

# **Określenie stopnia zasiedlenia i składu gatunkowego grzybów mikroskopijnych zasiedlających martwe drewno świerkowe w Tatrzańskim Parku Narodowym**



**Raport z badań sfinansowanych ze środków funduszu leśnego Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe przekazanych Tatrzańskiemu Parkowi Narodowemu w 2016 roku.**

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

*Wrocław listopad 2016*

## 1. Metodyka badań

Doświadczenie obejmowało w głównej mierze martwe drewno świerka, zarówno leżaninę jak i pniaki. Dodatkowo, w celach porównawczych wykonano także analizę mykologiczną martwego drewna olchy czarnej, kosodrzewiny, wierzby, limby, jarząbu, jawora oraz brzozy. Próbkę były pobierane trzy razy w sezonie wegetacyjnym tj. wiosną, latem i jesienią. Stanowiska badawcze zlokalizowano w Dolinie Białki oraz Dolinie Chochołowskiej. Dodatkowo jedno stanowisko zlokalizowane było w okolicy Centrum Edukacji Przyrodniczej TPN w Zakopanem (Tabela 1, rysunek 1). Wyznaczono 31 stanowisk monitoringowych – punktów poboru próbek, które obejmowały po 3 obiekty (martwe drewno stojące lub leżące) co daje sumarycznie 93 próby w każdym terminie badań (279 prób w całym okresie badań).

W trakcie badań terenowych określano stopień rozkładu drewna wg. skali Pyla i Brown'a, wysokość n.p.m. oraz koordynaty GPS. Następnie z głębokości około 1-2 cm (jednego wybranego obiektu/pniaka na 1 stanowisku monitoringowym) pobrano sterylnym narzędziem fragmenty drewna do określenia ich zasiedlenia przez grzyby mikroskopowe. Fragmenty drewna zostały następnie opłukane powierzchniowo w 1% roztworze podchlorynu sodu przez kilka sekund. Kolejnym etapem było wyłożenie około 0,5 cm fragmentów drewna po 6 na szalki Petriego z zestaloną, zakwaszoną pożywką PDA (agar glukozowo-ziemniaczany). Wyrastające z drewna grzyby były odszczepiane na skosy z pożywką PDA i oznaczane do gatunku na podstawie cech morfologicznych.

## 2. Wyniki

### 2.1 Analiza wiosenna

W trakcie analizy mykologicznej martwego drewna, wykonanej wiosną 2016 roku wyizolowano łącznie 19 gatunków grzybów (308 kolonii) (Tabela 2). Największym udziałem procentowym charakteryzował się gatunek *Trichoderma harzianum*, który stanowił blisko 25% wszystkich uzyskanych w tym okresie izolatów. Drugim dominantem był grzyb *T. polysporum*, którego udział w mykocenozie martwego drewna wynosił blisko 15%. Kolejnym gatunkiem dominującym w analizie wiosennej martwego drewna był *Alternaria alternata*, który stanowił prawie 12% wszystkich wyosobnionych w tym czasie gatunków grzybów oraz *Cladosporium cladosporioides* (9%). Pozostałe gatunki występowały na poziomie od około 5% (*Penicillium notatum* oraz *P. urticae*, a także gatunki z rodzaju *Fusarium*: *F. oxysporum* i *F. sporotrichoides*) do około 0,4% (*F. culmorum*, *F. equiseti*, *Mucor hiemalis*).

Porównując skład gatunkowy grzybów wyizolowanych z martwego drewna pomiędzy lokalizacjami tzn. Doliną Białki (Tabela 3), a Doliną Chochołowską (Tabela 4) nie stwierdzono większych różnic. W obydwu lokalizacjach dominował *T. harzianum* oraz *A. alternata* i *C. cladosporioides*. Interesujący jest fakt, że na martwym drewnie w Dolinie Białej sporym udziałem charakteryzował się gatunek *T. polysporum*, który stanowił w tej lokalizacji prawie 20% wszystkich wyosobnionych grzybów, podczas gdy w Dolinie Chochołowskiej jego udział sięgał 6%.

Z martwego drewna, zarówno stojącego jak i leżaniny wyizolowano łącznie 16 gatunków grzybów (235 kolonii) (Tabela 5). Największym udziałem charakteryzowały się grzyby z rodzaju *Trichoderma*, których łącznie procentowy udział wynosił około 45%. Dużym udziałem (na poziomie blisko 13%) charakteryzowały się też takie gatunki jak *A. alternata* oraz *C. cladosporioides*. Z kolei w przypadku mykocenozy pniaków wyizolowano łącznie 11 gatunków grzybów (65 kolonii). Największym udziałem podobnie jak w przypadku leżaniny, cechowały się gatunki z rodzaju *Trichoderma*, które stanowiły blisko 40% wszystkich wyosobnionych grzybów. Sporym udziałem charakteryzowały się w odróżnieniu od leżaniny grzyby z rodzaju *Penicillium* (13%), a także *A. alternata* (9%).

W przypadku martwego drewna świerkowego to właśnie grzyby z rodzaju *Trichoderma* dominowały w mykobiocie. Najwięcej kolonii *Trichoderma* spp. izolowano z drewna w 1 klasie rozkładu. Najwięcej gatunków oraz kolonii stwierdzono na drewnie w 1 i 4 klasie rozkładu (Tabela 6).

Analizując skład gatunkowy grzybów zasiedlających różne gatunki drewna można stwierdzić, że najwięcej gatunków oraz kolonii uzyskano z martwego drewna jarzębu, odpowiednio 3 gatunki oraz 19 kolonii. Trzy gatunki grzybów izolowano także z drewna kosodrzewiny i wierzby przy znacznie mniejszej liczbie kolonii odpowiednio 9 i 7. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* wyosobniono tylko z drewna olchy i kosodrzewiny (Tabela 7).

## 2.2 Analiza letnia

Kolejną analizę mykologiczną wykonano w lecie. W jej trakcie wyizolowano łącznie 13 gatunków grzybów (344 kolonii) (tabela 8). Podobnie jak wiosną największym udziałem w mykocenozie martwego drewna charakteryzował się grzyb *T. harzianum*, który stanowił blisko 35% wszystkich wyizolowanych gatunków. Drugim dominantem był gatunek *T. hamatum* (9%), *Phoma levellei* (9%) oraz *P. notatum* (9%). Pozostałe gatunki stanowiły od 7% (*F. sporotrichoides*), przez 6% - *P. urticae* i *C. cladosporioides* (5%), do 0,6% *Epicoccum nigrum*, *F. equiseti* i *T. viridae*.

Porównując skład gatunkowy grzybów wyizolowanych z martwego drewna pomiędzy lokalizacjami tzn. Doliną Białką (Tabela 9), a Doliną Chochołowską (Tabela 10) nie stwierdzono większych różnic. W obydwu lokalizacjach dominował *T. harzianum* z tą różnicą, że *T. harzianum* stanowił ponad 40% wszystkich wyizolowanych kolonii w Dolinie Białej, podczas gdy w Dolinie Chochołowskiej stanowił około 20% ogółu wyizolowanych grzybów. Drugim dominantem w Dolinie Białej był gatunek *P. notatum* (16%) oraz *F. sporotrichoides* (13%), podczas gdy w Dolinie Chochołowskiej był to gatunek *T. viridae* (20%) i *P. levellei* (13%).

Z martwego drewna, zarówno stojącego jak i leżaniny wyizolowano łącznie 13 gatunków grzybów (294 kolonii) (Tabela 11). Największym udziałem charakteryzowały się grzyby z rodzaju *Trichoderma*, *T. harzianum*, którego procentowy udział wynosił 34%. Dużym udziałem (na poziomie blisko 10%) charakteryzowały się też takie gatunki jak *P. notatum* oraz *P. levellei*. Z kolei w przypadku mykocenozy pniaków wyizolowano łącznie 5 gatunków grzybów (50 kolonii). Największym udziałem podobnie jak w przypadku leżaniny, cechowały

się gatunki z rodzaju *Trichoderma*, które stanowiły blisko 40% wszystkich wyosobnionych grzybów. Z pniaków wyizolowano także *A. alternaria*, *C. cladosporioides* oraz *F. culmorum*.

W przypadku martwego drewna świerkowego to właśnie grzyby z rodzaju *Trichoderma* dominowały w mykobiocie. Najwięcej kolonii *Trichoderma* spp. izolowano z drewna w 1 klasie rozkładu. Najwięcej gatunków oraz kolonii stwierdzono na drewnie w 1 i 3 klasie rozkładu (Tabela 12).

Analizując skład gatunkowy grzybów zasiedlających różne gatunki drewna można stwierdzić, że najwięcej kolonii uzyskano z martwego drewna olchy, jarzębu i limby, po 12 kolonii. Podczas analizy letniej wyizolowano pojedyncze gatunki takie jak *E. nigrum* i *F. sporotrichoides* (z olchy i jarzębu), *T. harzianum* (z kosodrzewiny, wierzby i brzozy) oraz *P. notatum* (z limby) (Tabela 13).

### 2.3 Analiza jesienna

Ostatnią analizę mykologiczną martwego drewna wykonano jesienią. Wyizolowano 15 gatunków grzybów (332 kolonii) (tabela 14). Największym udziałem w mykocenozie martwego drewna charakteryzowały się grzyby z rodzaju *Trichoderma*: *T. harzianum* (35% wszystkich wyizolowanych kolonii grzybów), *T. polysporum* (14% ogółu kolonii grzybów) oraz *T. hamatum* (10%). Drugą grupą grzybów zasiedlających martwe drewno były grzyby z rodzaju *Fusarium*, które stanowiły łącznie 10% wszystkich wyosobnionych gatunków, z wyraźną dominacją *F. sporotrichoides*. Stosunkowo dużym udziałem charakteryzował się grzyb *P. levellei* (8%) oraz grzyby z rodzaju *Penicillium* (8%).

Porównując skład gatunkowy grzybów wyizolowanych z martwego drewna pomiędzy lokalizacjami tzn. Doliną Białki (Tabela 15), a Doliną Chochołowską (Tabela 16) podczas analizy jesiennej stwierdzono pewne różnice, dotyczące w szczególności składu gatunkowego oraz liczby gatunków grzybów wyizolowanych z martwego drewna. W obydwu lokalizacjach dominował *T. harzianum* z tą różnicą, że *T. harzianum* stanowił ponad 40% wszystkich wyizolowanych kolonii w Dolinie Chochołowskiej, podczas gdy w Dolinie Białej ta wartość osiągnęła 30%. Drugim dominantem w Dolinie Białej były grzyby z rodzaju *Trichoderma*: *T. polysporum* (17%) i *T. hamatum* (17%), a następnie *F. sporotrichoides* (11%) i grzyby z rodzaju *Penicillium* (10%). Z kolei w Dolinie Chochołowskiej drugim dominantem był grzyb *P. levellei* (20%), *T. polysporum* (10%) oraz *F. culmorum* (6%). Jeśli chodzi o liczbę gatunków to z martwego drewna w Dolinie Białej wyosobniono łącznie 14 gatunków (222 kolonie), a z Dolni Chochołowskiej – 8 gatunków grzybów (112 kolonii).

Z martwego drewna, zarówno stojącego jak i leżaniny wyizolowano łącznie 15 gatunków grzybów: 15 gatunków z leżaniny (275 kolonii) i 7 gatunków z pniaków (55 kolonii) (Tabela 17). Największym udziałem charakteryzowały się grzyb z rodzaju *Trichoderma*, *T. harzianum*, którego procentowy udział wynosił zarówno dla leżaniny jak i pniaków około 35%. Dużym udziałem (na poziomie blisko 19%) charakteryzował się gatunek *P. levellei* izolowany głównie z pniaków, podczas gdy z leżaniny tylko na poziomie 6%. Z pniaków wyizolowano także *F. culmorum*, *F. equseti* oraz *F. sporotrichoides*.

W przypadku martwego drewna świerkowego to właśnie grzyby z rodzaju *Trichoderma* dominowały w mykobiocie. Najwięcej kolonii *Trichoderma* spp. izolowano z drewna w 1 i 2 klasie rozkładu. Najwięcej gatunków oraz kolonii stwierdzono na drewnie w 1 klasie rozkładu (Tabela 18).

Analizując skład gatunkowy grzybów zasiedlających różne gatunki drewna można stwierdzić, że najwięcej kolonii uzyskano z martwego drewna olchy i jarzębu, po 12 kolonii. Podczas analizy jesiennej wyizolowano pojedyncze gatunki takie jak *F. sporotrichoides* (z wierzby i brzozy), *T. harzianum* (z olchy) oraz *T. polysporum* (z olchy, jarzębu i brzozy) (Tabela 19).

### 3. Omówienie wyników

W trakcie analizy mykologicznej składu gatunkowego grzybów mikroskopowych zasiedlających martwe drewno stwierdzono, że największym udziałem charakteryzują się grzyby z rodzaju *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. polysporum* oraz *T. hamatum*. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są gatunkami pospolicie występującymi w środowisku naturalnym. Występują w glebie oraz są odpowiedzialne za rozkład martwej tkanki organicznej (Grondona i in. 1997). Niektóre z gatunków jak np. *T. harzianum* jest z powodzeniem wykorzystywany w biologicznej ochronie roślin do zwalczania chorób powodowanych przez takie patogeny jak: *Fusarium* spp. czy *Rhizoctonia* spp. (Grondona i in. 1997, Błaszczuk i in. 2014). Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są gatunkami ubikwistycznymi, które nie są w stanie kolonizować żywego drewna ale bardzo szybko zasiedlają wtórnie martwe drewno (Kwaśna i in. 2016). Są bardzo często izolowane z martwego drewna świerka (Cardoza i in. 2006). Interesujący jest fakt, że grzyby z rodzaju *Trichoderma* np. *T. harzianum* może być antagonistą wobec owadów zasiedlających drewno świerka np. korników. Owady broniąc się przed grzybami są w stanie produkować substancje, oparte na działaniu bakterii *Micrococcus luteus*, które hamują rozwój grzybów w chodnikach drążonych w drewnie (Cardoza i in. 2006).

Wykazano, że drewno zaliczane do niższych stopni rozkładu charakteryzuje się innym składem gatunkowym niż drewno zaliczane do 4 czy 5 stopnia rozkładu. Stwierdzono też większą liczbę gatunków mykocenozy niższych klas rozkładu w porównaniu do drewna z 4 czy 5 stopnia. Potwierdzają to badania Oszako (2004), który z młodszych drzew zamierających olszy izolował przede wszystkim grzyby z rodzaju *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*. Natomiast *Trichoderma* spp. były izolowane głównie ze starszych drzew. Z młodszych drzew izolowano także znacznie więcej gatunków niż z drzew starszych. Znajduje to swoje potwierdzenie w badaniach zespołu Kwaśnej (2016), która stwierdziła, że „stare: drewno ulega głównie rozkładowi tzw. „pleśniowemu” powodowanemu przez grzyby z gromady *Ascomycota*. Podobne wyniki uzyskali Kowalski i Czekaj (2010) na zamierających pędów jesionu nie stwierdzili obecności grzybów z rodzaju *Trichoderma* ale izolowali grzyby z rodzaju *Fusarium* oraz *Botrytis cinerea* i *Alternaria alternata*. Grzyby z rodzaju *Fusarium* np. stwierdzany na martwym drewnie w Karkonoszach – *F. culmorum* są patogenami wielu gatunków roślin ale w pewnym okolicznościach mogą rozwijać się jak saprotrofy korzystając z rozkładu martwej tkanki organicznej (Wagaha i Muthomi 2007).

Z kolei Wrzosek wraz z zespołem (2014) izolowała z martwych pniaków świerka (po roku od ich powstania), które następnie poddawano zabiegowi biologicznego zwalczania z użyciem *Phlebiopsis gigantea*, 26 izolatów grzybów. Stwierdzono, że pniaki z największym stopniem zasiedlone są przez *Sistotrema brinkmanni* oraz *Trichoderma viridescens*. Ci sami autorzy potwierdzają, że martwe pniaki świerka są zasiedlone przez grzyby należące do różnych grup taksonomicznych i troficznych. Linder (2011) z martwych, 6-letnich pniaków izolował grzyby z rodzaju *Trichoderma*: *T. album* i *T. polysporum*. Potwierdzają to uzyskane wyniki. Znacznie więcej gatunków oraz kolonii uzyskiwano z leżaniny niż z pniaków w 1 i 2 klasie rozkładu.

W prowadzonych badaniach nie wykazano wyraźnych różnic w składzie gatunkowym mykocenozy martwego drewna z zależności od gatunku drzewa. Podobne wyniki uzyskali inni badacze (Oszako 2004, Kowalski i Czekaj 2010, Wrzosek i in. 2014). Ci sami autorzy podkreślają również fakt, iż nie jest do końca znana rola grzybów mikroskopowych w ekosystemie martwego drewna. Tego typu badania nie były dotychczas wykonywane na terenach chronionych gdyż skupiano się jedynie na lasach produkcyjnych.

#### 4. Wnioski

- Dominującymi grzybami mikroskopowymi zasiedlającymi martwe drewno w wybranych rejonach Tatr są grzyby z rodzaju *Trichoderma*,
- Znacznie większą różnorodnością gatunkową grzybów wyizolowanych z martwego drewna charakteryzowała się Dolina Białki niż Dolina Chochołowska
- Więcej gatunków oraz kolonii uzyskiwano z leżaniny i starszego martwego drewna niż z pniaków w wyższych klasach rozkładu
- Martwe drewno innych gatunków niż świerk charakteryzowało się znacznie uboższą mykocenozą

#### Literatura

- Błaszczak L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jędrzycka M. 2014. *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research* Vol. 54, No. 4: 309–317.
- Cardoza J., Klepzig K., Raffa K. 2006. Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology* 31: 636–645.
- Czekaj A., Kowalski T. 2010. Symptomy chorobowe i grzyby na zamierających jesionach (*Fraxinus excelsior* L.) w drzewostanach Nadleśnictwa Staszów. *Leśne Prace Badawcze* Vol. 71 (4): 357–368.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Garcia-Acha, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8): 3189–3198.

- Kwańska H., Łakomy P., Gornowicz R. 2016. Grzyby saproksyliczne w resztkach poźrębowych sosny zwyczajnej. *Sylvan* 160 (5): 355–364
- Linder D., Vasaitis R., Kubartova A., Allmer J., Johannesson H., Banik M., Stenlid J. 2011. Initial fungal colonizer affects mass loss and fungal community development in *Picea abies* logs 6 yr after iconulation. *Fungal ecology* 4: 449–460.
- Oszako T. 2004. Grzyby wyizolowane z zamierających olszyn w Polsce. *Leśne Prace Badawcze* 2: 96–100.
- Wagaha J.M., Muthomi J.W. 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* 26: 877–885.
- Wrzosek M., Sierota Z., Sikora K., Małecka M., Pawłowska J. 2014. Bogactwo grzybów zasiedlających drewno pniaków świerkowych po roku od sztucznego zakażenia *Phlebiopsis gigantea*. *Studia i Materiały CEPL w Rogowie R. 16. Zeszyt 41 (4): 202–211.*