym SPEX™ Sample Prep™ Freezer/Mill™ w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku. Do izolacji DNA z prób wykorzystano zestaw Plant Genomic DNA Purification (Thermo Scientific) według instrukcji producenta. Amplifikację regionu ITS 1/2 r DNA przeprowadzono z wykorzystaniem starterów specyficznych dla grzybów: ITS1-F (5' CTTGGT CAT TTA GAG GAA GTAA 3') [Gardes, Bruns 1993] oraz ITS4 (5' TCC TCCGCT TAT TGA TAT GC 3') [White i in. 1990]. Każda z mieszanin reakcyjnych PCR (25 µl) była złożona z: 12,5 µl PCR Mix (A&A Biotechnology, Gdynia), 0,2 µl każdego ze starterów, 1,5 µl oczyszczonego oraz rozcieńczonego DNA środowiskowego oraz 10,6 µl wody. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze Biometr (Gradient). Warunki reakcji obejmowały: denaturację wstępną w 94°C trwającą 10 min., następnie 35 cykli obejmujących denaturację,

annealing i elongację: 94°C trwającą 30 s, 42°C przez 1min., 72°C przez 2 min. (odpowiednio). Końcowa elongacja odbywała się w 72°C przez 10 min. W 1% żelu agarozowym barwionym przez Midori Green Advance DNA (Genetics) dokonano wizualizacji powstałego produktu amplifikacji. Produkty PCR oczyszczono stosując GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Próby klonowano, używając pGEM-T Easy. Wyrosłe kolonie poddano wstępnej selekcji na pożywce X-gal. Białe kolonie przeniesiono do 150 µl 10 mM Tris o pH 8,0 i gotowano przez 10 min. w temperaturze 100°C, po czym odwirowano. Przeprowadzono ponownie PCR (warunki jak wyżej). Długość otrzymanego produktu wynosiła 450-650 par zasad (pz). Następnie przeprowadzono drugą selekcję z wykorzystaniem metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Użyto dwóch enzymów reakcyjnych: *HhaI* oraz *BsuRI* [Behnke-Borowczyk, Kwaśna 2016]. Trawienie przebiegało w temp. 37°C przez 12 godzin. Efekt trawienia zwizualizowano w 3% żelu agarozowym (2% agarozy reakcyjnej oraz 1% agarozy klasycznej) zabarwionym barwionym Midori Green Advance DNA (Genetics). Dla każdej biblioteki wzorzec trawienia został porównany z markerami wielkości (GeneRuler 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific). W analizie nie brano pod uwagę prążków o długościach mniejszych niż 80 pz, gdyż mogą one reprezentować dimery starterów. Klony o takich samych wzorach trawienia dwoma enzymami zaliczono jako jedną operacyjną jednostkę taksonomiczną – OTU (ang. operational taxonomic unit). Założono, że klony które wchodziły w skład jednego OTU w indywidualnej bibliotece symbolizują ten sam takson. Reprezentowane klony poddano oczyszczeniu i sekwencjonowaniu przy pomocy metody Sangera w Centrum Badań DNA (Poznań). Otrzymane sekwencje zmodyfikowano przez obcięcie końców, które zawierały błędy. Przy użyciu algorytmu BLAST dokonano porównania sekwencji z sekwencjami referencyjnymi z bazy danych NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Identyfikację sekwencji wykonano do rangi najniższej możliwej taksonu.

WYNIKI

W analizowanych próbach potwierdzono obecność grzybów z gromad: Basidiomycota i Ascomycota. Gromadę Ascomycota reprezentowały grzyby rzędów: Helotiales, Saccharomycetales, Chaetothyriales, Rhytismatales, Saccharomycetales. Natomiast gromadę Basidiomycota: Agaricales, Boletales, Russulales, Dacrymycetales, Tremellales oraz Trechisporales. W zbiorowisku nie stwierdzono obecności Zygomycota.

W pierwszym stopniu rozkładu zidentyfikowano 5 taksonów grzybów należących do gromady Ascomycota i 3 taksony grzybów z gromady Basidiomycota. W drugim stopniu rozkładu zidentyfikowano 6 taksonów grzybów z gromady Ascomycota, jeden takson grzyba z gromady Basidiomycota i grzyb niehodowalny oraz 24 grzyby z brakiem sekwencji w bazie danych. W trzecim stopniu rozkładu zidentyfikowano po cztery taksony i grzybów należących zarówno do gromady Ascomycota, jak i Basidiomycota.

Tab. 1. Procentowy udział taksonów grzybowych w zbiorowisku, (których udział przekraczał 1%).

Takson	P3		P4		
	I stopień rozkładu (36)*	II stopień rozkładu (24)*	I stopień rozkładu (28)*	II stopień rozkładu (47)*	III stopień rozkładu (92)*
Gromada Ascomycota					
Ascomycota sp.	55,6		21,4	8,52	
Ascomycota sp. (ze ściółki)	8,4			2,13	
Cadophora sp.			42,81		
Leotiomyces sp.		1			
<i>Candida nitratophila</i> (Shifrine & Phaff) S.A. Mey. & Yarrow 1978	5,6				
<i>Hyaloscypha aureliella</i> (Nyl.) Huhtinen 1990		2			
<i>Pseudeurotium bakeri</i> C. Booth 1961					2,2
<i>Rhinocladiella atrovirens</i> Nannf. 1934	2,8		17,9		
Rhytismataceae sp.		1		4,26	
<i>Scheffersomyces ergatensis</i> (Santa Maria) H. Urbina & M. Blackw. 2013					26,9
Sordariomyces sp.					3,3
<i>Sugiyamaella paludigena</i> (Golubev & Blagod.) H. Urbina & M. Blackw. 2013					32,5
<i>Xenopolyscytalum pinea</i> Crous 2010			7,2		
Gromada Basidiomycota					
<i>Armillaria ostoyae</i> (Romagn.) Herink 1973	5,6				
<i>Cerinomyces canadensis</i> (H.S. Jacks. & G.W. Martin) G.W. Martin 1949	19,5				21,6
<i>Peniophora pini</i> (Schleich.) Boidin 1956			3,6		
<i>Rhodotorula</i> sp.					1,1
<i>Serpula himantioides</i> (Fr.) P. Karst. 1884	2,8			73,11	
<i>Tremella giraffa</i> Chee J. Chen 1998					1,1
Trechisporales sp.					3,2
Niehodowlany grzyb				10,65	
Brak sekwencji w bazie danych NCBI		1			

*liczba klonów w próbie

Źródło: Opracowanie własne.

W drzewostanie gospodarczym (P3) w pierwszym stopniu rozkładu zidentyfikowano grzyby należące do gromady Ascomycota sp. i Ascomycota ze ściółki, *Candidanitratothila*, *Cerinomyces canadensis*, *Rhinochloidiella atrovirens* oraz *Armillaria ostoyae*, *Serpulohimantioides*. Natomiast w rezerwacie (P4) w pierwszym stopniu rozkładu drewna wykryto następujące taksony grzybów: Ascomycota sp., *Cadophora* sp., *R. atrovirens* i *Xenopolyscytalum pinea* (tab. 1). Taksonami wspólnymi dla pierwszego stopnia rozkładu drewna w drzewostanie gospodarczym i rezerwacie były grzyby należące do Ascomycota sp. oraz *R. atrovirens* (tab. 1).

W drugim stopniu rozkładu w drzewostanie gospodarczym zidentyfikowano: *Hyaloscypha aureliella*, *Leotiomyces* sp., *Rhytismataceae* sp. Ascomycota sp., Ascomycota sp. (ze ściółki) oraz *Rhytismataceae* sp. W tym przypadku stwierdzono także sekwencje, dla których nie odnaleziono sekwencji referencyjnych w bazie danych NCBI. Natomiast w drugim stopniu rozkładu drewna sosnowego z rezerwatu wyróżniono obecność grzybów należących do Ascomycota sp. i Ascomycota ze ściółki, *Rhytismataceae* sp., *Serpula himantioides* i niehodowlalne grzyby. Taksonem wspólnym dla drugiego stopnia rozkładu drewna sosn z drzewostanu gospodarczego i rezerwatu był *Rhytismataceae* sp. (tab. 1).

W trzecim stopniu rozkładu drewna, którego próby pochodziły tylko z rezerwatu zidentyfikowano *C. canadensis* (*Pseudeurotium bakeri*), *Rhodotorula* sp., *Scheffersomyces ergatensis*, *Sordariomyces* sp., *Sugiyamaella paludigena*, *Tremella giraffa*, *Trechisporales* sp.

Taksonami, które stwierdzono zarówno w zbiorowisku grzybów obejmujących drewno sosn zwyczajnych z drzewostanu gospodarczego jak i rezerwatu były: Ascomycota sp., Ascomycota sp. ze ściółki, *C. canadensis*, *R. atrovirens*, *Rhytismataceae* sp. oraz *S. himantioides*.

DYSKUSJA

Przesłanką do pozostawiania martwego drewna w lesie jest potrzeba zadbania o siedlisko życia dla określonych gatunków. Właściwe gospodarowanie martwą materią organiczną w lesie jest jednym z zadań współczesnego wielofunkcyjnego leśnictwa. Stąd też podejmowane są badania naukowe, które wskazują na potrzebę pozostawiania martwego drewna, które stanowiłoby siedlisko życia grzybów [Kwaśna i in. 2016a; 2017]. Martwe drewno jest ważnym elementem ekosystemu stwarzającym warunki rozwoju wielu mikroorganizmów. Warunkuje ono prawidłowe odnowienie lasu, szczególnie na siedliskach hydrogenicznych i górskich [Zielonka 2006].

Drewno sosny posiada 4 klasę naturalnej odporności na grzyby (norma DIN EN 350–2). Grzyby powodują ubytek jego masy [Krajewski, Witomski 2005; Fukasawa i in. 2011]. Basidiomycota rozkładają drewno bardziej intensywnie niż Ascomycota i Zygomycota. Ubytek masy zależy od stopnia rozkładu drewna i wilgotnościowych preferencji grzybów występujących w sukcesji [Kwaśna

i in., 2016a]. Zbiorowisko grzybów w martwym drewnie sosny zwyczajnej było różne w każdym badanym stopniu rozkładu drewna. Wykorzystując metody molekularne do analizy zbiorowiska grzybowego w drewnie sosen zwyczajnych w różnych stopniach rozkładu drewna wykryto 29 taksonów grzybów. W drewnie z rezerwatu największą różnorodnością gatunkową cechował się pierwszy stopień rozkładu drewna, natomiast na powierzchni użytkowanej gospodarczo, drugi stopień rozkładu drewna. W przypadku zastosowania metody klasycznej zaobserwowano odwrotną zależność [Kwaśna i in. 2016a]. Podobnie jak Kwaśna i in. [2016a,b] stwierdziliśmy liczną grupę grzybów należących do gromady Ascomycota w początkowych stadiach rozkładu drewna. Z drewna sosny zwyczajnej i innych iglastych wyizolowano najwięcej taksonów należących do Ascomycota, potwierdzają to inne wyniki badań nad grzybami endofitycznymi [Giordano i in. 2009; Menkis i in. 2006]. W pierwszym stopniu rozkładu drewna pochodzącego z obu badanych powierzchni stwierdzono występowanie 9 taksonów grzybów, z czego tylko trzy taksony były taksonami wspólnymi dla martwego drewna sosny na obu powierzchniach. W rezerwacie stwierdzono występowanie tylko pięciu taksonów grzybów, z czego w zbiorowisku dominował rodzaj *Cadophora*, a następnie *Ascomycota* sp., a w lesie gospodarczym *Ascomycota* sp. W drugim stopniu rozkładu drewna stwierdzono występowanie 15 taksonów grzybów. W zbiorowisku grzybów w lesie gospodarczym nie stwierdzono występowania taksonów dominujących, natomiast w rezerwacie w zbiorowisku dominował *Serpula himantoides*. Z badań Kwaśnej i in. [2016b] wynika, że grzyby z gromady Basidiomycota w każdym stadium rozkładu występowały rzadziej niż Ascomycota, czego nie potwierdzają nasze wyniki badań. W martwym drewnie *Quercus robur* L., które uległo najszybszemu rozkładowi w badaniach prowadzonych przez van der Wali i in. [2015] w 95% zbiorowisko grzybów składało się z taksonów należących do Ascomycota. Przyjmuje się, że Basidiomycota mają większą różnorodność enzymów niż Ascomycota i powodują szybszy rozkład drewna niż workowce [Osono 2003]. Jednak wyniki van der Wal i in. [2015] wskazują, że Ascomycota mogą szybciej rozkładać drewno dębu niż Basidiomycota. Na istotne znaczenia grzybów z gromady Ascomycota w naturalnym rozkładzie drewna wskazuje Boddy i in. [1989]. Istnieje prawdopodobieństwo, że grzyby z gromady Ascomycota zastąpiły podstawczaki, które szybciej rozłożyły drewno. Zdolność i tempo rozkładu drewna przez workowce powinno być kontynuowane w kontrolowanych warunkach [van der Wali i in. 2015].

Zbiorowisko grzybów w martwym drewnie sosny zwyczajnej pochodzącym z rezerwatu było bardziej zróżnicowane niż w martwym drewnie pochodzącym z drzewostanu gospodarczego. W drewnie sosen z rezerwatu liczba gatunków grzybów w zbiorowisku wzrastała wraz z rosnącym stopniem rozkładu, a w drzewostanie gospodarczym malała, co odbiega od wyników otrzymanych przez Kwaśną i in. [2016b], gdzie liczba taksonów początkowo wzrastała, a następnie malała. W trzecim stopniu rozkładu drewna z drzewostanu

gospodarczego nie powiodła się próba amplifikacji produktu PCR. Może wynikać to z braku DNA grzybowego komplementarnego dla wykorzystanych starterów albo postępującej sukcesji i wycofywania się grzybów z rozłożonego już przez nie materiału, a także o mniejszej bioróżnorodności martwego drewna pochodzącego z drzewostanu gospodarczego.

Obecnie pojęcie organizmów saproksylistycznych stosowane jest także dla grzybów uczestniczących w dekompozycji martwego drewna i obiegu materii organicznej w przyrodzie [Persiani i in. 2010, Stokland i in. 2012]. W zbiorowisku grzybowym martwego drewna sosny zwyczajnej dominowały gatunki saproksylistyczne. Wyniki powyższych badań wskazały najwyższą frekwencję grzybów gromady Ascomycota w pierwszym stopniu rozkładu drewna. Grzyby z tej gromady powodują szarą zgniliznę drewna, przy czym rozkład drewna w tym przypadku jest procesem długotrwałym [Eaton Hale 1993], a grzyby te uznawane są za kolonizatorów wtórnych i pojawiają się w ostatnich fazach rozkładu drewna [Fukasawa i in. 2011]. Jednak otrzymane wyniki badań nie potwierdzają tego założenia. W pierwszym stopniu rozkładu drewna z rezerwatu wykryto grzyby rodzaju *Cadophora*, zaliczane do saprotrofów i pasożytów słabości. Potwierdzono ich występowanie w drewnie sosny drugiego i pierwszego stopnia rozkładu [Kwaśna i in. 2016a,b]. W drugim stopniu rozkładu drewna w drzewostanie gospodarczym stwierdzono występowanie *Hyaloscypha aureliella*, który zasiedla iglaste drewno użytkowe i leżaninę [Huhtinen 1993]. W trzecim stopniu rozkładu stwierdzono występowanie grzybów rodzaju *Rhodotorula*, co świadczy o zaawansowanym procesie rozkładu drewna. W próbach drewna sosny zwyczajnej pobranych z obu powierzchni stwierdzono występowanie saprotrofa *Serpula himantioides*, który powoduje zgniliznę brunatną drewna [Łakomy, Kwaśna 2008]. W drewnie z rezerwatu występował licznie w drugim stopniu rozkładu (ponad 70% frekwencji), natomiast w drewnie z drzewostanu gospodarczego stwierdzono jego nieliczne występowanie w pierwszym stopniu rozkładu drewna. *Serpula himantioides* zdominował zbiorowisko grzybów w drugim stopniu rozkładu drewna, jednak nie wykryto go w pierwszym i trzecim stopniu rozkładu. W trzecim stopniu rozkładu drewna wykryto *Tremella giraffa* oraz grzyby rzędu Trechisporales. W pierwszym stopniu rozkładu drewna z drzewostanu gospodarczego i rezerwatu zidentyfikowano grzyba *Rhinocladiella atrovirens*, który był izolowany z drewna sosen zwyczajnych, które zamierały lub zamarły [Franceschini i in. 2000, Menkis i in. 2006]. Kwaśna i in. [2006a] zidentyfikowali ten gatunek w drewnie sosen, które przelegiwało co najmniej rok od ścięcia. Wykazano także obecność *R. atrovirens* w drewnie sosen w trzech pierwszych stopniach rozkładu drewna [Kwaśna i in. 2016b]. *Peniophora pini* został wykryty w pierwszym stopniu rozkładu drewna sosny z rezerwatu. Występowanie tego grzyba w pierwszym stopniu rozkładu drewna sosny zostało potwierdzone w Nadleśnictwie Torzym [Kwaśna i in. 2016b] oraz w starych gałęziach i konarach w Nadleśnictwie Jedwabno [Kwaśna i in. 2016a].

Oprócz grzybów saproksylistycznych w martwym drewnie sosny zwyczajnej stwierdzono także występowanie patogenów. Może to stanowić pewien problem w lasach gospodarczych, w których należy pozostawiać martwe drewno. Na przykład leżące gałęzie sosnowe mogą być zagrożeniem przy szkółkach leśnych jako miejsce namnażania się grzybów odpowiedzialnych za wiosenną osutkę sosny (Instrukcja ochrony lasu 2011 – cz. III.B.6.1.1.1) bądź zamieranie pędów sosny (Instrukcja ochrony lasu 2011 – cz. III.B.6.1.1.4) [Referowska-Chodak 2014]. W pierwszym stopniu rozkładu drewna z drzewostanu gospodarczego stwierdzono występowanie *Armillaria ostoyae*, którą zidentyfikowali również Kwaśna [2016b] w drewnie martwych sosen w pierwszym stopniu rozkładu drewna. Patogen ten ma największe znaczenie gospodarcze spośród wszystkich opieńek występujących w lasach na terenie naszego kraju [Żółciak 2003]. W drugim stopniu rozkładu wykryto grzyby należące do klasy Leotiomycetes, do której należy wiele groźnych patogenów. Kwaśna i in. [2016b] zidentyfikowali grzyby należące do tej klasy w drewnie sosny, wyróżniając gatunki: *Cenangium ferruginosum* *Botrytis cinerea*, *Cadophora gregata*, *C. melinii*, *Phialocephala botulispora*, *P. dimorphospora* *Therrya fuckelii*. W drugim stopniu rozkładu drewna na obu powierzchniach badawczych stwierdzono obecność grzybów należących do rodzaju Rhytismataceae, który należy również do klasy Leotiomycetes.

Aby wskazać nie tylko ilościowy, ale i jakościowy udział poszczególnych gatunków grzybów w danym zbiorowisku należałoby wykorzystać dodatkowe metody ich identyfikacji. Do określenia pełnego spektrum zbiorowisk grzybów z prób środowiskowych należy zastosować kilka metod identyfikacji. Wyniki otrzymane metodą molekularną nie wykluczają błędów. Wyniki sekwencjonowania bazują głównie na podobieństwach sekwencji poddawanych badaniu do założonej wcześniej sekwencji referencyjnej. Błędy mogą być powodem wcześniejszej, źle przeprowadzonej identyfikacji [Bridge i in. 2003]. Duża liczba sekwencji, szczególnie bakteryjnych, opisana jest jako organizmy niehodowalne [Kwaśna i in. 2008], co potwierdza fakt, iż 10,65% grzybów w zbiorowisku drugiego stopnia rozkładu drewna w rezerwacie zidentyfikowaliśmy jako grzyb niehodowalny, natomiast 1% w tym samym stopniu rozkładu drewna sosen z drzewostanu gospodarczego brakowało sekwencji w bazie danych NCBI.

PODSUMOWANIE

Analizując otrzymane wyniki, stwierdzono różne pod względem gatunkowym zbiorowiska grzybów występujące na drewnie o różnym stopniu rozkładu. W poszczególnych stopniach rozkładu drewna stwierdzono zbiorowiska grzybowe o różnym składzie gatunkowym. Największe zróżnicowanie zaobserwowano w pierwszym i drugim stopniu rozkładu drewna. Pozostawianie martwego drewna w drzewostanie przyczynia się do zwiększenia bioróżnorodności grzybów w środowisku leśnym. Martwe drewno w każdym stopniu rozkładu jest środowiskiem życia dla grzybów, w tym także dla patogenów. W efekcie martwe

drewno sprzyja bioróżnorodności, ale zarazem może stanowić zagrożenie dla drzewostanu. W przypadku wystąpienia warunków sprzyjających dla wystąpienia choroby może ono stanowić źródło infekcji. Potwierdzono skuteczność zastosowania metod molekularnych do identyfikacji składu jakościowego zbiorowiska grzybów występujących na martwym drewnie oraz do określania różnicowania gatunkowego grzybów. Wyniki powyższych badań wskazują na konieczność podjęcia dalszych badań dotyczących zbiorowisk grzybowych zasiedlających martwe drewno oraz na potrzebę podejmowania działań związanych z inwentaryzacją martwego drewna pozostawianego w lesie.

LITERATURA

- Bartnik C. 2007: Saprotrofy – rola w ekosystemie leśnym oraz możliwość ich wykorzystania w gospodarce leśnej, *Studia i Materiały CEPL, Zeszyt 2/3(16)*, 530-540.
- Behnke-Borowczyk J., Kwaśna H., Bełka M. 2012: Metody molekularne stosowane w badaniu różnorodności mikroorganizmów glebowych, *Sylvan*, 156(4), 294-304.
- Behnke-Borowczyk J., Kwaśna H. 2016: Use of ITS1/2 rDNA and 18S rDNA in studies of the forest soil mycobiota, *Sylvan*, 160(7), 564-572.
- Bobiec A., Gutowski J.M., Zub K., Pawlaczyk P., Laudenslayer W.F. 2005: *The afterlife of a tree*, Warszawa, Poland, WWF.
- Boddy, L., Owens E.M., Chapela I.H. 1989: Small-scale variation in decay rate within logs one year after felling: effect of fungal community structure and moisture content, *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 173-184.
- Bridge P.D., Roberts P.J., Spooner B.M., Panchal G. 2003: On the unreliability of published DNA sequences, *New Phytologist*, 160, 43-48.
- Czerepko J., Hilszczański J., Jabłoński M. 2014: Martwe drewno – żywy problem, *Studia i Materiały CEPL*, 16(41), 36-45.
- Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993: *Wood: decay, pests and protection*, Chapman & Hall, 1-519.
- Franceschini A., Corda P., Marras F. 2000: Fungi involved in oak decline. In: *Decline of Oak Species in Italy, Problems and Perspectives*, 101-113.
- Franklin J.F., Cromack Jr. K., Denison W., McKee A., Maser C., Sedell J., Swanson F., Juday G. 1981: Ecological characteristics of old-growth Douglas-fir forests, *USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PNW-118*, Pac. Northwest For. and Range Exp. Stn., Portland, Oreg, 48.
- Fukasawa Y., Osono T., Takeda H. 2011: Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood, *Mycologia*, 103(3), 474-482.
- Gardes M., Bruns T.D. 1993: ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Molecular Ecology*, 2: 113-118.
- Giordano L., Gonthier P., Varese G.C., Miserere L., Nicolotti G. 2009: Mycobiota inhabiting sapwood of health and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps, *Fungal Diversity*, 38: 69-83.
- Grzywacz A. 2008: Różnorodność biologiczna grzybów w lasach, *Zasoby przyrodnicze polskich lasów*. Cedzyna k. Kielc, Wydawnictwo PTL.
- Grzywacz A. 2014: Drewno dominującym składnikiem biomasy ekosystemów leśnych, *Studia i Materiały CEPL*, 16(41), 30-35.
- Haze M. (red.) 2012: *Instrukcja Ochrony Lasu. Tom I. Załącznik do Zarządzenia nr 57 Dyrektora Generalnego Lasów Państwowych z dnia 22 listopada 2011 r.* Warszawa. CILP.
- Horisawa S., Yoshida M., Umezawa K., Wada T., Abe H., Doi S., Samejima M., Momohara I. 2017: Diversity and community structure of wood-inhabiting fungi found in Japanese wooden houses analyzed by the next-generation sequencing, *J Wood Sci.*, 63, 369-378.
- Huhtinen, S. 1993: Some hyaloscyphaceous fungi from tundra and taiga, *Sydowia*, 45(2), 188-198.

- Hunter M.L.Jr. 1990: *Wildlife, Forests and Forestry: Principles of Managing Forests for Biological Diversity*, New Jersey. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Jönsson M.T., Edman, M., Jonsson, B.G. 2008: Colonization and extinction patterns of wood-decaying fungi in a boreal old-growth *Picea abies* forest, *Journal of Ecology*, Volume 96(5), 1065-1075.
- Krajewski A., Witomski P. 2005: *Ochrona drewna surowca i materiału*, Warszawa, 12-110.
- Kwaśna H., Bateman G.L., Ward E. 2008: Determining species diversity of microfungal communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing, *Applied Soil Ecology*, 40, 44-56.
- Kwaśna H., Łakomy P., Gornowicz R. 2016a: Grzyby saproksyliczne w resztkach pozrębowych sosny zwyczajnej, *Sylwan*, 160(5), 355–364.
- Kwaśna H., Mazur A., Łabędzki A., Kuźmiński R., Łakomy P. 2016b: Zbiorowiska grzybów w rozkładającym się drewnie dębu i sosny, *Leśne Prace Badawcze*, 77 (3): 261–275.
- Kwaśna H., Mazur A., Kuźmiński R., Jaszczak R., Turski M., Behnke-Borowczyk J., Adamowicz K., Łakomy P. 2017: Abundance and diversity of wood-decay fungi in managed and unmanaged stands in a Scots pine forest in western Poland, *Forest Ecology and Management*, Volume 400 (15), 438-446.
- Łakomy P. Kwaśna H. 2008: *Atlas hub*, Warszawa, Oficyna Wydawnicza MULTICO.
- Łakomy P., Jakubowski M., Kuźmiński R., Kamczyc J. 2011: *Martwe drewno*, Nadleśnictwo Łopuchówko, Regionalna, Dyrekcja Lasów Państwowych w Poznaniu,
- Menkis A., Vasiliauskas R., Taylor A.F.S., Stenström E., Stenlid J., Finlay R. 2006: Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland, *Plant Pathology*, 55: 117-129.
- Nordén J., Penttilä R., Siitonen J., Tomppo E., Ovaskainen O. 2013: Specialist species of wood-inhabiting fungi struggle while generalists thrive in fragmented boreal forests, *Journal of Ecology*, Volume 101(3): 701–712.
- Osono T., Fukasawa Y., Takeda H. 2003: Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition, *Mycologia*, 95: 820–826.
- Ottosson E. 2013: *Succession of wood-inhabiting fungal communities*. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural sciences.
- Persiani A.M., Audisio P., Lunghini D., Maggi O., Granito V.M., Biscaccianti A.B., Chiavetta U., Marchetti M. 2010: Linking taxonomical and functional biodiversity of saproxylic fungi and beetles in broad-leaved forests in southern Italy with varying management histories, *Plant Biosystems*, 144: 250-261.
- Pusz W., Zwijacz-Kozica T., Patejuk K., Uklańska-Pusz C.M. 2017: Zbiorowiska grzybów mikroskopijnych zasiedlające martwe drewno w Karkonoszach i Tatrach, *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa*, 1, 21-26.
- Rajala T., Peltoniemi M., Hantula J., Mäkipää R., Pennanen T. 2010: RNA reveals a succession of active fungi during the decay of Norway spruce logs *Fungal Ecol.*, 4: 437-448.
- Rajala T., Tuomivirta T., Pennanen T., Mäkipää R. (2015) Habitat models of wood-inhabiting fungi along a decay gradient of Norway spruce logs, *Fungal Ecology*, Volume 18, 48-55.
- Referowska-Chodak E. 2014: Problematyka martwego drewna i drzew dziuplastych w systemach certyfikacji FSC i PEFC, *Studia i Materiały CEPL*, 41, 98-115.
- Solon J. 2002: *Ekologiczna rola martwego drewna w ekosystemach leśnych – dyskusja wybranych zagadnień w świetle literatury [W:] A. Breymeyer, M. Degórski, E. Roo-Zielińska, J. Solon, J. Wolski, Podstawy trwałego i zrównoważonego zagospodarowania lasów w Leśnych Kompleksach Promocyjnych. Martwe drewno i jego funkcje ekologiczne w lasach zagospodarowanych i rezerwatach wybranych LKP. Sprawozdanie z III etapu, Sękocin Las: Instytut Badawczy Leśnictwa [typescript].*
- Stokland J.N., Siitonen J., Jonsson B.G. 2012: *Biodiversity in dead wood*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 524.

- Valentín L., Rajala T., Peltoniemi M., Heinonsalo J., Pennanen T., Mäkipää R. 2015: Loss of diversity in wood-inhabiting fungal communities affects decomposition activity in Norway spruce wood *Front. Terr. Microbiol.*, 5, 230.
- van der Wal A., Ottosson E., de Boer W. 2015: Neglected role of fungal community composition in explaining variation in wood decay rates, *Ecology – Ecological Society of America*, Volume 96(1), 124–133.
- Vaz A.B.M., Fonseca P.L.C., Leite L. R., Badotti F., Salim A.C.M., Araujo F.M.G., Cuadros-Orellana S., Duarte Â.A., Rosa C.A., Oliveira G., Góes-Neto A. 2017: Using Next-Generation Sequencing (nNGS) to uncover diversity of Wood-decaying fungi in neotropical atlantic forests, *Phytotaxa*, 295 (1), 001–021.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: Innis M.A.V., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA, 315-322.
- Zielonka T. 2006: When does dead wood turn into a substrate for spruce replacement? *J. Veg. Sci.* 17.6: 739–746.
- Żółciak A. 2003: Rozmieszczenie grzybów z rodzaju *Armillaria* w Polsce oraz ich rośliny żywicielskie. *Prace Inst. Bad. Leśn.* 956: 7–22.
- Źródła internetowe:
 Baza danych NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 Instrukcja Ochrony Lasu 2011: <http://www.szczecin.lasy.gov.pl/documents/32577/28107163/02.instrukcja+ochrony+lasu+TOM+I.pdf/4c05747f-1e8a-4e65-9d31-80ef554e7ce4>

STRESZCZENIE

Drewno jest siedliskiem życia wielu organizmów. Grzyby są nieodłącznym ogniwem w procesach dekompozycji martwej materii organicznej. Niektóre gatunki grzybów inicjują proces dekompozycji drewna, po nich pojawiają się kolejne, które wnikają w już rozłożone drewno. Skład gatunkowy zbiorowisk zależy od kolejności zasiedlania danych siedlisk. Celem pracy było określenie gatunkowego składu zbiorowisk grzybów rozkładających drewno sosny zwyczajnej, przy uwzględnieniu różnic w trzech stopniach rozkładu drewna oraz poznanie zbiorowisk grzybów w drzewostanie gospodarczym i rezerwacie, wykorzystując metody molekularne. Przyjęto, że zbiorowisko grzybów będzie różne w każdym badanym stopniu rozkładu drewna, zbiorowisko grzybów w martwym drewnie sosny zwyczajnej z rezerwatu będzie bardziej zróżnicowane niż z drzewostanu gospodarczego, w zbiorowisku grzybowym będą dominowały gatunki saproksylistyczne. Analizowane próby pochodziły z drzewostanu gospodarczego (P3; dziewięć prób z pniaków, cztery próby z kłód i trzy z gałęzi) i rezerwatu przyrody Dolina Ilanki (P4; cztery próby z pniaków, dziesięć prób z kłód i cztery z gałęzi) w Nadleśnictwie Torzym (52°31'N, 15°08'E). Określono stopień rozkładu drewna pobranych prób według Huntera. Pobrane próby zmielono w młynku kriogenicznym. Do izolacji DNA wykorzystano zestaw Plant Genomic DNA Purification. Amplifikację regionu ITS 1/2 rDNA przeprowadzono z wykorzystaniem starterów: ITS1-F oraz ITS4. Otrzymane sekwencje zmodyfikowano przez obcięcie końców. Przy użyciu algorytmu BLAST dokonano porównania sekwencji z sekwencjami referencyjnymi z bazy danych NCBI. Identyfikację sekwencji wykonano do rangi najniższej możliwego taksonu. W analizowanych próbach potwierdzono obecność grzybów z gromad: Basidiomycota i Ascomycota. W pierwszym stopniu rozkładu zidentyfikowano 5 taksonów grzybów z gromady Ascomycota i 3 z gromady Basidiomycota. W drugim stopniu rozkładu zidentyfikowano 6 taksonów grzybów z gromady Ascomycota, jeden z gromady Basidiomycota i grzyb niehodowalny oraz 24 grzyby z brakiem sekwencji w bazie danych. W trzecim stopniu rozkładu zidentyfikowano po cztery taksony i grzybów należących do gromady Ascomycota, jak i Basidiomycota. Taksonami, które stwierdzono w zbiorowisku grzybów drewna sosen z drzewostanu gospodarczego jak i w rezerwacie były: Ascomycota sp.,

Ascomycota sp. ze ściółki, *C. canadensis*, *R. atrovirens*, Rhytismataceae sp. oraz *S. himantioides*. Analizując dotychczasowe wyniki badań nad martwym drewnem i włączając w nie rezultat powyższych, postuluje się pozostawianie martwego drewna w lesie w celu zwiększenia bioróżnorodności i stosowanie zarówno metody molekularnej jak i klasycznej w celu dokładnego poznania zbiorowiska grzybów, jakie zasiedla martwe drewno w lasach. Wyniki powyższych badań wskazują na konieczność podjęcia dalszych badań dotyczących zbiorowisk grzybowych zasiedlających martwe drewno oraz na potrzebę inwentaryzacji martwego drewna pozostawianego w lesie.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the biodiversity of fungi, found in the dead wood of pine. The material for the study was divided into three individual stage of wood decomposition. The analysed wood samples were obtained from two areas. In the first area, normal forest operations were practiced (P3; 9 samples for stamps, 4 samples from logs and three from branches) and second area was located in the reserve area from i Ilanki Valley nature reserve (P4; 4 samples for stamps, 10 from logs and 4 from branches in Forestry Torzym (52°31'N, 15°08'E). The degree of decomposition was determined according to a five-point scale (Hunter, 1990). The wholesampled wood was in decay classes I-III. The collected material was ground in a SPEX™ SamplePrep™ Freezer/Mill™ cryogenic mill. DNA was extracted with Plant Genomic DNA Purification (Thermo Scientific) Kit, according to instructions. ITS 1/2 rDNA amplification was performed with fungi-specific primers: ITS1-F and ITS4. The dead wood of pine was colonized by Ascomycota and Basidiomycota. The pine wood in decay classes I, II and III was colonized and there were represented by 5, 6, 4 Ascomyocota and 3, 1,4, Basidiomycota. Non-culturable organisms were represented by 24 taxa. The most common fungi were: Ascomycota sp., *C. canadensis*, *R. atrovirens*, Rhytismataceae sp. oraz *S. himantioides*. The results have shown, that the species composition of fungi communities was varied, depending on the stage of wood decomposition. Only *Rhinocladiella atrovirens* was isolated from the samples, which came from both types of areas.