



**Raport z projektu badawczego: Określenie składu gatunkowego grzybów biorących udział w zamieraniu aparatu asymilacyjnego kosodrzewiny na terenie Tatr Zachodnich oraz zbadanie ich wpływu na wybrane parametry pędów i zamieranie tego gatunku**

Wykonawcy:

dr hab. inż. Czesław Bartnik

prof. dr hab. Tadeusz Kowalski

mgr inż. Dominika Ledwich

mgr inż. Jolanta Michalik

Badania dofinansowano ze środków funduszu leśnego przekazanych przez Lasy Państwowe

Kraków, listopad 2020 r.

## 1. Wstęp

Od kilku lat obserwuje się w Tatrach Zachodnich nasilone zamieranie aparatu asymilacyjnego kosodrzewiny. Na początku dotyczyło to jeszcze stosunkowo ograniczonych powierzchni lecz wraz z upływem czasu powierzchnia porażonej kosodrzewiny powiększała się. Tak nagłe pojawienie się tego groźnego zjawiska skłoniło autorów projektu do podjęcia wstępnych badań nad sprawcami zamierania igieł u tego gatunku. W efekcie zidentyfikowano jednego ze sprawców zamierania igieł kosodrzewiny - *Leptomelanconium allescheri*, (Kowalski i in. 2018)\*. Jest to pierwsze stwierdzenie tego gatunku w Polsce na *Pinus mugo*. Grzyb ten był dotychczas stwierdzany na kosodrzewinie tylko w Czechach i Austrii. Wstępne badania wykazywały, że w zamieraniu igieł kosodrzewiny na terenie TPN uczestniczą jeszcze inne gatunki grzybów, które wykazują dużą częstotliwość, a ich biologia i rozprzestrzenienie jest jeszcze w małym stopniu rozpoznana naukowo.

Kosodrzewina jest objęta częściową ochroną gatunkową oraz pełni istotną rolę w zapobieganiu erozji gleby w wyższych partiach gór. Grzyby powodujące nasilone zamieranie aparatu asymilacyjnego z jednej strony obniżają istotnie walory estetyczne kosodrzewiny, szczególnie bezpośrednio lub w pobliżu szlaków turystycznych, z drugiej strony osłabiają krzewy, co w sprzyjających warunkach może doprowadzić do zamierania pędów, a w konsekwencji do zamierania całych drzewek.

Postępujące ocieplenie klimatu może być jedną z przyczyn uaktywnienia się niektórych gatunków grzybów endofitycznych, żyjących dotychczas bezobjawowo na żywych igłach i przejścia ich w tych warunkach do fazy patogenicznej. Poznanie sprawców nasilonego zamierania igieł kosodrzewiny w Tatrach Zachodnich przyczyni się do lepszego zrozumienia stopnia zagrożenia tego gatunku oraz pozwoli określić charakter i fazę epifitozy na *P. mugo*.

W celu pogłębienia wiedzy o skutkach masowego zamierania aparatu asymilacyjnego na rozwój kosodrzewiny niezbędne są badania biomasy poszczególnych roczników igieł w zależności od stopnia przebarwienia aparatu asymilacyjnego oraz takich parametrów jak: długość, liczba, sucha masa igieł, przyrost pędów na długość i szerokość. Istotną rolę w ocenie skutków okresu przebiegu epifitozy odgrywa analiza dendrochronologiczna przyrostów słoju rocznych. Uzyskane wyniki badań będą również pomocne w prognozowaniu przebiegu tej choroby w innych rejonach Tatr.

## 2. Metodyka badań

## 2.1. Prace terenowe

### 2.1.1. Analiza nasilenia symptomów chorobowych w terenie

Występowanie symptomów chorobowych oraz ich nasilenie analizowano głównie w Chochołowskim Obwodzie Ochronnym na obszarze leżącym pomiędzy Wołowcem i Grzesiem.

Analizę symptomów chorobowych przeprowadzono dwiema metodami: transektu oraz stałej powierzchni (kępy). Na każdej wybranej kępie transektu rozkładano taśmę i odczytano długość odcinka mierzonej kępy. Pędy które znalazły się w bezpośrednim kontakcie z taśmą wybrano do dalszych obserwacji. Badane pędy zakwalifikowano do odpowiedniej klasy według procentu przebarwienia igieł (Tab. 1).

Tab. 1. Klasyfikacja przebarwień igieł pędu

Klasa	Procent przebarwienia igieł
1	<5%
2	5-30%
3	31-70%
4	> 70%

Pomiar na stałych powierzchniach (kępach).

Nasilenia objawów chorobowych kosodrzewiny analizowano na 7 wybranych powierzchniach, na których prowadzono obserwacje w ubiegłych latach. Zlokalizowano je na różnych wysokościach n.p.m. i rozmieszczone zostały tak, aby możliwe było zbadanie wpływu nasilenia objawów chorobowych w zależności od tego parametru. Analizy prowadzono wewnątrz i na zewnątrz kępy. Przy obserwacjach uwzględniono również kierunek świata. Każda kępa została pomierzona na długość i szerokość (4 pomiary) i wewnątrz kępy (2 pomiary: północ - południe oraz zachód - wschód ), a następnie policzono liczbę pędów z przebarwionymi (zamarłymi) wierzchołkami zlokalizowanymi wzdłuż wyznaczonych boków na szerokości 1 m.

### 2.1.2. Pobór próbek do badań laboratoryjnych

W celu wykonania izolacji grzybów oraz oceny nasilenia przebarwień igieł oraz pomiaru parametrów igieł i pędów pobrano 35 pędów wierzchołkowych o długości 50 cm w różnym stopniu przebarwienia i defoliacji. Część pędów ( 9 szt.) zostało pobranych w latach

2018 i 2019 i były one przechowywane w zamrażarce. W ten sposób możliwe było prześledzenie charakteru symptomów występujących w poszczególnych latach. Do badań dendrochronologicznych pobrano również krążki z odziomka tych samych drzewek, z których pobierano pędy wierzchołkowe. Większość pędów zostało pobranych na stałych powierzchniach badawczych. Dla każdego pędu określono współrzędne geograficzne i wysokość n.p.m. Izolacje grzybów przeprowadzono dodatkowo z igieł pozyskanych z kosodrzewiny w latach 2018 i 2019.

## **2.2. Prace laboratoryjne**

### **2.2.1. Izolacje grzybów**

Celem stwierdzenia grzybów towarzyszących objawom chorobowym badano zarówno oznaki etiologiczne na nekrotycznych tkankach, jak również wykonywano izolacje z igieł. Ogółem izolacje grzybów wykonano z 300 igieł o różnych symptomach chorobowych. Po ich powierzchniowej dezynfekcji polegającej na płukaniu w 96% alkoholu etylowym (1min), 7 % NaOCL (0.5 min.) oraz ponownie w 96% alkoholu etylowym (0.5 min.), po czym igły osuszano w sterylnej bibule filtracyjnej.

Hodowlę kultur prowadzono w płytkach Petriego (9 cm średnicy) na pożywce maltozowej - malt extract agar (MEA; 20g/1 malt extract, Difco, Sparks, MD, USA; 15g/1 agar, Difco) Difco ) z dodatkiem 200mg/L tetracycliny (Tetracyclinum TZF Polfa, Poland). Obserwacje nad pojawem i formą strzępek kiełkowych prowadzono po 48 godzinach ( $T = 20^{\circ} C$ , w ciemności). Kultury grzybów były hodowane na pożywce MEA w ciemności przez 10 tygodni w temperaturze  $20^{\circ} C$ , i kontrolowane co 5 - 8 dni pod kątem pojawu zarodnikowania. Po stwierdzeniu, że w tych kulturach tworzą się mikrokonidia, określono czy wykazują one zdolność kiełkowania, jak w przypadku makrokonidiów, z tym że obserwacje prowadzono przez 5 dni.

Wyizolowane grzyby identyfikowano na podstawie zarodnikowania oraz innych cech morfologicznych, co dało podstawę do wyróżniania morfotypów. Następnie weryfikowano przynależność taksonomiczną morfotypów na podstawie badań molekularnych.

### **2.2.2. Analizy genetyczne**

W celu uzyskania sekwencji DNA przygotowywano trzy typy materiałów grzybowych: kultur hodowlanych na pożywkach MEA i PDA, fragmentów igieł z acervuli i konidii.

Zastosowano dwie procedury: procedura nr I dotyczyła próbek pobranych bezpośrednio z igieł a procedura nr II dotyczyła grzybni wyizolowanej z aparatu asymilacyjnego.

#### Procedura nr I

Wypreparowanie ok. 2 mm długości skrawka pojedynczej igły z owocnikiem i umieszczenie ich w pojedynczych probówkach mikrowirówkowych o pojemności 2 ml również z trzema kulkami ze stali nierdzewnej, a także ok. 0,2 cm<sup>3</sup> piasku wyflukanego wybielaczem. Zarówno grzybnia, jak i fragmenty igły następnie homogenizowano w młynku oscylacyjnym Retsch MM 200 (Retsch, Haan, Niemcy) przez trzy minuty przy 25 Hz. Całkowity genomowy DNA wyodrębniono z tych próbek stosując zmodyfikowaną metodę CTAB (Gawel & Jarret 1991) i 100-krotne rozcieńczone ekstrakty DNA (20-100 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) posłużyły jako matryce w reakcji PCR. Na niektórych igłach można było zaobserwować masę konidialną wyrastającą z owocników, która posłużyła do przygotowania trzeciego rodzaju próbek. W tej procedurze makrokonidia zostały zdyspergowane w małej kropli sterylnej wody umieszczonej bezpośrednio na acervulus pipetą Pasteura. Po kilku sekundach wodę niosącą rozproszone zarodniki zassano z powrotem do tej samej pipety i umieszczono na innym acervulus na tej samej igle. Po zebraniu konidiów ze wszystkich owocników tej samej igły zawiesinę konidiów przeniesiono do próbki mikrowirówkowej o pojemności 2 ml. DNA z konidiów ekstrahowano przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Yeast (A&A Biotechnologia, Gdynia, Polska) zgodnie z protokołami producenta, a jako szablony w PCR zastosowano nierozcieńczone ekstrakty DNA.

W naszych badaniach wykorzystaliśmy trzy sekwencje docelowe, wszystkie fragmenty klastra genów rRNA. Były to region ITS - startery ITS1F (Gardes & Bruns 1993) i ITS4 (White i wsp. 1990), fragment genu LSU (gen 28S rRNA) - startery LR5 i LR0R (Vilgalys & Hester 1990) oraz region IGS - startery IGS -12a i NS1R (Carbone & Kohn 1999). Wszystkie trzy fragmenty amplifikowano przy użyciu tej samej mieszaniny reakcyjnej i warunków cykli. Reakcję przeprowadzono w całkowitej objętości 50  $\mu$ l zawierającej: 1 x bufor DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM każdego dNTP, 0,08  $\mu$ M każdy starter i 1 u polimerazy DNA DreamTaq (Thermo Fisher Scientific). Amplifikacje prowadzono w termocyklerze T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) z 30 cyklami obejmującymi 30 s denaturację w 94 ° C, 30 s wyżarzanie w 48 ° C i 1 min wydłużanie w 72 ° C. Skuteczność PCR zweryfikowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, a pozytywne produkty amplifikacji oczyszczono za pomocą zestawu do oczyszczania Clean-Up DNA (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Dwukierunkowe sekwencjonowanie oczyszczonych produktów przeprowadzono z użyciem starterów PCR. Sekwencjonowanie

przeprowadzono za pomocą zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) na termocyklerze T100 (Bio-Rad) i analizatorze genetycznym 3500 Series (Life Technologies, USA) przy użyciu standardowych protokołów.

#### Procedura nr II

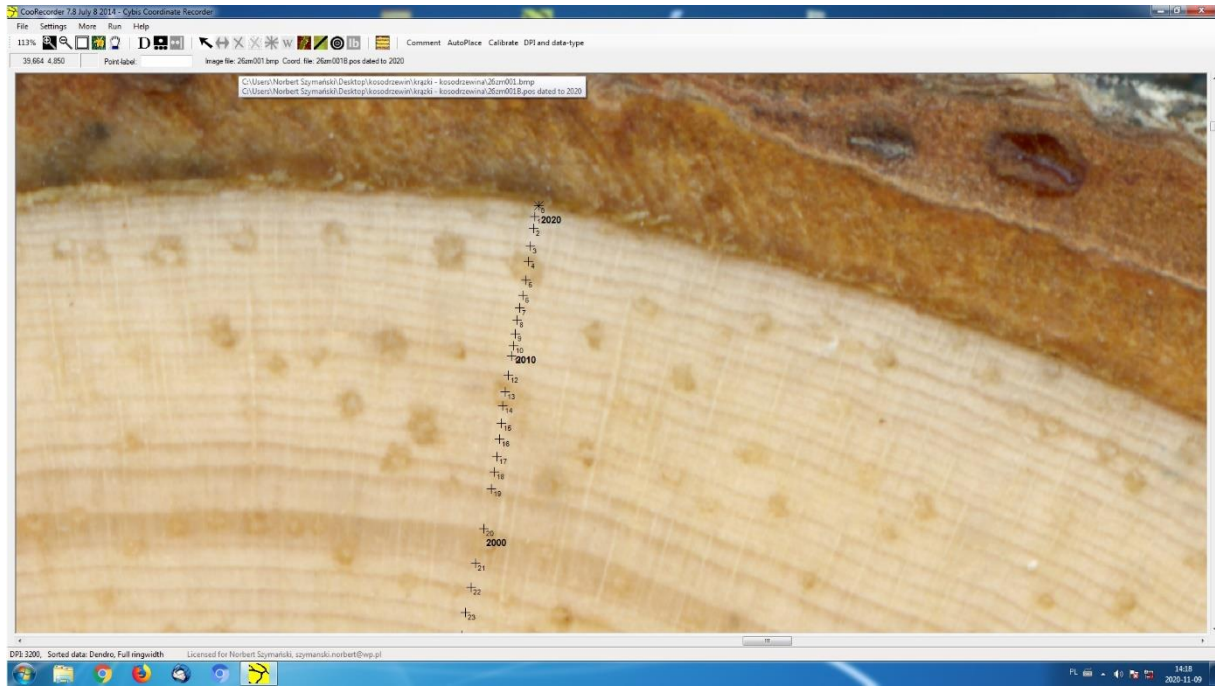
Identyfikację molekularną grzybów hodowanych na płytkach Petriego przeprowadzono na podstawie porównania sekwencji obszarów ITS rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), DNA ekstrahowano przy użyciu Genomic Mini AX Plant (A & A Biotechnology, Gdynia - Polska) przy użyciu protokołu producenta. Region ITS rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) amplifikowano za pomocą starterów : ITS4 (White i wsp. 1990) i ITS5 (White i wsp.1990) . Fragmenty genów amplifikowano w 25 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,25 µl polimerazy DNA Phusion High-Fidelity (Finnzymes, Espoo, Finlandia), 5 µl buforu PhusionHF (5x), 0,5 µl dNTP (10 mM), 0,75 µl DMSO (100%) i 0,5 µl każdego startera (25 µM ). Reakcje amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze Thermocycler Biometra T-Personal 48 (Biometra GmbH, Goettingen, Niemcy), z 35 cyklami obejmującymi: 30 sekund denaturacji w temperaturze 98 ° C, 10 s wyżarzanie w 56 ° C i 30 s wydłużanie 72 ° C. Produkty PCR wizualizowano w świetle UV na 2% żelu agarozowym barwionym Midori Green DNA Advance. Amplifikowane produkty sekwencjonowane były za pomocą BigDye Terminator v3.1 Cycle SequencingKit (AppliedBiosystems, FosterCity, CA, USA) , używając tych samych starterów, które zostały użyte do reakcji PCR. Otrzymane sekwencje DNA zostały przetworzone przy użyciu oprogramowania Chromas Pro 1.6 (Technelysium, Australia) i przyrównane w bazie danych NCBI GenBank za pomocą narzędzia BLAST do wyszukiwania najbardziej podobnych sekwencji.

#### **2.2.3. Badania wybranych parametrów pędów**

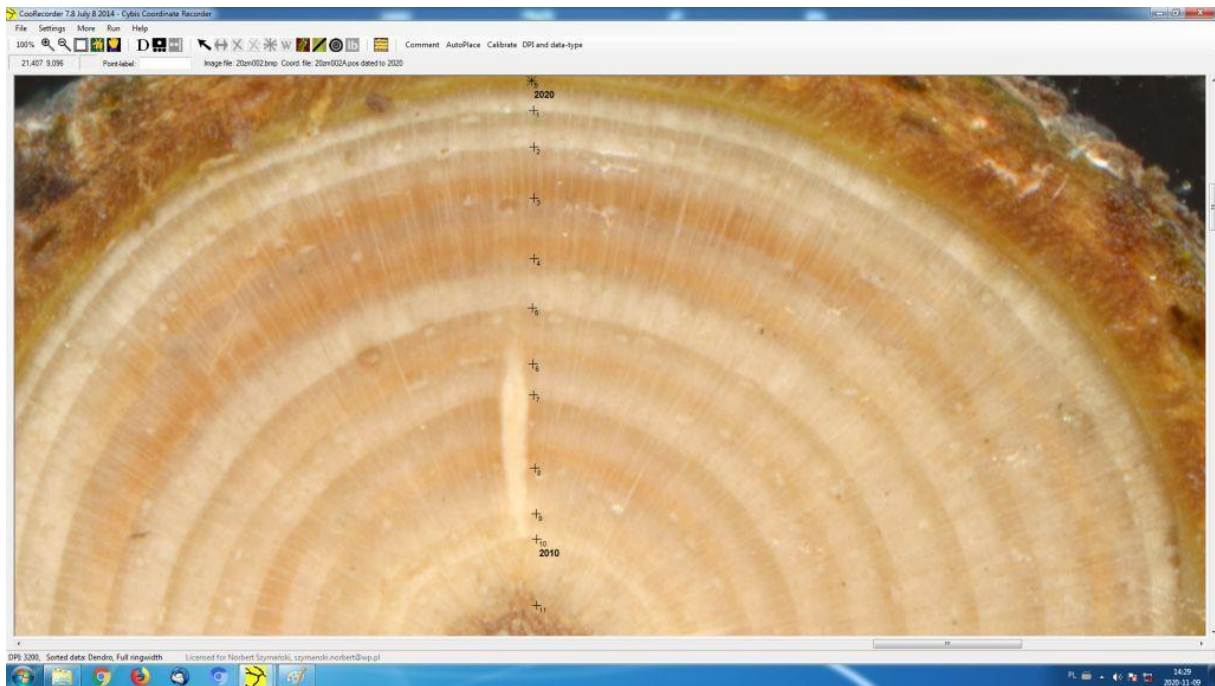
W badaniach wykorzystano 25 pędów wierzchołkowych (z 35 pobranych) każdy o długości 50 cm. Policzono wszystkie igły z uwzględnieniem typu i nasilenia przebarwień (do 50% i powyżej 50%), oddzielnie na pędzie głównym i pędach bocznych. Dla części pędów policzono również liczbę igieł dla poszczególnych roczników. Następnie pomierzono ich długość i po wysuszeniu w suszarce zważono w celu uzyskania suchej masy. Następnie policzono wszystkie pędy boczne i pomierzono ich długość i po ich wysuszeniu zważono je wraz z pędem głównym w celu uzyskania suchej masy.

#### **2.2.4. Analizy dendrochronologiczne**

Analiza szerokości przyrostów rocznych przeprowadzono na 35 krążkach kosodrzewiny pobranych z części odziomkowej drzewek oraz z 35 krążków pobranych na wysokości 50 cm na pędzie wierzchołkowym tych drzewek. Po wyszlifowaniu krążków zeskanowano je, a następnie dokonano pomiarów za pomocą programu CooRecorder 7.6 oraz CDendro 7.6. (Ryc. 1 i 2).



Ryc. 1. Fragment pomiaru przyrostów rocznych na krążku pobranego z drzewka kosodrzewiny.





Ryc. 2. Fragment pomiaru przyrostów rocznych na krążku pobranego z pędu wierzchołkowego kosodrzewiny (50 cm od wierzchołka).

### 3. Wyniki

#### 3.1. Charakterystyka objawów chorobowych i ich nasilenie

Analiza symptomów chorobowych na igłach *Pinus mugo* została przeprowadzona na transektach. (Ryc. 3). Liczba pędów z przebarwieniami na transektach wahała się od 10 do 28. W sumie przeanalizowano 335 pędów. Średnia liczba pędów na 1 m długości transektu wahała się od 0,8 do 1,7. Natomiast średni stopień przebarwienia igieł na tych pędach wyniósł 1,7 (38%) i wahał się od 1,2 (27%) do 2,8 (63%) (Tab. 2).



Ryc. 3. Lokalizacja transektów na których prowadzono analizę przerwienia igieł kosodrzewiny.

Tab. 2. Lokalizacja transektów oraz liczba i średni stopień przebarwienia pędów na poszczególnych transektach

Transekt	Współrzędne	Ekspozycj a stoku	Kierunek pomiaru	Długość transektu (m)	Wysokość (m n.p.m.)	Liczba pędów	Liczba pędów na 1 m	Średnia klasa przebarwie nia pędów



1	49°12'59.9"N 19°46'03.3"E	E	E	6,2	1623	10	1,6	1,3
2	49°12'54.2"N 19°46'00.4"E	E	E	22,8	1621	19	0,8	1,2
3	49°12'52.2"N 19°45'59.9"E	E	NW	30,2	1626	24	0,8	1,4
4	49°12'50.0"N 19°45'57.2"E	E	NW	20	1657	15	0,8	1,9
5	49°12'47.6"N 19°45'52.7"E	NE	NW	13,5	1701	13	1,0	2,5
6	49°12'46.9"N 19°45'51.8"E	NE	NW	24,3	1710	19	0,8	2,3
7	49°12'46.6"N 19°45'43.1"E	NE	S	13,4	1755	14	1,0	1,3
8	49°12'47.4"N 19°45'40.5"E	E	E	26,1	1774	27	1,0	1,7
9	49°12'51.9"N 19°45'42.2"E	E	S	20,3	1750	21	1,0	1,4
10	49°12'54.7"N 19°45'46.9"E	E	S	18,5	1706	22	1,2	1,2
11	49°12'58.4"N 19°45'49.4"E	E	E	21,8	1710	22	1,0	1,7
12	49°13'04.8"N 19°45'57.0"E	SE	N	18,1	1698	25	1,4	1,4
13	49°13'08.1"N 19°45'53.4"E	SE	E	14	1746	21	1,5	2
14	49°13'10.3"N 19°45'53.0"E	SE	N	9,8	1761	17	1,7	2,1
15	49°13'06.8"N 19°45'45.5"E	SE	SE	14,5	1772	18	1,2	1,9
16	49°13'01.5"N 19°45'39.7"E	E	W	30,3	1802	28	0,9	1,5
17	49°12'52.9"N 19°45'35.1"E	E	W	16,6	1831	20	1,2	2,8
Razem				320,4		335		
Średnia				18,8		19,7		1,7

Tab. 3. Wpływ ekspozycji terenu na nasilenie przebarwienia pędów

Ekspozycja terenu	Średnia klasa przebarwienia pędów
N	1,75
E	1,52
SE	1,9
S	1,3
W	2,15
NW	2,03

Ekspozycja terenu miała wpływ na stopień przebarwienia pędów. Silniejsze przebarwienie pędów stwierdzono w terenie z ekspozycją zachodnią i północno-zachodnią a najmniej z ekspozycją południową (Tab. 3). Można przypuszczać, że w tym przypadku na rozwój choroby może mieć wilgotność powietrza.

Na badanych transektach wraz z wysokością n.p.m. nieznacznie wzrastał stopień przebarwienia ale trend ten mógł być zakłócony np. z powodu ekspozycji terenu (Ryc. 4).



Ryc. 4. Wpływ wysokości n.p.m. na nasilenie przebarwienia pędów.

Na powierzchniach badawczych (kępach) głównym obserwowanym objawem były zamierające wierzchołki pędów (Fot. 1).

Liczba zamartwych wierzchołków pędów na poszczególnych powierzchniach badawczych wynosiła średnio 169,3 szt. i wahała się od 10 do 388 szt. Na zewnątrz kępy (4 pomiary) stwierdzono średnio 101,9 zamartwych wierzchołków pędów a wewnątrz kępy (2 pomiary) występowało średnio 67,4 pędów na kępę (Tab. 4). Jednak po przeliczeniu zamartwych pędów na 1 m długości średnia ich liczba wewnątrz kępy wynosiła 3,6 (od 0,2 do 7,4) a na zewnątrz średnio 2,4 (od 0,3 do 4,9).

Tab. 4. Lokalizacja powierzchni (kęp) oraz liczba i średni stopień zamierania wierzchołków pędów na poszczególnych powierzchniach.

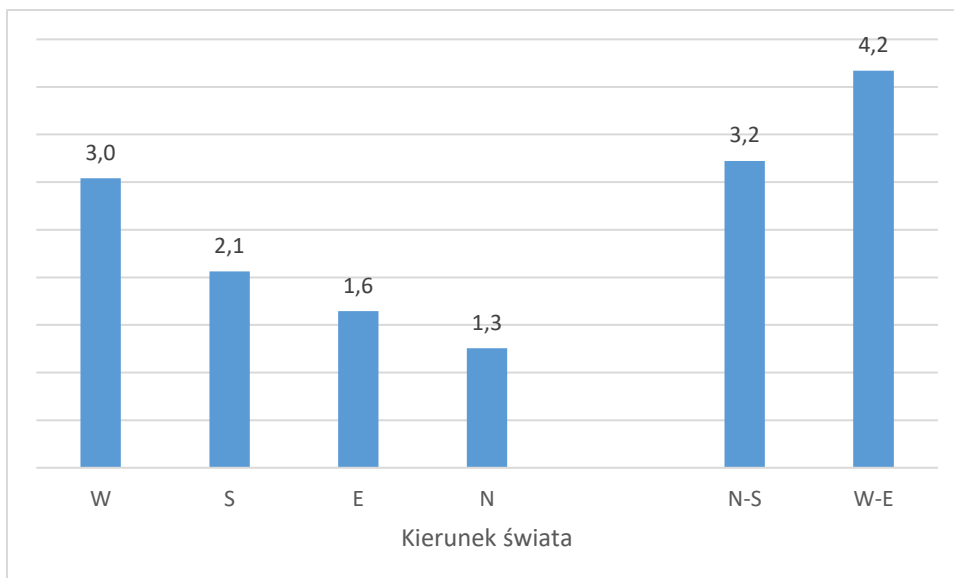
Numer powier zchni	Lokalizacj a	Wyso kość n.p.m.	Kierunek pomiaru na		Długość pomiaru (m)		Zamarłe wierzchołki pędów (szt.)			Liczba zamarłych wierzchołków pędów na 1m				
			Z	W	Z	W	Z	W	C	Z	W	C		
1	49°12'57" N 19°46'11" E	1556	płd- zach		19		36							
			płd- wsch		9		6							
			płn- wsch		11		6							
			płn- zach		9		26							
Razem					48	0	74	0	74	1,5		1,5		
2	49°12'59" N 19°46'08" E	1582	płd	płn- płd	13		11							
			wsch		11		12,2						9	10
			płn		10,5		12,4						8	13
			zach		12,5								13	
Razem					47	24,6	41	23	64	0,9	0,9	1,8		
3	49°13'03" N 19°46'05" E	1624	zach	płn- płd	10		32							
			płn		10,6		11,3						22	25
			wsch		10,3		10,3						18	28
			płd		10,5								24	
Razem					41,4	21,6	96	53	149	2,3	2,5	2,4		
4	49°13'05" N 19°46'00" E	1667	zach	płn- płd	9,8		26							
			płn		8,8		8,4						6	24
			wsch		8		8,6						19	36
			płd		7,7								15	
Razem					34,3	17	66	60	126	1,9	3,5	2,5		
5	49°13'08" N 19°45'55" E	1737	płd- wsch	płn- płd	10		54							
			płn- wsch		13,1		10,2						37	75
			płn		10		11,9						41	86
			zach		10								81	
Razem					43,1	22,1	213	161	374	4,9	7,3	5,7		
6	49°13'09" N 19°45'53" E	1746	wsch	płn- płd	10,8		41							
			płn		12,8		13,2						66	76
			płd- zach		10,2		9,9						26	96
			płd		11,3								83	
Razem					45,1	23,1	216	172	388	4,8	7,4	5,7		
7	49°13'50" N	1592	wsch	płn- płd	7,2		2							
			płn		5,7		5,9						3	2
			zach		5,6		6,4						2	1
									10	0,3	0,2	0,3		

	19°45'14" E		pld	zach- wsch	5,9		0				
Razem					24,4	12,3	7	3			
Objaśnienia: Z - na zewnątrz kępy, W – wewnątrz kępy, C - w całej kępie (suma Z+W)											



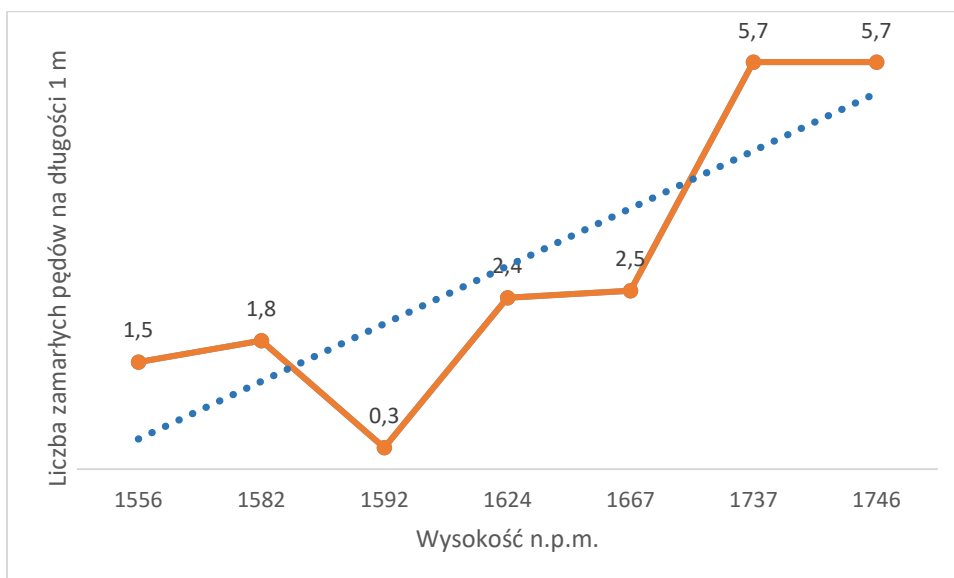
Fot. 1. Masowe zamieranie wierzchołków pędów w obrębie Dolina Chochołowska (Fot. C. Bartnik)

Na nasilenie zamierania wierzchołków pędów miał wpływ kierunek światła. Ponad dwukrotnie więcej stwierdzono zamierających pędów od strony zachodniej (średnio 3 sztuki na długości 1 m) w porównaniu do strony północnej (1,3 szt.) (Ryc.5). Również liczniej występowały zamierające pędy wewnątrz kępy na linii wschód – zachód (4,2 szt.) niż na linii północ-południe (3,2 szt.).



Ryc. 5. Średnia liczba zamarłych wierzchołków pędów na długości 1 m na 6 badanych kępach na zewnątrz kępy (kierunek W, S, E, N) i wewnątrz kępy (kierunek N-S i W-E).

Wraz ze wzrostem wysokości nad poziomem morza zwiększała się średnia liczba zamierających pędów od 0,3 na wysokości 1592 m do 5,7 na wysokości 1746 m (Ryc. 6). Niewielkie wahania w liczbie zamarłych pędów na niższych wysokościach mogły być spowodowane np. inną ekspozycją tych kęp.



Ryc. 6. Średnie nasilenie zamierania wierzchołków pędów na długości 1 m w zależności od wysokości n.p.m. w badanych kępach kosodrzewiny

### 3.2. Nasilenie przebarwienia igieł na długości 50 cm pędów wierzchołkowych kosodrzewiny

Najczęściej stwierdzanymi objawami na igłach była różna kombinacja przebarwień chlorotycznych, szarych, brązowych i żółtych. Ten typ przebarwień opisany jako "inne" występował na 57% igieł z przebarwieniami (Tab. 5). Średni udział igieł zielonych wynosił 41,6% i wahał się od 1,4 do 91,4% i podobnie zbliżony był udział suchej masy (44,1%). Z kolei średni udział procentowy igieł żółtych i brązowych wynosił odpowiednio 13,5 oraz 8%.

Tab. 5. Udział procentowy igieł według typów przebarwień.

Nr pędu	ZIELONE		JASNOZIELONE		BRAZOWE		ŻÓLTE		INNE	
	L [szt.]	S [g]	L [szt.]	S [g]	L [szt.]	S [g]	L [szt.]	S [g]	L [szt.]	S [g]
1	40,4						4,9		54,7	
2	13,6						29,9		56,4	
3	19,6						4,2		76,3	
4	1,4				0,7		20,3		77,7	
5	3,3						25,6		71,1	
6	3,7	3,2	9,2	9,7					87,1	87,1
7	42,0	35,6	6,1	4,3	1,7	1,1	0,1	0,9	50,2	58,1
8	44,9	39,1	4,4	3,2	2,0	1,4	0,1	0,3	48,7	56,0
9	47,8	42,0	9,0	8,5	1,2	1,3	14,1	16,2	27,9	32,0
10	53,9	47,1	1,2	1,6	0,4	0,5			44,4	50,8
11	22,9	19,2	18,8	16,5	7,5	11,1	24,1	22,2	26,7	31,0
12	56,2	45,4	10,0	5,7	2,5	2,7			31,3	46,2
13	79,6	81,6	17,6	16,1	1,2	0,9	1,6	1,4		
14	57,3	59,3	15,4	15,3	13,2	12,0	14,2	13,4		
15	65,9	68,2	9,5	9,4	7,7	6,5	17,0	15,9		
16	68,2	71,1	8,3	8,4	10,1	8,4	13,3	12,2		
17	34,7	38,6	15,4	16,7	11,5	9,0	38,4	35,7		
18	54,4	58,0	17,2	17,4	12,7	10,7	15,6	14,0		
19	91,4	91,6			3,3	2,8	5,3	5,6		
20	45,6	37,0			0,3	0,2			54,1	62,8
21	49,8	38,4	0,2	1,4	0,5	0,6			49,5	59,6
22	43,9	22,0			4,6	1,4			51,5	76,5
23	42,4	37,5			2,6	3,0			55,0	59,4
24	41,8	39,5			1,6	1,9			56,6	58,6
25	31,7	28,6	0,0	0,1	5,2	4,7			63,0	66,6
26	34,9	29,8	0,2	0,2	8,0	6,6			57,0	63,4
27	40,6	65,8			0,6	1,6			58,8	32,6
28	34,0	27,4			0,4	0,9			65,7	71,7
29	49,6	42,6	0,7	1,9	2,2	3,1			47,6	52,4
30	31,1	33,1	0,1	0,6	0,7	1,1	0,9	0,8	67,2	64,4
Średnia	41,6	44,1	8,0	7,6	4,1	3,9	13,5	11,5	55,6	57,2

Min.	1,4	3,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,3	26,7	31,0
Maks.	91,4	91,6	18,8	17,4	13,2	12,0	38,4	35,7	87,1	87,1

Objaśnienia: L – liczba igieł podwójnych, S – sucha masa igieł

Nasilenie przebarwienia igieł zależało od typu przebarwień. W przypadku igieł zbrązowiałych i z kategorii „Inne” było więcej (średnio 71% i 67%) z przebarwieniami powyżej 50% (Tab. 6).

Tab. 6. Nasilenie przebarwienia igieł na analizowanych pędach kosodrzewiny.

Nr pędu	JASNO ZIELONE			BRĄZOWE						ZÓŁTE						INNE					
	> 50			<= 50			> 50			<= 50			> 50			<= 50			> 50		
	L [szt]	D [cm]	Udział [%]	L [szt]	D [cm]	Udział [%]	L [szt]	D [cm]	Udział [%]	L [szt]	D [cm]	Udział [%]	L [szt]	D [cm]	Udział [%]	L [szt]	D [cm]	Udział [%]	L [szt]	D [cm]	Udział [%]
1										40	4,0	97,6	1	4,1	2,4	355	4,0	80,9	84	4,0	19,1
2										165	3,0	100,0			0,0	23	3,2	7,5	283	3,4	92,5
3										27	4,2	96,4	1	4,8	3,6	128	3,8	24,9	386	4,0	75,1
4				1	1,9	50,0	1	4,7	50,0	57	3,3	95,0	3	3,4	5,0	115	3,7	50,4	113	4,1	49,6
5										92	3,9	90,2	10	4,4	9,8	228	3,8	82,9	47	4,3	17,1
6	128	4,5	100,0													485	4,6	57,8	354	4,5	42,2
7	201	2,6	100,0	23	2,1	41,8	32	1,8	58,2	4	3,2	100,0			0,0	1359	3,6	81,6	306	3,5	18,4
8	247	3,2	100,0	80	3,6	71,4	32	2,6	28,6			0,0	5	2,3	100,0	2471	4,2	92,2	209	4,3	7,8
9	360	2,5	100,0	16	3,0	34,8	30	3,4	65,2	508	3,1	90,6	53	2,8	9,4	745	3,1	71,3	300	3,3	28,7
10	32	4,8	100,0			0,0	11	4,2	100,0							1065	5,0	96,1	43,5	4,7	3,9
11	307	3,2	100,0	85	3,8	69,1	38	3,9	30,9	257	3,7	65,4	136	3,5	34,6	128	3,9	50,0	128	4,0	50,0
12	297	2,2	100,0	74	2,5	100,0			0,0				5	3,2	100,0	806	4,2	98,2	15	3,4	1,8
13						0,0	7	3,4	100,0										1391	5,2	100,0
14	6	2,2	100,0			0,0	16,5	2,7	100,0										1692	3,2	100,0
15						0,0	101	4,6	100,0										1121	4,7	100,0
16						0,0	34,5	3,5	100,0										728	3,9	100,0
17						0,0	26	4,2	100,0										922	4,2	100,0
18	1	2,2	100,0			0,0	122	3,1	100,0										1469	3,3	100,0
19	4	2,9	100,0			0,0	168	3,3	100,0										1201	4,7	100,0
20						0,0	12,5	3,1	100,0										1296	3,1	100,0
21				7	3,4	56,0	5,5	3,4	44,0										2343	3,3	100,0
22	11	3,6	100,0	18	2,8	51,4	17	2,9	48,6										761	2,5	100,0
23	6	2,4	100,0	21,5	2,6	76,8	6,5	3,5	23,2				3	3,3	100,0				337	2,4	100,0
24	1	4,0	100,0	0		0,0	8	3,8	100,0				10	3,8	100,0				740	3,1	100,0
Średnia	123	3,1	100,0	33	2,9	29,0	37	3,4	71,0	144	3,6	81,7	23	3,6	38,7	659	3,9	66,2	678	3,8	66,9
Minnim.	1	2,2	100,0	0	1,9	0,0	1	1,8	0,0	4	3,0	0,0	1	2,3	0,0	23	3,1	7,5	15	2,4	1,8
Maksim.	360	4,8	100,0	85	3,8	100,0	168	4,7	100,0	508	4,2	100,0	136	4,8	100,0	2471	5,0	98,2	2343	5,2	100,0



### 3.3. Grzyby zasiedlające aparat asymilacyjny *Pinus mugo*

Szczegółowa analiza symptomów chorobowych na igłach pozwoliła na wyróżnienie następujących grup igieł według stanu zdrowotnego:

- A- Igły bez objawów chorobowych
- B- Igły z licznymi chlorotycznymi plamkami
- C- Igły z wyraźną brunatną plamą lub brunatną pasemkową nekrozą w różnych miejscach na igle, w szczególności kilkanaście milimetrów poniżej szczytu, powiązaną następnie z zamarciem szczytowej części igły
- D- Igły zamarte z pozostałą jedynie żywą częścią nasadową, o długości 0.7-1.5 cm
- E- Igły całkowicie obumarłe
- F- Igły zielone zamierające od ich nasady

Izolację grzybów przeprowadzono z 720 igieł (po ok. 120 igieł dla każdej z 6 wyodrębnionych powyżej grup). Ogółem wyizolowano z igieł 50 taksonów grzybów. Miejsce ich izolacji oraz częstotliwość wstępowania zamieszczono w tabeli nr 7.

Wstępne wyniki analiz mikologicznych pozwalają na następujące ustalenia.

#### A- Igły bez objawów chorobowych

W wyniku izolacji z 60 fragmentów igieł bez objawów chorobowych z 35 odcinków nie wyrosła żadna kolonia grzyba, natomiast z 13 odcinków otrzymano *Lophodermium conigenum*, oraz po jednej kolonii *Lophodermium* sp. oraz *Desmazierella acicola*. Grzyb ten występuje pospolicie na zamartwych igłach sosny pospolitej leżących w ściocie na dnie drzewostanów. Jest także częstym endofitem stwierdzanym w igłach *Pinus sylvestris*, a nawet w liściach różnych gatunków drzew liściastych. Z dodatkowej próby 60 fragmentów z bez symptomowych igieł wyizolowano jedynie *Nemania serpens* (2 fragm.) oraz trzykrotnie *Leptomelanconium allescheri*. Trudno określić czy grzyb ten może dłuższy okres utrzymywać się w fazie latentnej jako endofit, czy został wyizolowany w okresie gdy znajdował się w fazie inkubacji, która w przypadku patogenów rozpoczyna się po pozytywnej infekcji. Pozostałe fragmenty były sterylne.

#### B- Igły z licznymi chlorotycznymi plamkami

W miejscach chlorotycznych plamek na żywych igłach brak było owocników grzybów.

Na podstawie izolacji z 60 fragmentów igieł ustalono, że z 31 odcinków nie wyrosła żadna kolonia grzyba, natomiast z pozostałych odcinków najczęściej izolowano *Lophodermium conigenum*, *Hendersonia pinicola*, *Sclerophoma pythiophila* (teleomorpha - *Sydowia polyspora*). Z kolejnej próby izolacji z 60 fragmentów igieł z takimi objawami uzyskano: *Lophodermium* sp.1 (29 fragm.) *Lophodermium* sp. 2 (4 fragm.), *Fimetariella rabenhorstii* (1fragm.), *Cenangium ferruginosum* (2 fragm.).

C- Igiły z wyraźną brunatną plamą lub brunatna pasemkowata nekrozą w różnych miejscach na igle, w szczególności kilkanaście milimetrów poniżej szczytu, powiązaną następnie z zamarciem szczytowej części igły.

Z tym symptomem najczęściej związany był grzyb *Leptomelanconium allescheri*. Jest to jeden z ważnych grzybów patogenicznych *Pinus mugo*, który dotychczas w Polsce nie był odnotowywany, dlatego poświęcono temu gatunkowi więcej uwagi. Był stwierdzony natomiast w Austrii, Czechach, Słowacji, w Niemczech, Węgrzech i Kanadzie. Cechuje się on stosunkowo wąskim zakresem roślin gospodarzy. W Europie odnotowany był tylko na *P. mugo*/*P. pumilio* natomiast w Kanadzie na *P. mugo*, *P. albicaulis* i *P. monticola*. Dla żadnego gatunku z rodzaju *Leptomelanconium* nie jest znane stadium teleomorficzne, uznaje się je za anamorficzne grzyby workowe (Ascomycota). Konidiomata tego gatunku były obecne głównie na ubiegłorocznych igłach, tylko rzadko występowały na igłach starszych *P. mugo*. Najczęściej cały nekrotyczny odcinek wykazywał jednolite jasnosłomkowe przebarwienie, zaś na pograniczu z nasadową zieloną częścią, był 1-2 mm szeroki pasek rdzawobrunatny. Konidiomata były szczególnie dobrze widoczne po umieszczeniu igły na kilka godzin w wilgotnych warunkach. Macroconidia posiadały wymiary 8-13 x 3.2 -5.0 µm, były 1-komórkowe, sporadycznie z jedną przegrodą oliwkowobrunatne, o ścianie brodawkowatej. Po 6 do 8 tygodniach zaczyna się pojawiać sporulacja także w kulturach in vitro, w których oprócz makrokonidiów wytwarzane są także mikrokonidia (Fot. 2).

D- Igiły zamarałe z pozostałą jedynie żywą częścią nasadową, o długości 0.7-1.5 cm

Był to najczęstszy symptom choroby obserwowany na analizowanych igłach. Na igłach takich stwierdzano głównie hysteroecja grzyba z rodziny *Rhytismataceae*, z maczugowatymi askosporami otoczonymi śluzem, który po ich wyrzucie w wilgotnych

warunkach ułatwia adhezję zarodników na powierzchni zdrowych igieł. Drugim gatunkiem często występującym na takich igłach była *Hendersonia pinicola*.

Tab. 7. Skład gatunkowy grzybów zasiedlających igły kosodrzewiny z różnymi symptomami oraz ich częstotliwość występowania i stanowisko troficzne.

Lp.	Nazwa grzyba	Stanowisko troficzne	Typ symptomu	% zasiedlonych igieł	Nr dostępu w GenBank
1	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl	S	E	8	MH384939.1
2	<i>Alternaria caespitosa</i> (de Hoog & C. Rubio) Woudenb. & Crous	S	E	2	MH861255.1
3	<i>Alternaria chartarum</i> Preuss	S	E	2	MH430101.1
4	<i>Alternaria infectoria</i> E.G. Simmons	S?	D, E	12	MK460954.1
5	<i>Alternaria</i> sp.		E	5	MG020276.1
6	<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	S	B, E	6	MT573466.1
7	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud	S	D, E	2	JX462671.1
8	<i>Biscogniauxia nummularia</i> (Bull.) Kuntze	S	D	2	MH860015.1
9	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	P	B	2	KP050616.1
10	<i>Cadophora</i> sp.		B	3	JF327416.1
11	<i>Cenangium acuum</i> Cooke & Peck	End	B, D	4/3	LT158439.1
12	<i>Cenangium ferruginosum</i> Fr.	End/P	B	3	LT158467.1
13	<i>Cladosporium allicinum</i> (Fr.) Bensch, U. Braun & Crous	S	B	1	KP701895.1
14	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	S	E	30	KU314943.1
15	<i>Cladosporium cucumerinum</i> Ellis & Arthur	S	E	2	KF156302.1
16	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	S	E	10	LN808882.1
17	<i>Cladosporium sinuosum</i> K. Schub., C.F. Hill, Crous & U. Braun	S	E	2	MH863128.1
18	<i>Cladosporium</i> sp.		D, E	5/8	KT898724.1
19	<i>Coleosporium campanulae</i> (Pers.) Tul.	P	B	7	KP017555.1
20	<i>Coniochaeta</i> sp.		E	2	JN225913.1

21	<i>Davidiella</i> sp.		D	2	KP714607.1
22	<i>Desmazierella acicola</i> Lib.	S	A, D	2	MT790315.1
23	<i>Dinemasporium sasae</i> A. Hashim., Sat. Hatak. & Kaz. Tanaka	?	D	2	NR_155038.1
24	<i>Dothideomyces</i>		D	3	KY436101.1
25	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	S	A, D	4/3	MH861752.1
26	<i>Fimetariella rabenhorstii</i> (Niessl) N. Lundq.	End	B	1,5	JX421715.1
27	<i>Hendersonia pinicola</i> Wehm.	End?	B, D, E	30/55/32	KT000192.1
28	<i>Herpotrichia</i> sp.	P	E	3	KT581851.1
29	<i>Hormonema</i> sp.		E	4	KP714567.1
30	<i>Lachnellula calyciformis</i> (Batsch) Dharne	S?	D	2	MH858771.1
31	<i>Lachnellula subtilissima</i> (Cooke) Dennis	S?	D	2	MH752069.1
32	<i>Leotiomyces</i> sp.		D	3	KP990974.1
33	<i>Leptomelanconium allescheri</i> (Schnabl) Petr.	P	A, C, E	5/82/	MF573935.1
34	<i>Lophodermium conigenum</i> (Brunaud) Hilitzer	P	A, B, E	26/22/26	KY742578.1
35	<i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad.) Chevall.	S	E	5	FN868464.1
36	<i>Lophodermium</i> sp. 1	P	A, B	2/48	LM654180.1
37	<i>Lophodermium</i> sp. 2	P	B, E	7/28	HG939564.1
38	<i>Massarinaceae</i>		E	2	KJ486534.1
39	<i>Mollisia rosae</i> (Pers.) P. Karst.	S	E	2	MH860088.1
40	<i>Mycosphaerella tassiana</i> (De Not.) Johanson	?	D	3	HG935310.1
41	<i>Nemania serpens</i> (Pers.) Gray	S?	A, E	3/26	KU141386.1
42	<i>Parastagonospora avenae</i> (A.B. Frank) Quaedvl., Verkley & Crous	?	B	3	LT603040.1
43	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson	?	D	3	MN547378.1
44	<i>Pezizomyces</i>		B	2	GQ153137.1
45	<i>Phaeosphaeria</i> sp.		B	4	EF432300.1
46	<i>Phialocephala</i> sp.		B	2	FR774054.1
47	<i>Rhytismataceae</i>	P	D	85	KF889704.1
48	<i>Sydowia polyspora</i> (Bref. & Tavel) E. Müll.	End/P	B, F	22/58	JN944640.1

49	<i>Trichoderma lixii</i> (Pat.) P. Chaverri	S	E	3	KU934235.1
50	Uncultured fungus		B,C,E	3/5/2/6	JF300529.1
<p>Objaśnienia: A - igły bez objawów chorobowych, B - igły z licznymi chlorotycznymi plamkami, C - igły z wyraźną brunatną plamą lub brunatną pasemkowatą nekrozą w różnych miejscach na igle, w szczególności kilkanaście milimetrów poniżej szczytu, powiazaną następnie z zamarciem szczytowej części igły, D - igły zamarte z pozostałą jedynie żywą częścią nasadową, o długości 0.7-1.5 cm, E - igły całkowicie obumarłe, F - igły zielone zamierające od ich nasady, S – saprotrof, P – patogen, End – endofit,</p>					

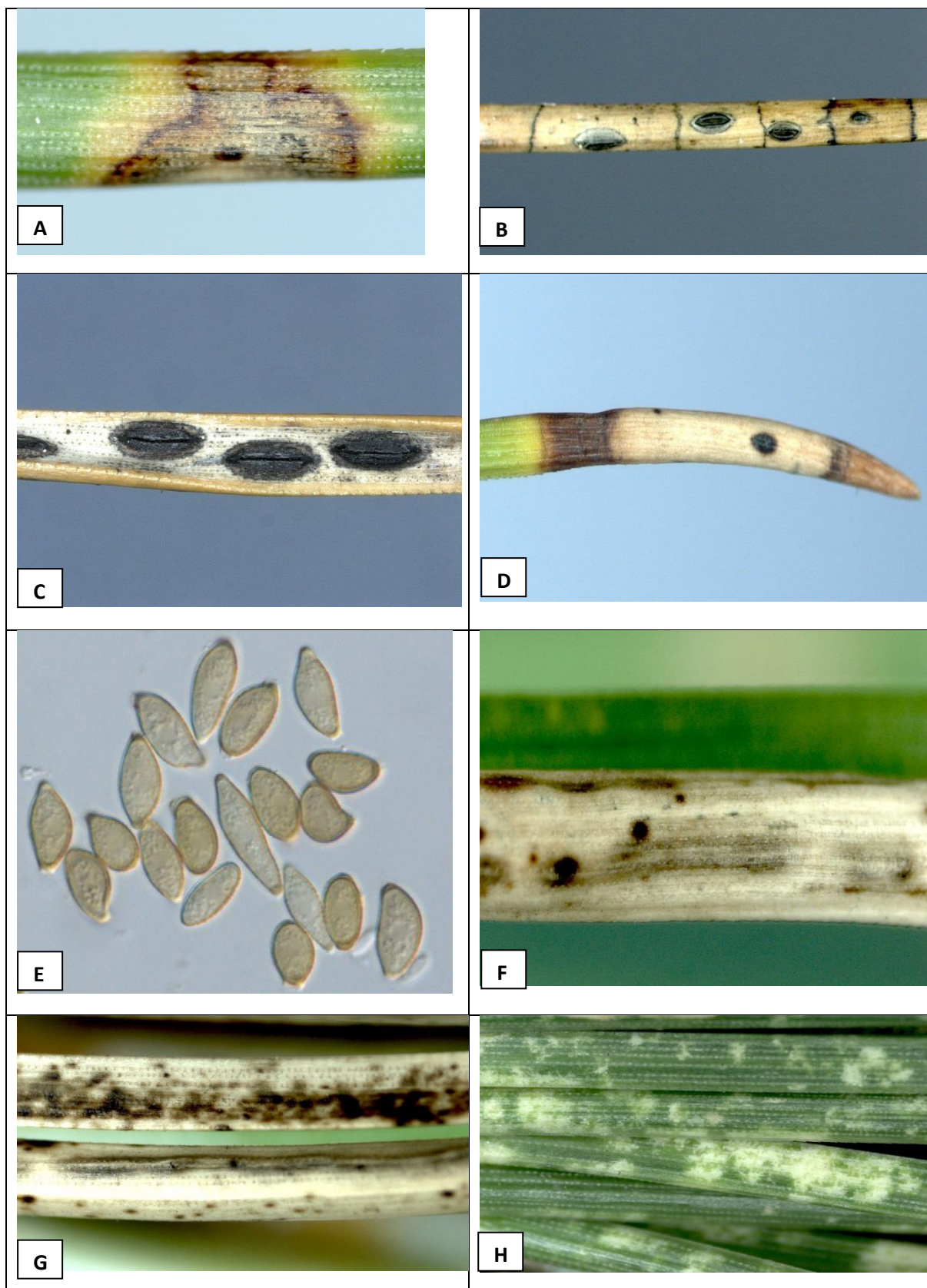
#### E- Igły całkowicie obumarłe

Na zamartych igłach stwierdzano głównie owocniki *Lophodermium conigenum*, *Lophodermium* sp., *Leptomelanconium allescheri*, *Hendersonia pinicola*.

Ze 120 fragmentów igieł (Dolina Goryczkowa), z których wykonano izolacje najczęściej otrzymano: *Lophodermium conigenum*, *Lophodermium* sp. oraz *Hendersonia pinicola*, co wskazuje na znaczny stopień zgodności wyników izolacji z pojawem oznak etiologicznych. Z 60 fragmentów pobranych z takich igieł z Doliny Chochołowskiej (pod Wołowcem) dodatkowo izolowano *Cladosporium cladosporioides* oraz *Nemania serpens*.

#### F - Igły zielone zamierające od ich nasady

Objaw taki jest charakterystyczny dla sytuacji gdy pierwotnym objawem jest zamieranie pędów, a igły zamierają wtórnie w efekcie nekrozy miazgi. Z 60 fragmentów takich igieł wyłożonych na pożywkę izolowano jedynie *Sclerophoma pythiophila* (teleomorph- *Sydowia polyspora*).



Fot. 2. Oznaki etiologiczne i symptomy chorobowe występujące na igłach kosodrzewiny: A – *Leptostroma* (anamorfa *Lophodermium* sp.), B – *Lophodermium* sp. 1, C – apotecja *Lophodermium conigenum*, D - conidiomata *Leptomelanconium allescheri*, E – makrokonidia *Leptomelanconium allescheri*, F – conidiomata *Hendersonia pinicola*, G – hysterootecja grzyba z rodziny *Rhytismataceae*, H – chlorotyczne plamki pochodzenia abiotycznego (Fot. T. Kowalski)





Fot. 3. Zamieranie pierwszego rocznika igieł kosodrzewiny spowodowane przez patogena z rodziny *Rhytismataceae* (fot. C. Bartnik).

### **3.4. Wpływ grzybów powodujących chorobę aparatu asymilacyjnego na wybrane parametry kosodrzewiny**

#### **3.4.1. Liczba, długość i sucha masa igieł**

Liczba igieł na pędzie głównym i bocznym ulegała bardzo silnym wahaniom i wynosiła średnio 3252 i wahała się od 1100 do 8428 szt. (Tab. 8). Średnia długość igieł na pędzie głównym była 10% wyższa niż na pędzie bocznym i wynosiła 4 cm. Również sucha masa igieł w przeliczeniu na 1 igłę podwójną ulegała silnym wahaniom na poszczególnych pędach i wynosiła średnio na pędzie głównym 0,031g/szt. a na pędach bocznych 0,023g/szt.



Tab. 8. Charakterystyka parametrów igieł na pędach głównych i bocznych.

Nr pędu	PĘD GŁÓWNY					PĘDY BOCZNE					PĘD GŁÓWNY +PĘDY BOCZNE				
	L [szt.]	D [cm]	OD. ST.	S [g]	S/L [g/szt.]	L [szt.]	D [cm]	OD. ST.	S [g]	S/L [g/szt.]	L [szt.]	D [cm]	OD. ST.	S [g]	S/L [g/szt.]
1	463	4,6	0,15	17,46	0,038	741	4,6	0,24	23,66	0,032	1203	4,6	0,20	41,121	0,024
2	254	2,9	0,91	5,81	0,023	3066	2,9	0,51	48,77	0,016	3320	2,9	0,71	54,579	0,019
3	18	4,3	0,17	0,82	0,046	5610	3,2	0,60	143	0,025	5628	3,8	0,38	143,84	0,035
4	37	3,3	0,68	1,01	0,027	3910	2,9	0,14	64,41	0,016	3947	3,1	0,41	65,421	0,021
5	215	4,5	0,52	9,86	0,046	2354	4,6	0,44	83,74	0,036	2568	4,6	0,48	93,602	0,041
6	282	3,8	0,65	6,81	0,024	1263	3,1	0,52	19,77	0,016	1544	3,4	0,58	26,578	0,020
7	337	3,6	0,63	5,92	0,018	2634	3,2	0,61	46,3	0,018	2971	3,4	0,62	52,217	0,018
8	559	5,1	0,53	15,79	0,028	3226	4,6	0,66	63,72	0,020	4803	4,8	0,60	95,8	0,020
9	581	4,1	0,97	10,99	0,019	6972	4,1	0,70	111,7	0,016	8428	4,2	0,83	133,78	0,016
10	574	4,5	0,47	9,69	0,017	5687	4,4	0,77	103,6	0,018	6823	4,3	0,62	119,07	0,014
11	835	3,9	0,85	14,13	0,017	2730	3,6	0,59	53,32	0,020	5319	3,8	0,72	91,22	0,017
12	323	4,8	0,66	6,91	0,021	1681	4,7	0,88	46,8	0,028	3150	4,8	0,77	69,97	0,018
13	439	4,3	0,72	10,07	0,023	3339	4,3	0,74	52,33	0,016	4500	4,3	0,73	72,52	0,020
14	343	3,6	0,18	4,70	0,014	2725	2,7	0,73	59,15	0,022	3068	3,1	0,45	63,85	0,013
15	534	5,1	0,84	22,90	0,043	2038	4,1	0,69	56,75	0,028	2572	4,6	0,77	79,647	0,035
16	444	3,1	0,36	10,38	0,023	2972	2,4	2,54	37,33	0,013	3416	2,8	1,45	47,714	0,014
17	637	5,0	0,71	33,75	0,053	1540	4,2	1,00	81,42	0,053	2178	4,6	0,86	115,16	0,041
18	44	4,2	0,36	4,50	0,102	1280	3,3	0,73	23,97	0,019	1324	3,7	0,55	28,461	0,053
19	364	4,4	0,57	13,77	0,038	1264	3,9	0,70	53,62	0,042	1629	4,2	0,64	67,389	0,031
20	160	3,7	0,38	4,76	0,030	2170	2,7	0,69	43,58	0,020	2330	3,2	0,53	48,343	0,021
21	515	4,5	0,81	20,87	0,041	1593	3,6	2,20	44,6	0,028	2108	4,0	1,51	65,466	0,031
22	262	3,5	0,60	7,47	0,029	1941	2,9	0,98	14,81	0,008	2203	3,2	0,79	22,278	0,021
23	402	2,9	0,70	3,50	0,009	3165	3,1	1,15	67,79	0,021	3567	3,0	0,92	71,286	0,010
24	17	2,9	0,68	0,33	0,019	1583	2,9	0,99	19,73	0,012	1600	2,9	0,84	20,051	0,013
25	329	3,8	0,76	9,58	0,029	771	3,6	1,29	16,65	0,022	1100	3,7	1,02	26,231	0,022
Śred.	359	4,0	0,60	10,071	0,031	2650	3,6	0,84	55,221	0,023	3252	3,8	0,72	68,624	0,023
Min.	17	2,9	0,15	0,325	0,009	740,5	2,4	0,14	14,810	0,008	1100	2,8	0,20	20,051	0,010
Maks	835	5,1	0,97	33,746	0,102	6972	4,7	2,54	143,020	0,053	8428	4,8	1,51	143,839	0,053

Objaśnienia: L - liczba igieł, D - długość igieł, S - sucha masa igieł

Istotną korelację stwierdzono pomiędzy liczbą i długością igieł a ich suchą masą (Tab.9).

Natomiast nie stwierdzono korelacji pomiędzy długością igieł a ich liczbą.

Tab.9. Wartość współczynnik korelacji r dla wybranych parametrów igieł na pędach głównych i bocznych.

Parametry	Pęd		
	główny	boczny	główny +boczny
L/D	0,399	0,035	-0,047
L/S	0,720	0,808	0,771
L/(L/S)	-0,281	-0,299	-0,335
D/(S/L)	0,413	0,517	0,414
D/S	0,659	0,282	0,498
D/L	x	0,035	x

Objaśnienia: skrótów jak w tab. 8

U igieł przebarwionych ich średnia sucha masa była większa w porównaniu z igłami zielonymi (Tab. 10). Dotyczyło to zarówno igieł z słabszym i silniejszym przebarwieniem.

Tab. 10. Wpływ przebarwienia igieł na ich suchą masę.

Nr pędu	ZIELONE	JASNO ZIELONE		BRAZOWE				ŻÓLTE				INNE			
		> 50		<= 50		> 50		<= 50		> 50		<= 50		> 50	
		S/L	%*	S/L	%	S/L	%	S/L	%	S/L	%	S/L	%	S/L	%
1	0,029	0,035	121,8									0,0342	117,3	0,036	124,8
2	0,014	0,012	83,7	0,009	66,0	0,013	90,6	0,0158	112,2			0,0185	132,1	0,022	157,0
3	0,022	0,019	85,4	0,019	85,7	0,015	68,8			0,017	78,2	0,0292	131,0	0,036	163,4
4	0,014	0,015	107,0	0,018	125,0	0,018	126,5	0,0198	136,7	0,02	136,8	0,0178	123,0	0,022	155,3
5	0,032	0,048	152,4			0,039	124,3					0,0422	133,0	0,041	128,2
6	0,014	0,015	105,2	0,024	175,4	0,024	176,7	0,0196	142,4	0,013	96,9	0,022	159,8	0,024	171,9
7	0,014	0,01	70,7	0,019	134,4					0,019	132,4	0,0273	192,0	0,024	166,2
8	0,022													0,036	167,0
9	0,017													0,017	99,9
10	0,019													0,079	419,6
11	0,020													0,023	117,9
12	0,030													0,043	143,5
13	0,018	0,061	346,9											0,022	124,7
14	0,021	0,038	183,3											0,035	165,6
15	0,025													0,006	22,3
16	0,019			0,031										0,022	114,8
17	0,039	0,035	88,3	0,016										0,014	35,3
18	0,025	0,015	59,0							0,022	86,2			0,023	89,9
Średnia	0,022	0,028	127,6	0,020	117,3	0,022	117,4	0,018	130,4	0,018	106,1	0,027	141,2	0,029	142,6
Minnim.	0,014	0,010	59,0	0,009	66,0	0,013	68,8	0,016	112,2	0,013	78,2	0,018	117,3	0,006	22,3
Maksim.	0,039	0,061	346,9	0,031	175,4	0,039	176,7	0,020	142,4	0,022	136,8	0,042	192,0	0,079	419,6

Objaśnienie: % obliczony w stosunku do suchej masy igieł zielonych, S/L - sucha masa 1 igły podwójnej

### 3.4.2. Liczba, długość i sucha masa pędów

Liczba pędów bocznych wynosiła średnio 12 sztuk i wahała się od 4 do 23, a ich długość wynosiła średnio 209 cm (od 75 do 422 cm) (Tab. 11). Tak duże różnice wskazują na silnie niekorzystne oddziaływanie określonych czynników środowiska.

Tab. 11. Charakterystyka parametrów pędów głównych i bocznych (bez igieł).

Nr pędu	PĘD GŁÓWNY				PĘDY BOCZNE				PĘD GŁÓWNY + PĘDY BOCZNE			
	D [cm]	Ś [cm]	S [g]	S/D	L [szt.]	D [cm]	S [g]	S/D	L [szt.]	D [cm]	S [g]	S/D
1	44	11	20,71	0,47	10	121,3	12,29	0,10	11	165,3	32,998	0,20
2	50	19	39,32	0,79	14	365,4	50,09	0,14	15	415,4	89,404	0,22
3	50	26	82,02	1,64	16	422,5	126,54	0,30	17	472,5	208,563	0,44
4	50	21	57,02	1,14	23	137,5	72,34	0,53	24	187,5	129,357	0,69
5	50	25	58,41	1,17	12	329,2	59,62	0,18	13	379,2	118,023	0,31
6	50	13	24,79	0,50	16	131,1	13,22	0,10	17	181,1	38,008	0,21
7	50	19,3	30,42	0,61	9	318,7	35,01	0,11	10	368,7	65,438	0,18
8	50	19	28,01	0,56	10	173,9	19,10	0,11	11	223,9	47,115	0,21
9	50	12	28,63	0,57	17	289,8	25,37	0,09	18	339,8	53,997	0,16
10	50	16	32,43	0,65	10	133,1	26,53	0,20	11	183,1	58,957	0,32
11	50	13	33,74	0,67	9	84,4	36,85	0,44	9	134,4	70,589	0,53
12	50	16	23,65	0,47	11	121,7	27,52	0,23	12	171,7	51,173	0,30
13	50	12	30,6	0,61	13	264,9	33,56	0,13	13	314,9	64,157	0,20
14	50	16	32,62	0,65	12	175	30,14	0,17	12	225	62,761	0,28
15	50	10	22,65	0,45	10	176,3	16,47	0,09	10	226,3	39,111	0,17
16	50	18	33,23	0,66	16	225,5	35,39	0,16	17	275,5	68,617	0,25
17	50	18	40,2	0,80	10	214,2	26,70	0,12	11	264,2	66,896	0,25
18	50	12	21,08	0,42	4	75	9,77	0,13	4	125	30,849	0,25
Średnia	49,7	16,5	35,53	0,71	12,3	208,9	36,472	0,18	13,1	258,528	72,001	0,29
Min.	44	10,0	20,71	0,42	4,0	75	9,771	0,09	4,0	125,000	30,849	0,16
Maks.	50	26,0	82,02	1,64	23,0	422,5	126,544	0,53	24,0	472,500	208,563	0,69

Stwierdzono istotną zależność pomiędzy długością pędu i liczbą pędów a ich suchą masą (Tab. 12).

Tab. 12. Wartość współczynnik korelacji r dla wybranych parametrów pędów.

Parametry	Pęd	
	boczny	główny +boczny
D/S.	0,641	0,638
L/D	0,310	0,331
L/S	0,512	0,514
L/(S/D)	0,413	0,408

### 3.4.3. Przyrost roczny pędów na grubość i wysokość

Przeprowadzone pomiary parametrów dla 35 drzewek i 35 pędów kosodrzewiny przedstawiono w tabeli nr 13. Średni roczny przyrost na grubość drzewek wynosił 0,74 mm i był o 16% wyższy niż przyrost pędów wierzchołkowych. Stosunkowo niewielki błąd standardowy (23,8%) wskazuje, że warunków rozwoju dla tych drzewek były stosunkowo podobne. Natomiast przyrost radialny pędów wierzchołkowych podlegał znacznie silniejszym wahaniom (błąd standardowy wynosi 39%) co wskazuje (po uwzględnieniu wieku pędów), że wystąpiły w ostatnich latach czynniki zakłócające ich wzrost.

Tab. 13. Średnie parametry przyrostu radialnego (na szerokość) i na długość oraz wiek 35 drzewek i 35 pędów.

Typ parametru	Średnia	Minimum	Maksimum	Błąd standardowy
Przyrost radialny drzewek na rok [mm]	0,74	0,53	1,45	23,82
Przyrost radialny pędów na rok [mm]	0,62	0,26	1,21	39,02
Przyrost radialny drzewek (od 2001 do 2010)	0,78	0,34	1,66	34,74
Przyrost radialny drzewek (od 2011 do 2020)	0,64	0,23	1,40	45,44
Przyrost radialny drzewek (od 2016 do 2020)	0,58	0,32	1,26	34,73
Przyrost radialny pędów (2001 -2010)	0,53	0,29	0,78	30,56
Przyrost radialny pędów (2011 -2020)	0,60	0,21	1,21	41,88
Średnia długość drzewek [cm]	195,2	120,0	281,0	
Średnia długość pędów [cm]	50,0	50,0	50,0	
Przyrost na długość drzewek na rok [cm]	5,6	1,9	11,5	46,35
Przyrost na długość pędów na rok [cm]	5,3	2,2	10,0	41,49
Wiek drzewek	38,0	17,0	63,0	

Wiek pędów (o długości 50 cm)	11,2	5,0	23,0	
-------------------------------	------	-----	------	--

Przyrost radialny drzewek zmniejszał się wraz z ich wiekiem średnio o 18% z 0,78 mm w latach 2001-2010 do 0,64 mm w latach 2011-2020. Natomiast odwrotnie było w przypadku przyrostu na grubość pędów w tym okresie, ponieważ wzrósł on średnio o 12% z 0,53 mm do 0,60 mm. Spowodowane to było, że pędy wolniej przyrastające na długość miały również mniejsze przyrosty na grubość.

Średni przyrost drzewek na długość w ciągu roku była stosunkowo niska i wynosiła 5,3 cm i wahając się od 1,9 cm do 11,5 cm. Bardzo podobnie wyglądało to w przypadku pędów wierzchołkowych, gdzie średnia ich długość na rok wynosiła 5,3 cm.

Wiek badanych drzewek wynosił średnio 38 lat i wahał się od 17 do 63 lat. Natomiast w przypadku pędów ich wzrost do 50 cm trwał średnio 11 lat, przy czym u najbardziej żywotnych pędów ten okres trwał tylko 5 lat, a na silnie osłabionych drzewkach aż 23 lata.

### 3.5. Dynamika zmian w epifitozie choroby aparatu asymilacyjnego

Analiza przyrostów rocznych drzewek przez ostatnie 12 lat (od roku 2009 do 2020) wskazuje, że masowy spadek przyrostów rocznych wystąpił dwukrotnie, pierwszy- słabszy tylko w 2010 roku (u 11,8 % badanych drzewek) i drugi, silniejszy trwający 3 lata (od 2016 do 2018 r.) (Tab. 14) (Fot. 4). W przypadku pędów wierzchołkowych przez ostatnie 11 lat (od roku 2010 do 2020 r.) masowy spadek przyrostów rocznych wystąpił trzykrotnie, pierwszy- słabszy tylko w 2014 roku (u 14,3 % badanych drzewek) i drugi, silniejszy trwający 3 lata (od 2016 do 2018 r.) i trzeci w 2014 r. z udziałem 14,3%.

Tab. 14. Liczba lat od rozpoczęcia spadku przyrostu drzewek i pędów w okresie 12-letnim.

Rodzaj materiału	Liczba lat	Rok	Udział procentowy pędów/drzewek
Drzewka	1	2020	2,9
	2	2019	0,0
	3	2018	11,8
	4	2017	20,6
	5	2016	23,5
	6	2015	5,9
	7	2014	0,0
	8	2013	8,8
	9	2012	5,9
	10	2011	5,9
	11	2010	11,8
	12	2009	2,9
Pędy	1	2020	14,3

2	2019	2,9
3	2018	11,4
4	2017	22,9
5	2016	14,3
6	2015	8,6
7	2014	14,3
8	2013	2,9
9	2012	0,0
10	2011	5,7
11	2010	2,9

Dla obliczenia spadku przyrostu brano pod uwagę dla każdego drzewka/pędu rok maksymalnego (optymalnego) przyrostu w ciągu ostatnich 12 lat (od 2009 do 2020 r.) i odnoszono ten optymalny przyrost do jego przyrostu w 2020 r. Średni spadek przyrostu (łącznie dla drzewek i pędów) w ciągu ostatnich 12 lat wahał się od 11,3% (dla 1,4 % drzewek/pędów) do 67,8% (u 1,4% drzewek/pędów) w 2009 roku (Tab. 15). Dla większości drzewek i pędów optymalny wzrost przyrostu miał miejsce w latach 2016 -2018 (łącznie dla ok. 47%), a ich średni spadek przyrostu w stosunku do roku 2020 wynosił 48,4%. Minimalny ubytek przyrostu wynosił 9% a maksymalny spadek przyrostu sięgał aż 92,7% (po 6 latach licząc od 2015 r. w stosunku do 2020 r.). Należy podkreślić, że spadek przyrostu stwierdzono w tym okresie u 91,4% pędów/drzewek



Fot. 4. Masowe zamieranie aparatu asymilacyjnego kosodrzewiny w obrębie Dolina Chochołowska w 2018 roku (fot. Czesław Bartnik).

Tab. 15. Średni % spadku przyrostów z roku o optymalnym przyroście w stosunku do roku 2020

Rok	Średni spadek przyrostu [%]	min	maks.	% pędów/drzew ze spadkiem przyrostu
2009	67,8	67,8	67,8	1,4
2010	47,3	13,6	69,7	7,1
2011	67,2	62,5	72,9	5,7
2012	49,2	39,0	64,6	4,3
2013	37,4	14,7	56,9	4,3
2014	61,0	31,1	80,1	7,1
2015	59,3	27,6	92,7	5,7
2016	50,9	15,4	86,8	17,1
2017	41,1	10,2	82,8	18,6



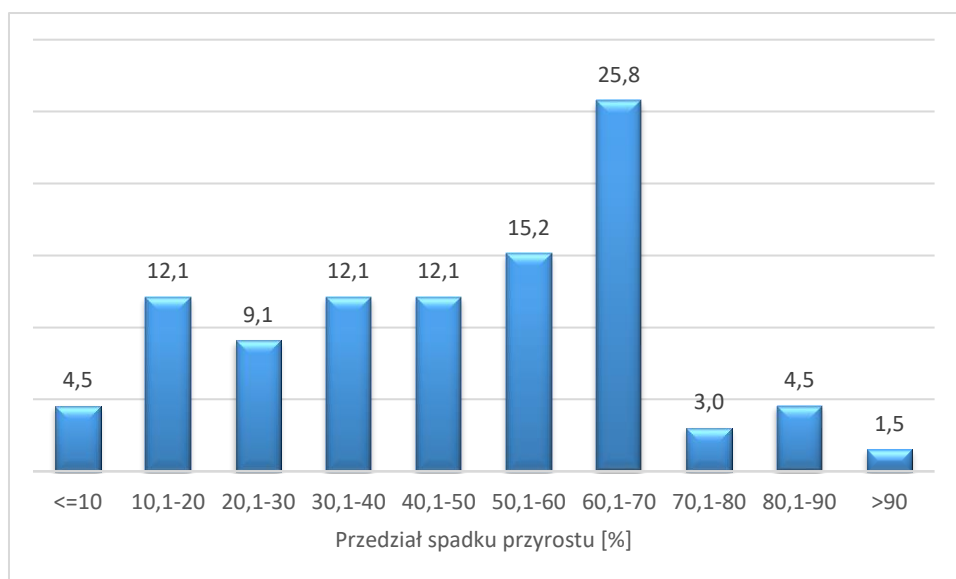
2018	53,3	23,7	73,1	10,0
2019	11,3	11,3	11,3	1,4
2020	28,2	9,0	67,9	8,6
Ogółem % drzewek/pędów wykazujących spadek przyrostu - 91,4				

Spośród wszystkich zbadanych pędów i drzewek tylko u 8,6% stwierdzono wzrost przyrostu w 2020 r. (Tab.16). Były to jednak pojedyncze przypadki, a średni wzrost przyrostu wahał się od 2,0 do 43,5%.

Tab. 16. Średni % wzrostu przyrostów z roku o optymalnym przyroście w stosunku do roku 2020

Rok	Średni wzrost przyrostu [%]	min.	maks.	% pędów/drzew ze wzrostem przyrostu
2014	43,5	43,5	43,5	1,4
2015	34,5	34,5	34,5	1,4
2016	17,1	17,1	17,1	1,4
2017	7,2	0,7	13,6	2,9
2018	2,0	2,0	2,0	1,4
Ogółem % drzewek/pędów wykazujących spadek przyrostu - 8,6				

Biorąc pod uwagę 7 - letni okres analiz dendrochronologicznych (od 2014 do 2020 r.) stwierdzono, że najwięcej drzewek/pędów (41%) wykazywało spadek przyrostu (w stosunku do 2020 r.) w przedziałach od 50 do 70% (Ryc.7). Spadek przyrostów powyżej 70% odnotowano u 9% okazów w tym tylko u 1,5% w przedziale powyżej 90%.



Ryc. 7. Udział procentowy pędów w zależności od spadku przyrostu

W 2016 roku stwierdzono 18 drzew/pędów (26,1%) ze średnim spadkiem przyrostów wynoszącym 26,1% w stosunku do optymalnego przyrostu we wcześniejszych latach (Tab. 17). W kolejnych 3 latach na tych samych pędach/drzewkach spadek przyrostów zwiększał się średnio o 34,7%, 43,3% i 51,8%. Natomiast w 2020 spadek ten był już niższy o 10% i wynosił 41,9%. Prawie wszystkie badane pędy/drzewka przez kolejne 4 lata (do 2020 roku) miały wciąż niższy przyrost średnio o (42,9%) w stosunku do ostatniego roku optymalnego (ze wzrostem przyrostu). W 2017 stwierdzono prawie 60% analizowanych pędów wykazujących spadek przyrostów w stosunku do ostatniego roku wzrostu przyrostu (przed 2017 r.). W 2017 r. takich okazów było 59,4% i średni spadek przyrostu dla nich wynosił średnio o 29,3% i w kolejnych 2 latach wzrastał po ok. 10% do 48,5%, a w 2020 zmalał z kolei o 10% do 38,5%. Z kolei rozpoczynając analizę pędów w 2019 roku stwierdzono wciąż u aż 76,8% obniżony przyrost (średnio o 46,7%) w stosunku do ostatniego wzrostu przyrostu. Natomiast w 2020 roku odsetek okazów ze spadkiem przyrostu był wciąż wysoki i wynosił 69,6%, a ich średni spadek przyrostu był wciąż wysoki i wynosił 41,1 .

Tab. 17. Liczba drzew/pędów, u których stwierdzono w danym roku spadek przyrostu dla pędów i drzewek w stosunku do poprzedniego roku licząc od wybranego roku oraz ich zmiana w spadku przyrostu w kolejnych latach.

Rok	Liczba tych samych drzew/pędów	Średni % spadku przyrostu w roku	% pędów	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe dla średniego spadku przyrostu
2016	18,0	26,1	26,1	6,6	83,0	19,2
2017	18,0	34,7	26,1	9,0	85,2	19,3
2018	18,0	43,3	26,1	3,7	91,8	23,0
2019	17,0	51,8	24,6	11,4	92,7	21,7
2020	15,0	41,9	21,7	15,4	67,9	16,5
2017	41,0	29,3	59,4	5,3	85,2	18,8
2018	39,0	37,4	56,5	3,7	91,8	18,9
2019	34,0	48,5	49,3	11,4	92,7	17,4
2020	31,0	38,5	44,9	91,4	91,4	16,9
2018	49,0	35,3	71,0	3,7	91,8	19,2
2019	44,0	47,4	63,8	11,4	92,7	17,6
2020	41,0	40,9	59,4	8,9	82,8	18,4
2019	53,0	46,7	76,8	2,4	92,7	18,5
2020	48,0	41,1	69,6	7,2	82,8	19,2

#### 4. Wnioski końcowe

1. Na podstawie badań dendrochronologicznych wykazano, że choroba aparatu asymilacyjnego kosodrzewiny w rozmiarze epifitozy wystąpiła 2-krotnie w ciągu 12 lat. Za pierwszym razem stosunkowo duże nasilenie choroby wystąpiło w 2010 roku, a drugi raz w latach 2016-2018.
2. Epifitoza miała masowy charakter i spowodowała spadki przyrostu w tym okresie u ponad 90% badanych pędów i drzewek. Jej masowy charakter potwierdzają również przeprowadzone wcześniej obserwacje w latach 2016-2019 na tym terenie. W latach epidemii spadek przyrostów radialnych był wysoki i wynosił średnio 48% (wahał się od 3,7 do 92,7%).
3. Średni przyrost radialny pędów i drzewek był podobny i wynosił odpowiednio 0,62 i 0,74 mm rocznie (maksymalnie 1,45 mm). Z kolei średni przyrost roczny na długość wśród badanych egzemplarzy wynosił 5,6 cm (maksymalnie 11,5 cm). Natomiast maksymalny wiek drzewek wyniósł 63 lat (średnio 38 lat) co świadczy o młodym wieku kęp kosodrzewiny na tym terenie.

4. Choroba aparatu asymilacyjnego spowodowała nie tylko spadek przyrostu na grubość i długość, ale również przyczyniła się do zmian morfologicznych igieł i pędów. U drzewek silniej porażonych drastycznie zmniejszała się liczba i długość igieł, a towarzyszące im przebarwienia (od chlorotycznych do brązowych) przyczyniały się do zakłócenia fotosyntezy. Igły silniej przebarwione miały wyższą suchą masę w porównaniu do igieł zielonych.
5. W wyniku silnego osłabienia kosodrzewiny chorobą aparatu asymilacyjnego stwierdzono pojawienie się nowego symptomu chorobowego w postaci nasilonego zamierania wierzchołków pędów w roku 2020.
6. Nasilenie zamierania wierzchołków pędów zależało od wysokości n.p.m., wystawy, kierunku świata oraz ich umiejscowienie w kępie (na zewnątrz lub wewnątrz). Zamieranie wierzchołków występowało częściej na wyższych wysokościach, z ekspozycją zachodnią i północno-zachodnią oraz od zachodniej strony świata i wewnątrz kępy. Sugeruje to, że chorobie tej sprzyja dłużej utrzymująca się większa wilgotność, a z kolei ogranicza ją większe nasłonecznienie (od strony południowej).
7. Wyodrębniono 4 typy przebarwień igieł: chlorotyczne (jasno zielone), żółte, brunatne oraz „inne”, do których zaliczono zabarwienie szare lub występowanie kilku przebarwień na igle. Odsetek igieł z przebarwieniami wynosił średnio 58,4% i wahał się od 8,6% do 98,4%.
8. Z badanych kategorii igieł wyizolowano ogółem 50 taksonów grzybów zidentyfikowanych lub zweryfikowanych za pomocą technik molekularnych (analiza PCR). Większość wyizolowanych grzybów zostało zidentyfikowanych do gatunku (70%), a pozostałe do rodzaju lub rodziny. Zdecydowana większość zidentyfikowanych grzybów jest saprotrofami, 9 gatunków jest patogenami, a 5 gatunków endofitami. Charakter biotroficzny części gatunków jest jeszcze niepewny.
9. Zidentyfikowano sprawcę epidemii zamierania igieł *P. mugo* w latach 2016-2018. Grzyb ten należy do rodziny *Rhytismataceae* i dotychczas nie był notowany na kosodrzewinie w Polsce. W przygotowywanej publikacji zostanie podana szczegółowa charakterystyka tego patogenu.
10. Po epidemii zwiększyła się częstotliwość występowania innych grzybów patogenicznych w tym: *Lophodermium* sp., *Lophodermium conigenum*, *Leptomelanconium allescheri*, *Sydowia polyspora*, *Coleosporium campanulae*. Wymienione gatunki ze względu na częstsze występowanie mogą odgrywać znaczącą rolę w uszkodzaniu aparatu asymilacyjnego.

11. Ze względu na dużą częstotliwość występowania grzyba *Hendersonia pinicola* i częste izolacje go z chlorotycznych plamek wykonana zostanie wkrótce sztuczna infekcja igieł kosodrzewiny zarodnikami tego grzyba w warunkach laboratoryjnych. Pomoże to w określeniu roli tego grzyba w zamieraniu igieł *P. mugo*.
12. Ze względu na pojawienie się nowych i miejscami o dużym nasileniu objawów chorobowych na kosodrzewinie w postaci zamierania wierzchołków pędów wskazane jest dalsze monitorowanie tego zjawiska.