

# Ocena występowania osutki zwisowej jodły w Tatrzańskim Parku Narodowym



Tatrzański  
Park Narodowy



**Dofinansowano ze środków funduszu leśnego przekazanych przez  
Lasy Państwowe**

**Tatrzańskiemu Parkowi Narodowemu w 2019 roku**

*Zespół autorski:*

*dr hab. inż. Wojciech Pusz, prof. UPWr,  
Zakład Fitopatologii i Mykologii, Katedra Ochrony Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy we  
Wrocławiu*

*dr inż. Anna Baturo-Cieśniewska,  
Katedra Biologii i Ochrony Roślin, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w  
Bydgoszczy*

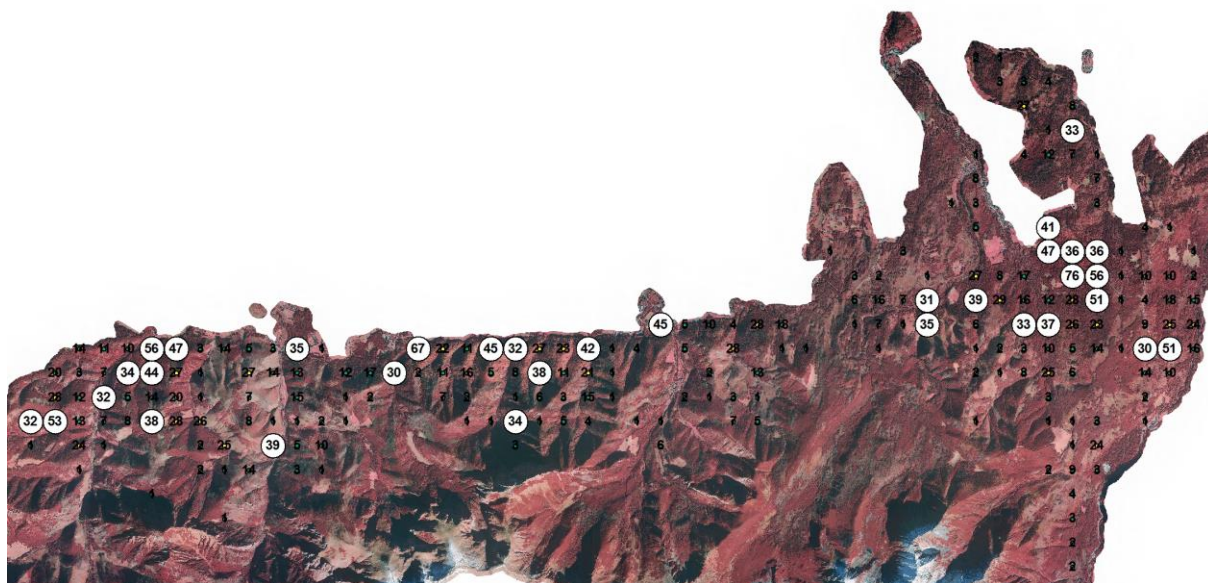
*Wrocław, listopad 2019*

## 1. Metodyka badań

Celem wykonanych prac było:

- Ocena zdrowotności odnowień jodły na stałych powierzchniach badawczych ze szczególnym uwzględnieniem osutki zwisowej jodły;
- Analiza mykologiczna porażonych tkanek i określenie roli gatunków grzybów w patogenezie osutki zwisowej jodły.

Badania prowadzono od kwietnia do przełomu września i października 2019 roku. Analizę występowania osutki zwisowej jodły przeprowadzono w lipcu na 32 stałych powierzchniach badawczych (Bodziarczyk i in. 2019), gdzie występowało więcej niż 30 osobników *Abies alba* (tabela 1). Do oceny występowania choroby wykorzystano metodykę opracowaną według Kowalskiego i Andruscha (2010), gdzie określono występowanie objawów chorobowych (< 25%; 26-50%; 51-75%; > 76%) oraz miejsce występowania objawów (dolna, środkowa lub górna część korony).



Rycina 1. Powierzchnie badawcze, na których prowadzono obserwacje zdrowotności *Abies alba* wraz z pobraniem próbek.

Kolejnym etapem badań było pobranie próbek, na które składały się igły oraz pędy wykazujące objawy osutki zwisowej. Z porażonych organów były wycinane fragmenty, które następnie zostały odkażone powierzchniowo w 0,5% roztworze podchlorynu sodu przez 10 sekund. W podobny sposób wykonano analizę mykologiczną igieł oraz pędów gdzie nie

stwierdzono objawów chorobowych. Kolejnym etapem było wyłożenie około 0,5 cm fragmentów tkanki na szalki Petriego z zestaloną pożywką PDA (agar glukozowo-ziemniaczany). Wcześniej pożywka została zakwaszona kwasem cytrynowym w ilości 3 ml na 250 ml kolbę, w celu zahamowania wzrostu bakterii. Wyrastające z łodyg kolonie grzybów były odszczepiane na skosy z pożywką PDA i oznaczane do gatunku na podstawie cech morfologicznych i molekularnych (Fot. 1).



Fot. 1. Szalka Petriego z pożywką PDA oraz rosnącymi koloniami grzybów

**Odczynniki, materiały jednorazowego użytku oraz drobny sprzęt laboratoryjny wykorzystane w badaniach fitopatologicznych:**

Odczynniki do izolacji grzybów:

- pożywka glukozowo-ziemniaczana PDA - Potato Dextrose Agar (Biocorp),
- pożywka maltozowa - Malt Extract LAB AGAR (Biocorp),
- kwas cytrynowy 1H<sub>2</sub>O CZDA (POCH).

Odczynniki do odkażania powierzchni roboczej, narzędzi i materiału badawczego do izolacji:

- Aerodesin 2000 (Lysoform),
- propanol-2/alkohol izopropylowy CZDA (POCH),
- alkohol etylowy 99,8% bezw. CZDA (POCH),
- podchloryn sodu r-r 10% (CHEMPUR).

Materiały jednorazowego użytku:

- płytki Petriego o średnicy 90mm, 10 kompletów x 60 szt.

- płytki Petriego o średnicy 60 mm, 7 kompletów x 60 szt.

Drobny sprzęt laboratoryjny:

- pęsety laboratoryjne z ostrymi, zakrzywionymi końcówkami.

### **Analizy molekularne**

Do analiz molekularnych przeznaczono izolaty wyhodowane na płytkach Petriego z pożywką glukozowo-ziemniaczną PDA (Potato Dextrose Agar, Difco), wykazujące zróżnicowanie morfologiczne. Celem tych analiz była identyfikacja gatunkowa/rodzajowa będąca wsparciem dla identyfikacji mikroskopowej, a także poznanie struktury genetycznej izolatów i wzbogacenie ich sekwencjami międzynarodowej bazy danych NCBI.

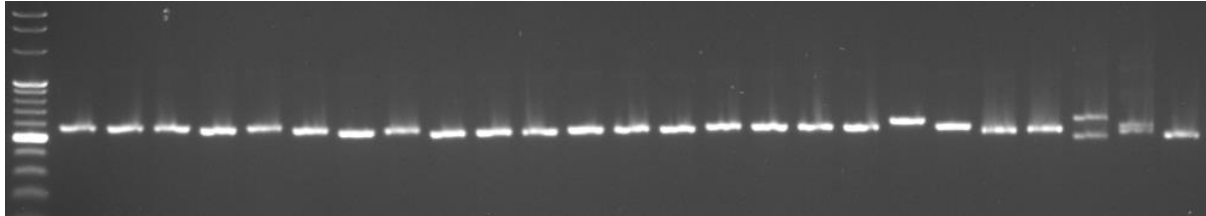
### **Izolacja i przygotowanie DNA do analiz**

Z czystych kultur poszczególnych izolatów wyhodowanych na pożywce PDA wycięto po 3 krążki grzybni o średnicy 5 mm i przeniesiono do płytek Petriego z płynną pożywką glukozowo-ziemniaczną PDB (Potato Dextrose Broth, A&A Biotechnology) i zabezpieczono parafilmem. Uzyskaną po 5-7 dniach grzybnię przeplukano wodą sterylną, odsączono przy użyciu zestawu filtracyjnego składającego się z bibuły filtracyjnej, lejka Büchnera i pompy próżniowej, a następnie liofilizowano przez 2 doby w liofilizatorze CoolSafe (Scanvac). Izolację DNA przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Doyle i Doyle (1990). W przypadku każdego izolatu 30 mg z grzybni poddanej homogenizacji w homogenizatorze MagnaLyser (Roche) przy użyciu kwarcowych kulek i piasku kwarcowego umieszczono w probówce o objętości 2 ml i zalano 900  $\mu$ l buforu ekstrakcyjnego, który zawierał CTAB 5.0 %, EDTA 0.5 M, NaCl 5.0 M, Tris-HCl (pH 8.0) 1.0 M,  $\beta$ -merkaptoetanol i PVP 2.0 %. Po inkubacji w temperaturze 65°C, w celu usunięcia białek i węglowodanów użyto fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego. W kolejnych etapach zastosowano alkohol etylowy 95% i 70%. Uzyskane DNA zawieszono w 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O i doczyszczono przy użyciu zestawu Anty-inhibitor Kit (A&A Biotechnology). DNA zmierzono fluorometrycznie na urządzeniu Quantus (Promega), do dalszych analiz rozcieńczono w ddH<sub>2</sub>O do stężenia 5 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> i przechowywano w temperaturze -20°C.

### **Reakcja PCR**

Reakcję PCR mającą na celu amplifikację regionów ITS przeprowadzono w objętości 37,5  $\mu$ l zawierającej odczynnik PCR Core Kit (QIAGEN, USA): 1x Bufor, 1x roztwór Q, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.6 pM każdego z dwóch starterów (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', White i in. 1990) oraz DNA o stężeniu 10 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup>. DNA amplifikowano w urządzeniu Eppendorf EP Mastercycler według protokołu reakcyjnego: denaturacja wstępna w 94°C - 5 min., 35 cykli (94°C - 1 min., 52°C - 1 min., 72°C - 2 min.) i końcowe wydłużanie w 72°C - 5 min. Obecność produktów reakcji zweryfikowano po rozdiale elektroforetycznym w buforze

TBE, przeprowadzonym na 1.2% żelu agarozowym (Pronadisa) z dodatkiem barwnika SimplySafe (EUR<sub>X</sub>) nanosząc po 2 µl mieszaniny poreakcyjnej. Zdjęcie żelu z przykładowymi amplikonami przedstawia fotografia 2.



Fot. 2. Wynik elektroforezy przykładowych 25 amplikonów, wykonanej w celu weryfikacji poprawności reakcji PCR przed sekwencjonowaniem

### **Sekwencjonowanie regionów ITS i analiza danych**

Produkty amplifikacji zostały oczyszczone i zsekwencjonowane przez Genomed (Polska). Do analizy otrzymanych sekwencji użyto programu FinchTV 1.4. Analizę ClustalW przeprowadzono w Mega7 Toolbar (Kumar i in. 2016). Do identyfikacji gatunkowej na podstawie sekwencji ITS wykorzystano *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* w bazie NCBI (The National Center for Biotechnology Information) ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

W przypadku *Trichoderma* spp. identyfikację gatunkową dodatkowo potwierdzano analizując sekwencje regionów ITS w TrichOKey v. 2.0 (Druzhinina i in. 2005) i TrichoBLAST v. 1.0 (Kopchinskiy i in. 2005).

Do określenia zróżnicowania sekwencji (Overall Mean Distance) oraz konstrukcji dendrogramu na podstawie sekwencji ITS rDNA stosując algorytm maksymalnego prawdopodobieństwa (Maximum Likelihood algorithm) bazujący na modelu parametrycznym Kimura 2 (Kimura 2-parameter model) wykorzystano narzędzia Mega7 Toolbar (Kimura 1980, Kumar i in. 2016, Saitou i Nei 1987). Do oceny wiarygodności skonstruowanego drzewa filogenetycznego zastosowano metodę *bootstrap* z 1000 replikacji.

### **Odczynniki i drobny sprzęt jednorazowego użytku wykorzystane w badaniach molekularnych**

Hodowla izolatów:

- pożywka glukozowo-ziemniaczana PDA (Potato Dextrose Agar, Difco)
- PDB (Potato Dextrose Broth, A&A Biotechnology)

Izolacja DNA:

- kulki kwarcowe i piasek kwarcowy (Sigma-Aldrich)

- CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) (Sigma-Aldrich)
- EDTA (di-sodu wersenian hydrat) (POCH)
- NaCl (CHEMPUR)
- Trizma base (Sigma-Aldrich)
- $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- PVP (poliwinylopirolidon) (Sigma-Aldrich)
- gotowa mieszanina fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego (25 : 24 : 1) (CHEMPUR)
- chloroform (CHEMPUR)
- alkohol izoamylowy (CHEMPUR)
- alkohol etylowy 96% (CHEMPUR)
- Anty-inhibitor Kit (A&A Biotechnology).
- zestaw *QuantiFluordsDNA* (Promega)

PCR i elektroforeza:

- PCR Core Kit (QIAGEN, USA)
- startery (IBB PAN)
- barwnik SimplySafe (EUR<sub>x</sub>)
- agarozą (Pronadisa)
- kwas borowy (CHEMPUR)
- Trizma base (Sigma-Aldrich)
- Perfect 100 bp DNA Ladder (EUR<sub>x</sub>)

Drobny sprzęt jednorazowego użytku:

- plastikowe płytki Petriego,
- parafilm,
- bibuła filtarcyjna,
- rękawiczki nitrylowe,
- końcówki do pipet automatycznych o pojemności 10, 200 i 1000  $\mu$ l,
- mikroprobówki o pojemności 0,2; 1,5 i 2,0 ml,
- falkony o pojemności 15 ml.

## **2. Wyniki**

### **2.1 Ocena zdrowotności – badania terenowe**

Objawy widoczne były w całym okresie prowadzenia obserwacji tzn. od maja do połowy września. Największe nasilenie objawów chorobowych obserwowano w miesiącach letnich. Symptomy chorobowe widoczne były w postaci zamierających igieł, a następnie zwisających na resztkach grzybni (Fot.3), a także deformacji pędów (Fot.4).



Fot. 3. Objawy chorobowe na pędach *Abies alba*



Fot. 4. Deformacje pędów *Abies alba*

Najmniejsze nasilenie występowania objawów osutki zwisowej jodły zanotowano na powierzchniach zlokalizowanych w rejonach: Dolina Kościeliska, Wawrzeczkowa Cyrhla, na powierzchni przy drodze krajowej 58, a także w rejonie Małej Łąki i Doliny Strążyskiej (tabela 1). W tych przypadkach objawy obserwowane były w dolnej i środkowej części drzew ale powierzchnia ich występowania zajmowała mniej niż 25% drzewa. Wyjątkiem były tutaj osobniki rosnące na powierzchni numer 709 gdzie w przypadku połowy badanych osobników objawy zajmowały około 50% powierzchni. Na drzewach w odnowieniach na powierzchniach na Zgorzelisku, a także w sąsiedztwie stadionu w Zakopanem oraz na Łysej Polanie stwierdzono porażenie niższe niż 25% powierzchni drzewa na od 54 do 99 osobników. Z kolei na stanowiskach 790 i 804 objawy chorobowe występowały na powierzchni ponad 50% drzew - na 88% osobników (powierzchnia 790) i 36% osobników (powierzchnia 804). Wydaje się, że największe nasilenie choroby występuje na powierzchniach zlokalizowanych w Dolinie Chochołowskiej. W tym przypadku większość drzew na wszystkich badanych powierzchniach wykazywały objawy porażenia na poziomie 26-51%, a na powierzchniach numer 551 symptomy były widoczne na więcej niż 50% powierzchni pędów. W omawianym rejonie objawy były widoczne także na górnej części drzew.

Tabela 1. Ocena występowania objawów osutki zwisowej jodły na wybranych powierzchniach stałych w Tatrzańskim Parku Narodowym [%]

Numer powierzchni badawczej	Rejon	Średnia wysokość drzew	Powierzchnia występowania objawów chorobowych				Lokalizacja występowania objawów		
			< 25 %	26 - 50%	51- 75%	> 75%	Dół	Środek	Góra
551	Dolina Chochołowska	1,3		23	77		x	x	x
552		4,3	45	3	42		x	x	x
601		5,1	23	48	39		x	x	
649		7,5		73	27		x	x	x
650		1,8	44	54	2		x	x	
696		4,5	12	56	32		x	x	x
697		7,2	6	94			x	x	x
702		Droga 58	2,3	100				x	x
660	Mała Łąka i Dolina Strążyska	4,3	95	5			x	x	
706		6,5	100				x	x	
708		4,8	100				x	x	
709		5,4	45	50	5		x	x	
710		0,9	100				x		
666		1,4	100				x		
571		1,5	100				x		
713		1,8	99	1			x		
740	Stadion	2,1	98				x	x	
770	Zgorzelisko	4,3	87	13			x	x	



774		6,7	96	4			x	x		
789		4,5	98	2			x	x		
790		2,1		12	88		x	x	x	
804		1,7	54	10	36		x	x		
803		1,5	98	2			x	x		
838		1,9	89	11			x	x		
814		1,8	99	1			x			
805		1,7	65	35			x			
736		Łysa Polana	4,3	84	16			x	x	
737			3,5	95	3			x		
767	Wawrzeczkowa Cyrhla	1,7	100				x			
751		1,9	100				x			
769		1,6	100				x			
514	Dolina Kościeliska	2,1	100				x			

## 2.2 Analiza mykologiczna – badania laboratoryjne

W trakcie analizy mykologicznej igieł i pędów *Abies alba* wyizolowano łącznie 22 taksonów grzybów (tabela 2). W przypadku igieł z objawami porażenia największym udziałem charakteryzował się grzyb *Sydowia polyspora*, który stanowił 34% udziału, następnie *Alternaria alternata* (26%) i *Rhizosphaera macrospora* (16,7% udziału). Podobna sytuacja miała miejsce gdy izolowano grzyby z igieł nie wykazujących objawów chorobowych. Największym udziałem charakteryzowały się *S. polyspora* (45%) oraz *A. alternata* (36%). Natomiast nie izolowano w tym przypadku *R. macrospora*. W mykobiocie pędów na których stwierdzono występowanie objawów chorobowych największym udziałem wykazywały się takie taksony jak: niezidentyfikowany grzyb z rodzaju *Phomopsis* (55%) oraz *R. macrospora* (blisko 20% udziału). Z kolei w przypadku pędów, które nie wykazywały objawów chorobowych największym udziałem charakteryzował się gatunek *Nigrospora oryzae* (28%) oraz *A. alternata* (26%).

Tabela 2. Frekwencja występowania grzybów w tkankach *Abies alba* [%]

Gatunek grzyba	Kod akcesu do bazy NCBI	Igły z objawami porażenia	Igły bez objawów porażenia	Pędy z objawami porażenia	Pędy bez objawów porażenia
<i>Alternaria alternata</i>	MN539533, MN539537 MN539535, MN538263 MN538264, MN539538	26	36	2,8	26,3
<i>Arthrinium arundinis</i>	MN538265, MN538266		3	1,4	
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	MN538267			2,8	
<i>Chaetomium globosum</i>	MN538273			2,1	

<i>Coniochaeta</i> sp.	MN538293			2,1	
<i>Entoleuca</i> sp.	MN538292		1		14
<i>Epicoccum</i> <i>nigrum</i>	MN539539	9	1		1,7
<i>Hypoxylon</i> <i>fragiforme</i>	MN538296			5	
<i>Nigrospora</i> <i>oryzae</i>	MN538302, MN538309				28,1
<i>Nigrospora</i> <i>sphaerica</i>	MN538303	5	1		
<i>Periconia</i> <i>byssoides</i>	MN538310			0,7	
<i>Phomopsis</i> sp.	MN538322, MN538333, MN538332, MN538334, MN538335		3	55,5	21,1
<i>Rhizosphaera</i> <i>macrospora</i>	MN538336, MN538337	16,7		19,8	
<i>Rosellinia</i> <i>corticium</i>	MN538338, MN539534, MN538339			2,1	5,3
<i>Sirococcus</i> <i>conigenus</i>	MN538340			0,7	
<i>Sordaria</i> <i>fimicola</i>	MN538351, MN538350			2,1	3,5
<i>Sydowia</i> <i>polyspora</i>	MN538353, MN538352	34	45		
<i>Tricharina</i> sp.	MN538354	7			
<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i>	MN539536	2,3	10		
<i>Xylaria</i> <i>longipes</i>	MN538355			1,5	
<i>Xylaria</i> sp.	MN538356			1,4	

Dodatkowo wykonano analizę porażonych igieł w celu określenia występowania struktur grzybów *in vivo*. W maju, na zamierających igłach stwierdzono obecność pykidiów grzyba *Nemastostoma parasiticum*, sprawcy osutki zwisowej jodły (Fot. 5).



Fot. 5. Pykindia grzyba *Nemastostoma parasiticum*

Na niektórych igłach stwierdzono również obecność zarodników grzybów z rodzaju *Curvularia* (Fot. 6).



Fot. 6. Zarodniki grzyba *Curvularia* spp.

### 2.3 Wyniki analiz molekularnych

Analiza molekularna pozwoliła na identyfikację 37 izolatów należących do typu *Ascomycota* (Workowce). Większość ze zidentyfikowanych gatunków/rodzajów powszechnie występuje w środowisku leśnym. W przypadku kilku, nie uzyskano zadawalającego wyniku, co było związane z brakiem produktu PCR, nieprawidłowym produktem lub sekwencją nie pozwalającą na zakwalifikowanie do jakiegokolwiek taksonu. Analizowane sekwencje izolatów, które jednoznacznie udało się zakwalifikować do gatunku/ rodzaju zostały zdeponowane w GenBank NCBI. Są dostępne na stronie <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?cmd=search> po wpisaniu numeru akcesyjnego. Numery akcesyjne poszczególnych izolatów zestawiono w tabeli 3 i umieszczono wraz z ich nazwami na dendrogramie (wykres 1). 28 izolatów zidentyfikowano do gatunku: 6 izolatów jako *Alternaria alternata*, 3 izolaty jako *Rosellinia corticium*, po 2 izolaty *Arthrinium arundinis*, *Nigrospora oryzae*, *Rhizosphaera macrospora*, *Sordaria fimicola*, *Sydowia polyspora* oraz po 1 izolacie *Biscogniauxia mediterranea*, *Chaetomium globosum*, *Epicoccum nigrum*, *Hypoxylon fragiforme*, *Nigrospora sphaerica*, *Periconia byssoides*, *Sirococcus conigenus*, *Trichoderma harzianum* i *Xylaria longipes*. 9 izolatów zidentyfikowano do rodzaju: 5 do *Phomopsis* i po jednym do *Coniochaeta*, *Entoleuca*, *Tricharina* i *Xylaria*. Sekwencje wykazywały 100% zgodności z sekwencjami w GenBank. Jedynie w przypadku kilku izolatów stwierdzono zgodność poniżej 100% spowodowaną różnicowaniem na poziomie jednego nukleotydu. Sekwencje *Phomopsis* sp. wykazywały zgodność na poziomie

99,46-99,64%, *N. sphaerica* na poziomie 99,8%, a *Tricharina* sp. i *Xylaria* sp. na poziomie 99,64%.

Tabela 3. Grzyby wyizolowane z igieł (N) i pędów (S) jodły pospolitej (*Abies alba*). Identyfikacja molekularna na bazie sekwencji regionów ITS izolatów z jodły w Tatrzańskim Parku Narodowym.

Grzyb	Pochodzenie izolatu	Numer akcesyjny w GenBank NCBI	Zgodność z izolatami z NCBI/ [%]	Zgodność z sekwencją z NCBI (max 2 przykłady)
<i>Alternaria alternata</i>	N	MN539533	100	MN186042, MN173146
	S	MN539537	100	MN251032, MN075403
	S	MN539535	100	MN251032, MN249628
	S	MN538263	100	MN251032, MN249628
	N	MN538264	100	MN170555
	N	MN539538	100	MK451961, MN075403
<i>Arthrimum arundinis</i>	N	MN538265	100	MN186663, MK632007
	S	MN538266	100	MN313263, MF627422
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	S	MN538267	100	MH754669, KR909208
<i>Chaetomium globosum</i>	S	MN538273	100	KX343158, KC989058
<i>Coniochaeta</i> sp.	S	MN538293	100	MG208009
<i>Entoleuca</i> sp.	S	MN538292	100	MF536543
<i>Epicoccum nigrum</i>	S	MN539539	100	MN186744, MH857848
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	S	MN538296	100	MH855287, MG098276
<i>Nigrospora oryzae</i>	S	MN538302	100	MN186750, MG661721
	S	MN538309	100	MN186750, MG661721
<i>Nigrospora sphaerica</i>	N	MN538303	99,8	MK408581, MN180852
<i>Periconia byssoides</i>	S	MN538310	100	KU935678
<i>Phomopsis</i> sp.	N	MN538322	99,46	KJ739494, KP122280
	S	MN538333	99,64	KJ739494, MH973157
	S	MN538332	99,64	KJ739494, MH973157
	S	MN538334	99,46	KJ739494, KU751870
	N	MN538335	99,64	KJ739494, KU751870
<i>Rhizosphaera macrospora</i>	S	MN538336	100	AM884745, MH861202
	N	MN538337	100	AM884745
<i>Rosellinia corticium</i>	S	MN538338	100	KY610393, KC311485
	S	MN539534	100	KC311485, KY610393
	S	MN538339	100	KC311485, KY610393
<i>Sirococcus conigenus</i>	S	MN538340	100	AY163799, EF512481
<i>Sordaria fimicola</i>	S	MN538351	100	KC254096, AY681188
	S	MN538350	100	MH858489, MG098253
<i>Sydowia polyspora</i>	N	MN538353	100	MN186853
	N	MN538352	100	KY659505, GQ412728
<i>Tricharina</i> sp.	N	MN538354	99,6	KY364026
<i>Trichoderma harzianum</i>	N	MN539536	100	MH153633, MG751207

<i>Xylaria longipes</i>	S	MN538355	100	MK408619, MN251059
<i>Xylaria</i> sp.	S	MN538356	99,64	KC867276, MH855714

### Analiza dendrogramu

Dendrogram (rycina 2) pokazuje graficznie stopień podobieństwa genetycznego grzybów uzyskanych z igieł i pędów jodły pospolitej w Tatrzańskim Parku Narodowym. Pogrupowanie izolatów w 3 klastry jest odzwierciedleniem ich przynależności taksonomicznej do różnych typów, klas, rzędów i rodzin (http 1, http- 2).

#### **Klasa Dothideomycetes**

Rząd *Dothideales*, Rodzina *Dothioraceae*: *Sydowia polyspora*

Rząd *Pleosporales*, Rodzina *Didymellaceae*: *Epicoccum nigrum*

Rząd *Pleosporales*, Rodzina *Pleosporaceae*: *Alternaria alternata*

Rząd *Pleosporales*, Rodzina – nie zdefiniowana: *Periconia byssoides*

Rząd *Venturiales*, Rodzina *Venturiaceae*: *Rhizosphaera macrospora*

#### **Klasa Sordariomycetes**

Rząd - nie zdefiniowany, Rodzina *Apiosporaceae*: *Arthrimum arundinis*

Rząd *Coniochaetales*, Rodzina *Coniochaetaceae*: *Coniochaeta* sp.

Rząd *Diaporthales*, Rodzina *Diaporthaceae*: *Phomopsis* sp.

Rząd *Diaporthales*, Rodzina - nie zdefiniowana: *Sirococcus conigenus*

Rząd *Hypocreales*, Rodzina *Hypocreaceae*: *Trichoderma harzianum*

Rząd *Sordariales*, Rodzina *Chaetomiaceae*: *Chaetomium globosum*

Rząd *Sordariales*, Rodzina *Sordariaceae*: *Sordaria fimicola*

Rząd *Xylariales*, Rodzina *Hypoxylaceae*: *Hypoxylon fragiforme*

Rząd *Xylariales*, Rodzina *Xylariaceae*: *Biscogniauxia mediterranea*, *Entoleuca* sp.  
*Rosellinia corticium*, *Xylaria longipes*, *Xylaria* sp.

Rząd - nie zdefiniowany, Rodzina - nie zdefiniowana: *Nigrospora oryzae*, *Nigrospora sphaerica*

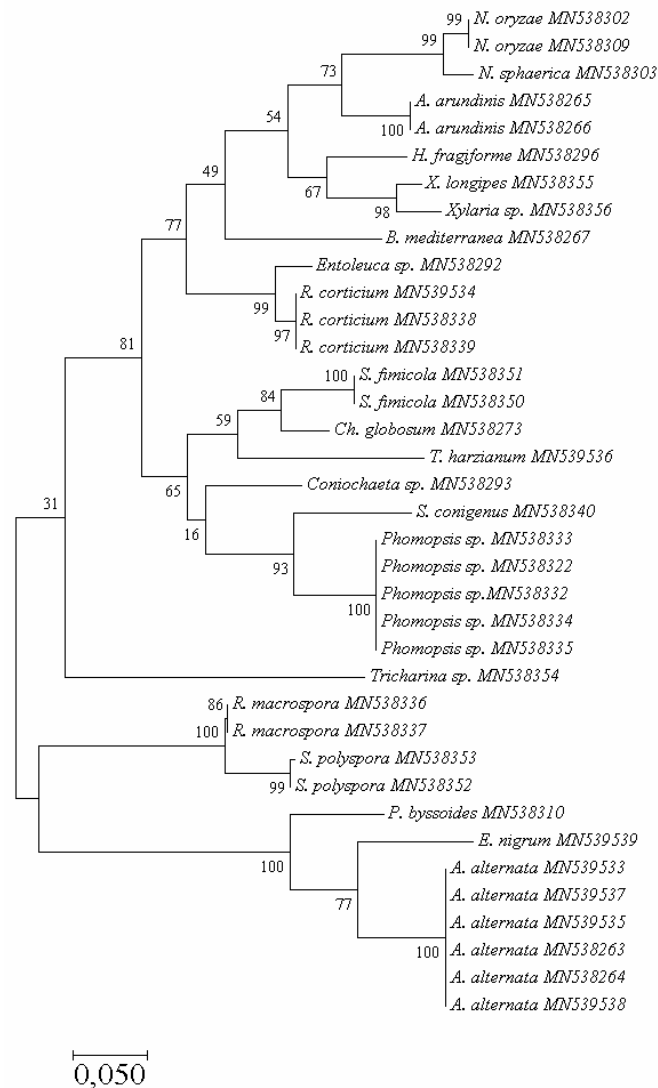
#### **Klasa Pezizomycetes**

Rząd *Pezizales*, Rodzina *Pyronemataceae*: *Tricharina* sp.

Najliczniejszą grupę stanowiły grzyby należących do klasy *Sordariomycetes*, które utworzyły klaster składający się z 19 izolatów. 12 izolatów należących do klasy *Dothideomycetes* utworzyło odrębny klaster, a jedyny przedstawiciel klasy *Pezizomycetes* (*Tricharina* sp.) został pogrupowany oddzielnie.

Na dendrogramie widoczna jest również zgodność izolatów należących do tego samego gatunku. Sekwencje 6 izolatów *A. alternata* były jednakowe, jedynie jeden (MN538264) różnił się jednym nukleotydem. Sekwencje 2 izolatów *S. polyspora* również różniły się jednym nukleotydem. W przypadku izolatów *A. arundinis* nie stwierdzono zróżnicowania

genetycznego, podobnie jak *N. oryzae*, *Phomopsis* sp., *R. macrospora* i *S. fimicola*. Izolaty należące do rodzaju *Nigrospora* utworzyły wspólną grupę, ale widać ich zróżnicowanie gatunkowe (*N. oryzae*/ *N. sphaerica*), co w rzeczywistości przekładało się na różnicę w 20 nukleotydach w amplikonie (rycina 3) liczącym 528 nukleotydów, a podobieństwo między gatunkami kształtowało się na poziomie 96,22%.



Rycina 2. Dendrogram utworzony na podstawie sekwencji regionów ITS w programie MEGA7, obrazujący graficznie stopień podobieństwa genetycznego izolatów uzyskanych z pędów i igieł *Abies alba* w Tatrzańskim Parku Narodowym

Range 1: 1 to 528 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Prev](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
865 bits(468)	0.0	509/529(96%)	2/529(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCGGAGGGATCATTACAGAGTTATCCAACCTCCCAAACCCATGTGAACCTTATCTCTTTGTT			60
Sbjct 1	GCGGAGGGATCATTACAGAGTTATCCAACCTCCCAAACCCATGTGAACCTTATCTCTTTGTT			60
Query 61	GCCTCGGCGCAAGCTACCCGGGACCCAGCGCCCCGGGCGGCCCGCGCGGACAAACC-A			119
Sbjct 61	GCCTCGGCGCAAGCTACCCGGGACCCAGCGCCCCGGGCGGCCCGCGCGGACAAACCA			120
Query 120	AACTCTTGTTATCTTAGTTGATTATCTGAGCGTCTTATTTAATAAGTCAAACCTTCAAC			179
Sbjct 121	AACTCTTGTTATCTTAGTTGATTATCTGAGTGTCTTATTTAATAAGTCAAACCTTCAAC			180
Query 180	AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGA			239
Sbjct 181	AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGA			240
Query 240	ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTA			299
Sbjct 241	ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTA			300
Query 300	GTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTTCAACCCCTAAGCACAGCTTACTGTTGGGACTCT			359
Sbjct 301	GTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTTCAACCCCTAAGCACAGCTTACTGTTGGGAACT			360
Query 360	ACGGCCTCGTAGTTCCTAATGCGATTGGCGGAGTGGCAGTAGTCCTCTGAGCGTAGTA			419
Sbjct 361	ACGGCCTC-GTAGTTCCTCAAAGACATTGGCGGAGTGGCAGTAGTCCTCTGAGCGTAGTA			419
Query 420	ATTCTTTATCTCGCTTTTGTAGGTGCTGccccccGGCCGTTAAACCCCAATTTTTTC			479
Sbjct 420	ATCTTTTATCTCGCTTCTGTTAGGTGCTGCCCCCGCCGTAACCCCAATTTTTTC			479
Query 480	TGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA 528			528
Sbjct 480	TGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA 528			528

Rycina 3. Graficzny wynik porównania sekwencji *N. oryzae* i *N. sphaerica* w programie blastn

### Omówienie wyników

Osutka zwisowa jodły, powodowana przez gatunek *Herpotrichia parasitica* notowana jest na terenie południowej Polski od wielu lat (Kowalski i Andruch 2010, 2012). Z krajów europejskich występuje także w Austrii, Szwajcarii, Danii oraz Wielkiej Brytanii (Kowalski i Andruch 2012). W zachodniej Norwegii jest sprawcą zamierania młodszych osobników z rodzaju *Abies* (Talgoslash i Stensv 2012). Wykonane analizy mykologiczne wykazały jednak duży udział grzybów z rodzaju *Rhizoctonia* (Kowalski i Andruch 2012). Niektórzy badacze twierdzą, że to właśnie te grzyby są głównym sprawcą osutki zwisowej jodły (Buttin 2014). W wyniku przeprowadzonej analizy mykologicznej igieł z objawami porażenia okazało się jednak, że w żadnym przypadku nie stwierdzono grzybów z rodzaju *Rhizoctonia*, także w trakcie analizy pędów z wyraźnymi objawami choroby. Największym udziałem w mykobiocie igieł z wyraźnymi symptomami chorobowymi charakteryzował się grzyb *Sydowia polyspora*. *S. polyspora* jest uważany za jeden z towarzyszących gatunków grzybów w procesie tzw. sezonowego opadania igieł (current season needle necrosis - CSNN). Dotychczasowe badania wskazują, że przyczyna tego zjawiska leży zarówno po stronie czynników abiotycznych jak i biotycznych. Z igieł jodły wykazujących objawy tej choroby izolowano cały szereg gatunków grzybów, zarówno patogenów jak i saprotrofów wśród których wymienia się także grzyba *S. polyspora* (Talgø i in. 2010). Należy również dodać, że ostatnie doniesienia wskazują, że gatunek ten jest zdolny do zasiedlenia wiązek przewodzących igieł, a tym samym może być uznany za patogena wtórnego tkanek uszkodzonych np. w wyniku żerowania owadów (Pan i in. 2018) ale także sprawcę zamierania siewek co może mieć niebagatelne znaczenie w odnowieniach naturalnych



(Ridout i Newcombe 2018). Potwierdzają to badania Jankowiaka i in. (2016), którzy stwierdzili dominację tego gatunku w mykobiocie siewek w odnowieniu jodły w południowej Polsce. Drugim wyraźnym dominantem w mykobiocie igieł wykazujących i nie wykazujących objawów chorobowych był patogen wtórny *Alternaria alternata*. Grzyb ten zasiedla tkanki uszkodzone w wyniku oddziaływania innych czynników chorobowych i jest izolowany głównie z zamierających igieł jodły (Kowalski i Andruch 2012). Stosunkowo dużym udziałem w mykobiocie igieł oraz pędów z objawami porażenia przez osutkę zwisową sosny charakteryzował się grzyb *Rhizosphaera macrospora*. Znajduje to swoje potwierdzenie w badaniach Kowalskiego i Andrucha (2012), którzy izolowali ten gatunek z tkanek wykazujących objawy chorobowe. Wiele gatunków z tej grupy grzybów, np. *R. macrospora* należy do tzw. *transient fungi*. Grzyby z tej grupy początkowo występują jako endofity, a później zasiedlają zamierające tkanki swojego żywiciela (Sieber-Canavesi i Sieber 1993). Znajduje to swoje potwierdzenie w przypadku jodły gdzie *R. macrospora* może być odpowiedzialna powstawanie nekroz (Nawrot-Chorabik i Jankowiak 2010), a przez niektórych badaczy uważany jest za jednego z głównych patogenów igieł (Buttin 1995). Potwierdzają to badania prowadzone w Norwegii (Talgoslash i Stensv 2012). W prowadzonych badaniach nie stwierdzono występowania grzyba *Delphinella abietina*, którego występowanie potwierdzono w ostatnim czasie w Bułgarii (Bencheva 2017). Może jednak się okazać, że patogen ten będzie także pojawiał się w Polsce. Podobnie ma się sytuacja z grzybem *Pestalotopsis funerea*, który jest uważany za patogena wtórnego i może występować także na igłach jodły (Talgø i in. 2010). W mykobiocie pędów, na których stwierdzono objawy osutki zwisowej jodły największym udziałem charakteryzował się gatunek z rodzaju *Phomopsis*, a także *R. macrospora*. Znajduje to swoje potwierdzenie w badaniach Jankowiaka i in. (2016), który izolował te gatunki z siewek *A. alba* w odnowieniach naturalnych. Grzyb ten był także izolowany z uszkodzonych tkanek jodły (Metzler i in. 2012). Interesujący jest natomiast fakt wyizolowania gatunku *Biscogniauxia mediterranea*, który stanowił blisko 3% udziału mykobioty zasiedlającej pędy z objawami osutki zwisowej jodły. Dotychczas ten gatunek nie był stwierdzany w Polsce. W Czechach został uznany za gatunek rzadki i był stwierdzany na zamierającym i martwym drewnie (Zíbarová i Kout 2017).

## Podsumowanie

- Odnowienia jodły w Tatrzańskim Parku Narodowym wykazują objawy porażenia przez sprawców osutki zwisowej jodły w tym *Nemastostoma parasiticum*.
- Największe nasilenie choroby stwierdzono na powierzchniach w Dolinie Chochołowskiej, a najmniejsze w Dolinie Kościeliskiej i Wawrzeczkowej Cyrhli.
- W trakcie analizy mykologicznej stwierdzono dominację grzyba *Sydowia polyspora* oraz *Rhizosphaera macrospora* w mykobiocie igieł wykazujących objawy osutki zwisowej jodły.

## Literatura

- Bencheva, S. (2017). First report of *Delphinella abietis* (O. Rostrup) E. müller on *Abies alba* Mill. in Bulgaria. *Silva*, 18 (1): 59-62.
- Bodziarczyk J., Szwagrzyk J., Zwijacz-Kozica T., Zięba A., Szewczyk J., Gazda A. 2019. Struktura drzewostanów Tatrzańskiego Parku Narodowego – wyniki inwentaryzacji z lat 2016–2017. *Leśne Prace Badawcze* 80 (1): 13–21.
- Butin H, 1995. *Tree Diseases and Disorders. Causes, Biology and Control in Forest and Amenity Trees*. Oxford University Press, New York.
- Butin, H. (2014). " Herpotrichia" needle browning of silver fir-an error and its revision. *Forstschutz Aktuell*, (59): 12-14.
- Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P., Nicholson P., 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyze Fusarium earblight of wheat. *Plant Pathology* 47, 197– 205.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Komoń M., Bissett J., Szakacs G., Kubicek C.P., 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 813–828.  
http 1 - Catalogue of Life: 24th September 2018, <http://www.catalogueoflife.org>
- http 2 – Index Fungorum, <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- Jankowiak, R., Bilański, P., Paluch, J., & Kołodziej, Z. (2016). Fungi associated with dieback of *Abies alba* seedlings in naturally regenerating forest ecosystems. *Fungal ecology*, 24, 61-69.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kopchinskiy A., Komoń M., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., 2005. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research* 109:658–660.
- Kowalski, T., Andruch, K. (2010). Herpotrichia needle browning on *Abies alba* in the Lesko Forest District stands: disease intensity and associated fungi. *Phytopathologia*, 55, 21-34.
- Kowalski, T., Andruch, K. (2012). Mycobiota in needles of *Abies alba* with and without symptoms of Herpotrichia needle browning. *Forest Pathology*, 42(3), 183-190.

- Kumar S., Stecher G., and Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Metzler, B., Hecht, U., Nill, M., Brüchert, F., Fink, S., Kohnle, U. 2012. Comparing Norway spruce and silver fir regarding impact of bark wounds. *Forest Ecology and Management*, 274: 99-107.
- Nawrot-Chorabik, K., & Jankowiak, R. (2010). Interakcje pomiędzy kalusem trzech genotypów *Abies alba* a grzybami o różnym statusie ekologicznym. *Leśne Prace Badawcze*, 71(4): 381-389.
- Pan, Y., Ye, H., Lu, J., Chen, P., Zhou, X. D., Qiao, M., & Yu, Z. F. (2018). Isolation and identification of *Sydowia polyspora* and its pathogenicity on *Pinus yunnanensis* in Southwestern China. *Journal of Phytopathology*, 166(6): 386-395.
- Ridout, M., Newcombe, G. (2018). *Sydowia polyspora* is both a foliar endophyte and a premergent seed pathogen in *Pinus ponderosa*. *Plant Disease*, 102(3): 640-644.
- Saitou N., Nei M., 1987. The Neighbor-Joining Method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.*, Vol. 4, pp. 406–425.
- Siber-Canavesi F., Sieber T.N. 1993. Successional patterns of fungal communities in needles of European silver fir (*Abies alba* Mill.). *New Phytologist*, 125: 149–161
- Talgø, V., Chastanger, G., Thomsen, I., Cech, T., Riley, K., Lange, K., Klemsdal, S., Stensvand, A., 2010. *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.). *Fung. Biol.* 114: 545-554
- Talgoslash, V., Stensv, A. (2012). Foliage diseases on true fir (*Abies* spp.) in Norway. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(9): 246-251.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, CA, 315-322.
- Wilson A., Simpson D., Chandler E., Jennings P., Nicholson P., 2004. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters* 233: 69–76.
- Zíbarová L., Kout J. 2017. Xylariaceous pyrenomycetes from Bohemia: species of *Biscogniauxia* and *Hypoxylon* new to the Czech Republic, and notes on other rare species. *Czech Mycology*, 69(1): 77-108.