

Ocena występowania grzybni i owocników *Phlebiopsis gigantea* (Fr.: Fr.) Jülich w pniakach sosnowych po wykonaniu zabiegu ochronnego przed hubą korzeni

Evaluating the persistence of *Phlebiopsis gigantea* (Fr.: Fr.) Jülich mycelium and fruiting bodies in pine stumps after root-rot protection treatments

Monika Małecka , Anna Żółciak, Katarzyna Sikora, Zbigniew Sierota

Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyń

 Fax. +48 22 7150557, tel. +48 22 7150561, e-mail: M.Malecka@ibles.waw.pl

Abstract. Commercial preparations Rotstop and PgSuspension, used in Scandinavia and the United Kingdom, are EU-licensed biocontrol agents against root rot that contain isolates of the fungus *Phlebiopsis gigantea*. The composition of these two products differs from that of PgIBL, previously use in Poland, hence the need to verify their effectiveness under Polish site and stand conditions. Stumps were treated with the commercial products and subsequently checked after one year for the persistence of mycelia and fruiting bodies. Molecular methods were used on the mycelia present in the stumps to confirm that their genetic identity was consistent with fungal isolates from the preparations. Treatments with EU-licensed preparations gave satisfactory results – in about 70–80% of the stumps mycelia were present under the bark. Inoculation with Rotstop preparations was most effective during autumn 2008 (effectiveness of 82%), while PgSuspension application was most effective during spring 2008 (effectiveness of 77%). The development of the mycelia in pine stumps from the two preparations investigated (containing preserved dormant spores) was similar to that of preparation PgIBL (formulated from living mycelium within a growing medium), in terms of their relative effectiveness measured as the percentage of stumps supporting under-bark mycelia (which ranged between 70–90%, depending on the treatment term).

Key words: Pine stumps, *Heterobasidion annosum*, *Phlebiopsis gigantea*, biopreparations

1. Wstęp

Preparaty biologiczne zawierające jako substancję aktywną grzybnie *Phlebiopsis gigantea* (PgIBL) lub liofilizowane zarodniki (Rotstop, PgSuspension) były w Europie z powodzeniem stosowane od wielu lat, skutecznie ograniczając rozwój choroby powodowanej przez patogeny rodzaju *Heterobasidion* (Pratt et al. 2000). Legalne stosowanie tych preparatów jest możliwe dopiero po przejściu skomplikowanego procesu rejestracyjnego zgłoszonych przez producenta izolatów *P. gigantea*, zgodnie z dyrektywą Rady Unii Europejskiej 91/414/EWG z dnia 15.07.1991 r., a ostatecznie zmienioną dyrektywą Komisji 2008/113/WE z dnia 8.12.2008 r., która weszła w życie 1.05.2009 r. Obecnie zarejestrowanych i dopuszczonych do stosowania w krajach Unii Europejskiej jest 17 izolatów *P. gigantea* zgłoszonych przez Forestry Commission (Wlk. Brytania) oraz 4 izolaty zgłoszone przez Verdera, Finlandia (Żółciak, Sierota 2010).

Z uwagi na procedury rejestracyjne stosowanie tych samych izolatów przez wiele lat (do następnego okresu rejestracyjnego) jest obligatoryjne. Zasada ta stoi w pewnej sprzeczności z przebiegiem procesów biologicznych (molekularnych) w cyklu filogenetycznym organizmów grzybowych, zwłaszcza że mogą one podlegać zjawisku hybrydyzacji i, adaptując się do nowych nisz ekologicznych (nowych gatunków roślin-gospodarzy), zmieniać swą aktywność enzymatyczną (Schardl, Craven 2003). Nie bez znaczenia jest także wpływ środowiska zewnętrznego i jego warunków na przebieg takich zjawisk niepodlegających kontroli, jak konkurencja czy naturalna selekcja (Nelson 1993).

Uwzględniając powyższe uwarunkowania, coraz częściej podejmuje się badania, mające na celu wykazanie trwałości lub zmienności aktywności różnych izolatów *P. gigantea*, w różnych warunkach środowiska i wobec różnych gospodarzy (Łakomy, Zarakowski 2000; Łakomy 2001; Żółciak et al. 2008). Ich istotą jest w gruncie rzeczy uzyskiwanie izolatów o

jak najwyższej skuteczności, do późniejszego ich stosowania w lasach zagrożonych przez patogeny korzeni (Thor, Stenlid 1998; Sierota 2003). Wyniki badań wskazują na pewne zróżnicowanie aktywności tego saprotroficznego grzyba, zarówno pod względem wytwarzania enzymów, jak i tempa zasiedlania podłoża, czy nawet konkurencyjności wobec patogenu (*Heterobasidion annosum*, *H. parviporum*) (Sierota 1995; Żółciak 2005; Żółciak 2007; Żółciak et al., niepubl.). Istotne znaczenie dla aktywności rozwoju tego grzyba w środowisku leśnym, podobnie jak i dla innych organizmów, mają także warunki pogodowe. Są one jednym z czynników abiotycznych, które oddziałują na kiełkowanie zarodników, rozwój strzępek grzyba w tkankach oraz na tworzenie owocnika. Wpływ ten jest szczególnie ważny w przypadku preparatów opartych na liofilizowanych zarodnikach *P. gigantea*. Zarodniki te muszą bowiem odzyskać swą naturalną żywotność, skiełkować, wytworzyć strzępki grzybni oraz podjąć immanentne dla niej czynności życiowe. Cały przebieg ontogenezy grzyba w pniaku poddany jest bowiem presji czynników meteorologicznych – wilgotności powietrza i substratu oraz temperatury.

Prezentowana praca wpisuje się w nurt tej problematyki. Ocenie poddano w zróżnicowanych warunkach środowiska leśnego w Polsce aktywność wytwarzania grzybni i owocników przez różne izolaty *P. gigantea* obecne w komercyjnych preparatach biologicznych (produkcji angielskiej i fińskiej) oraz dla porównania w nierejestrowanym od listopada 2010 r. preparacie polskim PgIBL.

2. Materiały i metody

Wybór powierzchni doświadczalnych

Badania prowadzono w drzewostanach sosnowych na gruntach porolnych, na terenie następujących 20 nadleśnictw: Cewice, Strzebielino (RDLP Gdańsk), Jastrowie, Mirosławiec (RDLP Piła), Łupawa, Szczecinek (RDLP Szczecinek), Gniewkowo, Skrwilno (RDLP Toruń), Dwukoły, Jedwabno, Nidzica, Olsztynek, Wipsowo (RDLP Olsztyn), Bielsk, Krynki, Rajgród (RDLP Białystok), Parczew, Sobibór, Włodawa (RDLP Lublin), Dobieszyn (RDLP Radom). Nadleśnictwa te zostały wytypowane na podstawie nadesłanych informacji o występowaniu na ich terenie drzewostanów spełniających kryteria (drzewostan sosnowy na gruncie porolnym z hubą korzeni, na siedlisku boru mieszanego świeżego) oraz zaplanowanych zabiegów hodowlanych (zależnie od wieku: czyszczenia późne, trzebieże wczesne i późne) i ochronnych z użyciem preparatu biologicznego PgIBL (tab. 1).

Zabiegi wykonano zgodnie z instrukcją (Żółciak, Sierota 2010) w następującym układzie czasowym i terytorialnym:

a) jesienią 2007 r. w 8 nadleśnictwach: Cewice, Strzebielino, Jastrowie, Mirosławiec, Łupawa, Szczecinek, Gniewkowo, Skrwilno,

b) wiosną 2008 r. we wszystkich 20 nadleśnictwach (tab. 1),

c) jesienią 2008 r. w 11 nadleśnictwach: Dwukoły, Jedwabno, Nidzica, Olsztynek, Wipsowo, Bielsk, Krynki, Rajgród, Parczew, Sobibór, Włodawa.

Wykonanie zabiegu (preparaty, aplikacja)

W każdym wytypowanym drzewostanie wytyczono i oznakowano 3 powierzchnie, na których pniaki (po 100 sztuk na każdej) były zabezpieczane trzema preparatami zagranicznymi: produkcji fińskiej – RotstopF (zawierający izolat fiński *P. gigantea* oznaczony numerem 21434) i RotstopS (zawierający izolat szwedzki *P. gigantea* oznaczony numerem 00247) oraz angielskiej – PGSuspension (zawierający izolat angielski *P. gigantea* oznaczony symbolem IMI390101), pozostała zaś część drzewostanu była zabezpieczana preparatem PgIBL (kontrola). Przy opryskiwaniu pniaków preparatami fińskimi RotstopF i RotstopS używano komercyjnego barwnika (Turf Mark Blue Tablets) – w formie tabletek zalecanego przez Verdera do barwienia pniaków. Łącznie w 20 nadleśnictwach, w 39 obiektach zabezpieczono około 11,7 tys. pniaków.

Zabieg opryskiwania pniaków na powierzchniach doświadczalnych wykonano zgodnie z zaleceniami Zakładu Ochrony Lasów (d. Fitopatologii Leśnej) Instytutu Badawczego Leśnictwa opracowanymi na podstawie instrukcji producentów. W przypadku RotstopF i RotstopS zawartość 5-gramowego opakowania preparatu mieszano z 5 l wody, a następnie dodawano odpowiednią ilość barwnika. Zgodnie z instrukcją producenta powierzchnie ścięcia pniaków opryskiwano zaraz po ścięciu drzew (maksimum 4 godziny po ścięciu drzewa). Powierzchnia ścięcia pniaka była równomiernie opryskana, średnio na powierzchnię ścięcia pniaka o średnicy 20 cm zużyto około 50 ml, objętość 5 l roztworu preparatu wystarczyła więc na zabezpieczenie około 100 pniaków. Preparat rozprowadzony w wodzie mógł być użyty tylko tego samego dnia, przechowywanie powodowało obniżenie jego skuteczności. Pniaki nie były przykrywane.

W przypadku preparatu PGSuspension mieszano zawartość jednego (25-gramowego) opakowania preparatu z 25 l czystej wody, bez dodatku barwnika (producent nie zaleca jego stosowania). Zgodnie z instrukcją producenta powierzchnie ścięcia pniaków opryskiwano zaraz po ścięciu drzew, najpóźniej w ciągu jednej

Tabela 1. Wykaz i krótka charakterystyka powierzchni doświadczalnych

Table 1. List and short description of test stands

RDLP Regional Directorate of the State Forests	Nadleśnictwo , Leśnictwo Forest district & sub-district	Oddział Forest compartment	Wiek Age	Skład gatunkowy Stand composition*
Białystok	Bielsk, Kleszczele	95n	13	7So3Brz
	Bielsk, Czechy	13Ao	21, 26	8So2Brz
	Krynki, Kruszyniany	548d	35	10So
	Krynki, Grzybowski	272a	33	10Św
	Rajgród, Kędziorowo	2c	51	7So2Db1Brz
	Rajgród, Kędziorowo	11a	51	7So2Db1Brz
Gdańsk	Cewice, Święte	178a, 160d, 188g	48, 35 39	6So3Md1Brz
	Cewice, Bukowina	267b	41	9So1Brz
	Strzebielino, Wysokie	67c	41, 51	7So3Brz
	Strzebielino, Chmieleniec	57 Bx	50	10So
Lublin	Parczew, Sosnowica	28a	51	9So1Brz
	Parczew, Borek	174d,j	33, 36	10So
	Sobibór, Dubnik	4f	28	10So
	Sobibór, Dubnik	4f	28	10So
	Włodawa, Brus	155a	48	8So2Brz
	Włodawa, Brus	237c	48	8So1Brz1Ol
Olsztyn	Dwukoły, Kęczewo	20d	39	10So
	Dwukoły, Kęczewo	21g	39	10So
	Jedwabno, Jagarzewo	634g	40	10So
	Jedwabno, Jagarzewo	634k	40	10So
	Nidzica, Kurki	57d	40	10So
	Nidzica, Kurki	92d	38	9So1Św
	Olsztynek, Selwa	254f, 271a, d	54, 51	7So3Brz, 10So
	Olsztynek, Selwa	271d, 330g	51, 63	10So
	Wipsowo, Pisa	50i	52	9So1Brz
Wipsowo, Pisa	51,j	73	10So	
Piła	Jastrowie, Wądołek	43a	74	10So
	Jastrowie, Prądy	284b	75	10So
	Miroslawiec, Hanki	331 f	43	10So
	Miroslawiec, Hanki	331 f	43	10So
Radom	Dobieszyn, Studzianki	70c	49, 29	10So
Szczecinek	Łupawa, Flisów	236f	35	8So1Md1Brz
	Łupawa, Flisów	206a	38	9So1Brz
	Szczecinek, Jeleni Ruczaj	195a	45	10So
	Szczecinek, Jeleni Ruczaj	173f	45	10So
Toruń	Gniewkowo, Pieczenia	422g, 423f,h	60, 36	10So
	Gniewkowo, Pieczenia	427a	59	10So
	Skrwilno, Huta	225Ac	41	9So1Brz
	Skrwilno, Huta	225 Ba	40	10So

* So – Scots pine, Brz – birch, Św – Norway spruce, Db – oak, Md – larch, Ol – alder

godziny po ścięciu danego drzewa. Powierzchnia ścięcia pniaka była równomiernie opryskana; zużycie cieczy roboczej na pniak o średnicy około 20 cm wynosiło około 50 ml. Preparat rozprowadzony w wodzie musiał być użyty w ciągu 24 godzin od rozprowadzenia zarodników w wodzie. Pniaki nie były przykrywane. Opryskiwano po 100 sztuk pniaków (po około 150 sztuk, gdy miały średnicę mniejszą niż 20 cm). Preparat PgIBL zastosowano zgodnie z instrukcją producenta.

Sposób oceny

Po 12 miesiącach od zabiegu, w którym zabezpieczano pniaki preparatami RotstopF, RotstopS, PGSuspension oraz PgIBL (kontrola), czyli jesienią 2008 r., wiosną 2009 r. oraz jesienią 2009 r., przeprowadzono ocenę udatności zabiegu ich kolonizacji na terenie ww. nadleśnictw. Ocena ta polegała na określeniu obecności grzyba w pniakach, tzn. stwierdzeniu obecności symptomów specyficznych dla rozwoju *P. gigantea*:

a) owocnikowania grzyba na pniaku i/lub obecności grzybni pod korą pniaka i/lub w strefie drewna bielastego,

b) obecności grzybni w próbkach drewna pobranych z pniaka, po wyłożeniu ich w laboratorium na pożywkę maltozowo-agarową,

c) potwierdzeniu tożsamości DNA izolowanego grzyba z DNA wprowadzonego inokulum.

Łącznie, w ramach lustracji powierzchni zabiegowych w trzech terminach, ocenie poddano niemal 7 tys. pniaków. Na podstawie oceny symptomów wyliczono odsetek pniaków ze stwierdzoną obecnością grzybni oraz odsetek pniaków z owocnikiem.

Z pniaków zabezpieczanych jesienią 2007 r. pobrano próbki drewna (10 próbek z 10 pniaków dla danego wariantu) i wyłożono na pożywkę maltozowo-agarową w celu uzyskania czystej kultury *P. gigantea*, a tym samym potwierdzenia zasiedlenia danego pniaka przez ten grzyb. W kulturach łączonych porównywano uzyskane czyste kultury *P. gigantea* z czystymi kulturami izolatów znajdujących się w badanych preparatach.

Tabela 2. Pochodzenie czystych kultur *P. gigantea*. Symbole oznaczające sposób pobrania: B – świdrem Presslera, prostopadle do pnia, G – świdrem Presslera, prostopadle do powierzchni ścięcia, S – przy użyciu siekiery.

Table 2. Origin of *P. gigantea* pure cultures. Symbols denote the sampling method: B – Pressler borer, perpendicular to the trunk; G – Pressler borer, perpendicular to cutting/stem surface; S – with the use of ax

Nr izolatu Isolate no.	Preparat Preparation	Nadleśnictwo Forest district	Rodzaj próbki Sample type	Nr izolatu Isolate no.	Preparat Preparation	Nadleśnictwo Forest district	Rodzaj próbki Sample type	Nr izolatu Isolate no.	Preparat Preparation	Nadleśnictwo Forest district	Rodzaj próbki Sample type
1	PgIBL	Bielsk	B	33	PGSuspension	Łupawa	S	57	RF	Łupawa	S
2	PgIBL	Cewice	S	34	PGSuspension	Łupawa	S	61	RF	Łupawa	S
3	PgIBL	Jedwabno	B	35	PGSuspension	Łupawa	S	62	RF	Parczew	G
6	PgIBL	Rajgród	B	36	PGSuspension	Łupawa	S	63	RF	Sobibór	G
7	PgIBL	Włodawa	G	37	PGSuspension	Łupawa	S	64	RF	Włodawa	G
8	PgIBL	Łupawa	S	38	PGSuspension	Parczew	G	65	RF	Włodawa	B
9	PgIBL	Łupawa	S	39	PGSuspension	Sobibór	S	66	RS	Bielsk	B
10	PgIBL	Parczew	G	40	PGSuspension	Sobibór	S	67	RS	Dobieszyn	S
13	PgIBL	Rajgród	B	41	PGSuspension	Włodawa	B	68	RS	Jedwabno	B
14	PgIBL	Cewice	S	42	RF	Bielsk	B	69	RS	Krynki	B
17	PgIBL	Parczew	G	43	RF	Skrwilno	S	70	RS	Nidzica	B
18	PgIBL	Parczew	G	44	RF	Skrwilno	S	71	RS	Rajgród	B
19	PgIBL	Rajgród	B	45	RF	Jedwabno	B	75	RS	Sobibór	S
20	PgIBL	Skrwilno	G	46	RF	Łupawa	S	76	RS	Sobibór	S
22	PGSuspension	Jedwabno	B	47	RF	Łupawa	S	77	RS	Wipsowo	B
23	PGSuspension	Krynki	B	48	RF	Rajgród	G	79	RS	Włodawa	B
24	PGSuspension	Rajgród	B	49	RF	Łupawa	S	80	RS	Dobieszyn	S
27	PGSuspension	Rajgród	G	50	RF	Rajgród	G	81	RS	Łupawa	S
28	PGSuspension	Rajgród	B	51	RF	Rajgród	B	83	RS	Sobibór	S
29	PGSuspension	Sobibór	S	54	RF	Skrwilno	G	88	RS	Włodawa	B
30	PGSuspension	Sobibór	S	55	RF	Sobibór	B				
31	PGSuspension	Wipsowo	B	56	RF	Sobibór	B				

W celu dokonania analiz genetycznych zgodności DNA grzybowego z pniaków sosnowych zabezpieczanych różnymi preparatami biologicznymi i charakteryzujących się wyraźną obecnością grzybni i/lub owocnika *P. gigantea* pobrano za pomocą świdra Presslera próbki drewna (po 2 próbki z 3 pniaków dla danego wariantu). Pierwsza próbka pobierana była prostopadłe do powierzchni ścięcia pniaka, tuż przy korze, druga natomiast pobierana była prostopadłe do pnia, po usunięciu kory, ok. 5 cm poniżej powierzchni ścięcia. Próbkę pobierano także przy użyciu siekiery, odcinając fragmenty drewna prostopadłe do powierzchni ścięcia (tab. 2).

Próbki drewna zostały wyłożone w komorze z laminarnym przepływem powietrza do szalek Petriego ze sterylnym podłożem hodowlanym PDA (Potatoe Dextrose Agar – Merck, Niemcy), które ogranicza rozwój niepożądanych organizmów grzybowych i bakterii, natomiast stymuluje wzrost grzybni *P. gigantea*. Hodowla prowadzona była w temperaturze 20°C przez około 5 dni, wyhodowane kultury *P. gigantea* pasażowano na nowe podłoża PDA w celu uzyskania czystych kultur.

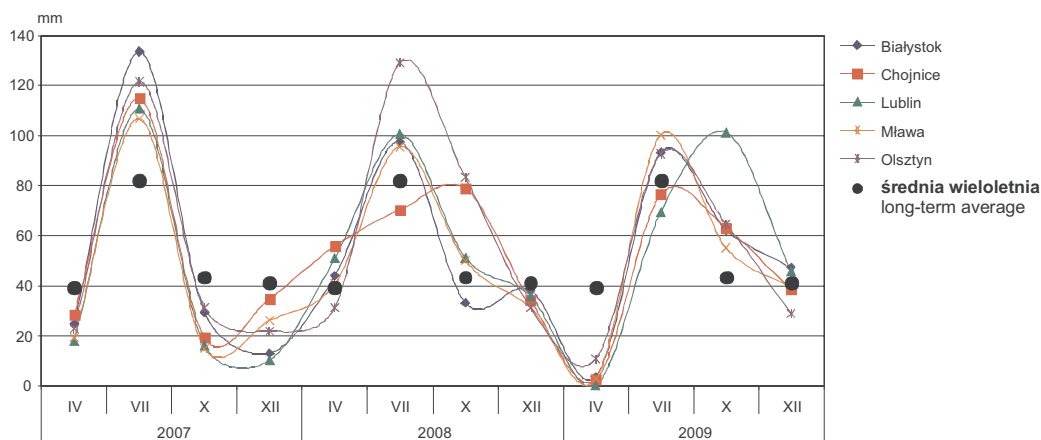
Z otrzymanych kultur izolowano DNA za pomocą zestawu odczynników według wskazówek producenta (GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit – SigmaAldrich). Pierwszym etapem izolacji DNA było zmiażdżenie grzybni w moździerzu w obecności ciepłego azotu. W reakcji PCR użyto startera o sekwencji 5'DHB(CGA); 3', gdzie D = (G, A lub T), H = (C, A lub T), B = (G, T lub C). Reakcję amplifikacji RAMS (Hantula et al. 1996) przeprowadzono w końcowej objętości 25 µl, gdzie stężenie odczynników wynosiło: bufor PCR×1 (Qiagen); 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 2 µM startera; 2,5 U polimerazy. Matrycą w reakcji było 50 ng DNA *P. gigantea*. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, USA). Produkty amplifikacji zostały rozdzielone w żelu agarozowym (Prona) z dodatkiem SynerGel

(Diversified Biotech) o stężeniu 0,8% każdego ww. odczynnika w obecności buforu TBE. Produkty RAMS wizualizowano w świetle UV po wybarwieniu żelu bromkiem etydydy o stężeniu 0,5 µg/ml. Jako markera wielkości użyto 100 bp ladder (Invitrogen).

Uzyskane wyniki porównano pod względem istotności różnic między średnimi wartościami udziału (%) pniaków z grzybnią i z owocnikiem w wariantach zabiegowych – preparat, termin (program STATGRAHICS™ Centurion). W przypadku braku zgodności danych z rozkładem normalnym poddano je transformacji Blissa. Istotność różnic między średnimi oceniano testem Tukeya. Do weryfikacji istotności różnic przyjęto 95% przedział ufności ($p < 0,05$). Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA zawarto w tabelach oraz na wykresach, oznaczając literami arabskimi grupy homogeniczne, odrębnie dla każdego preparatu.

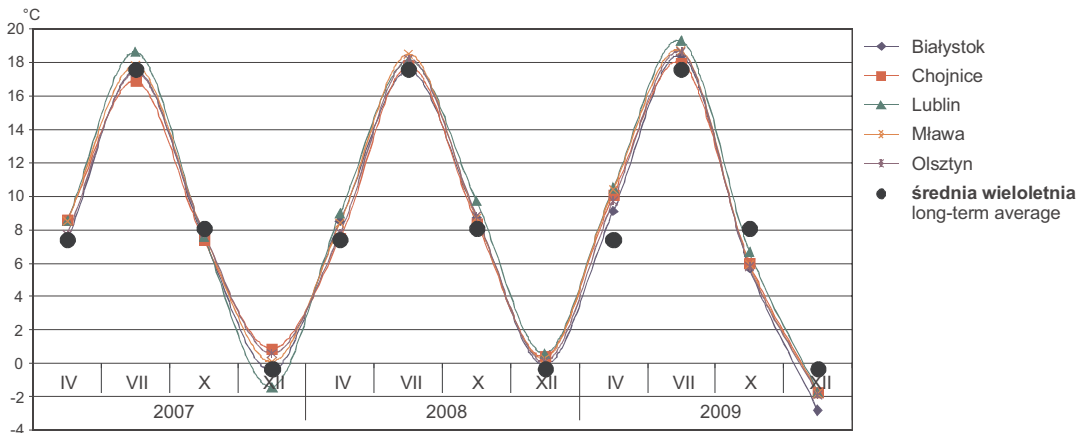
Dane dotyczące przebiegu pogody

Do oceny warunków pogodowych panujących na terenie nadleśnictw w czasie przeprowadzenia zabiegów na powierzchniach doświadczalnych oraz w czasie rozwoju grzyba *P. gigantea* w tkankach pniaka wykorzystano dane meteorologiczne ze stacji synoptycznych Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej położonych najbliższej obiektów doświadczalnych: Białystok, Chojnice, Lublin, Mława, Toruń i Warszawa. Analizie poddano podstawowe parametry meteorologiczne: miesięczną sumę opadów atmosferycznych i średnią miesięczną temperaturę powietrza dla kwietnia, lipca, października i grudnia w okresie 3 lat (2007–2009). Dane źródłowe zaczerpnięto z ogólnodostępnych Biuletynów Państwowej Służby Hydrologiczno-Meteorologicznej.



Rycina 1. Przebieg wielkości opadów atmosferycznych w wybranych miesiącach w okresie 2007–2009 w pięciu stacjach synoptycznych

Figure 1. Precipitation in selected months in years 2007–2009 (data from five synoptic stations)



Rycina 2. Przebieg średnich miesięcznych wartości temperatury powietrza w wybranych miesiącach w okresie 2007–2009 w pięciu stacjach synoptycznych

Figure 2. Average monthly air temperatures in selected months in years 2007–2009 (data from five synoptic stations)

3. Wyniki

Przebieg pogody

Podczas badań w danym miesiącu wystąpiły opady atmosferyczne o dużej zmienności przestrzennej ich wielkości, jak również istotnej rozbieżności z wartościami średnich wieloletnich (norma z okresu 1971–2000) (ryc. 1). Dotyczy to szczególnie sezonu wegetacyjnego, a zwłaszcza kwietnia 2009 r., lipca 2007 i 2008 r. oraz października 2008 i 2009 r. Najbardziej niekorzystne warunki wilgotnościowe na przestrzeni analizowanego okresu panowały w kwietniu 2009 r., największy opad zanotowano w Olsztynie, zaledwie 10 mm, natomiast w lipcu każdego roku opady kształtowały się w granicach normy lub były od niej znacznie wyższe. Przestrzenne zróżnicowanie wielkości opadów wskazuje na największe różnice w lipcu 2008 r. (pomiędzy stacją w Olsztynie i Chojnicach), październiku 2008 r. (pomiędzy stacją w Olsztynie i Białymstoku) i październiku 2009 r. (pomiędzy stacją w Lublinie i Mławie).

Analiza przebiegu średnich temperatur powietrza w poszczególnych analizowanych miesiącach wskazuje na dość dużą zbieżność wskazań (ryc. 2). Różnice w średnich wartościach temperatury pomiędzy obiektami (stacjami) kształtowały się w granicach 0,4–2,3°C, przy czym największe rozbieżności stwierdzono w lipcu i grudniu 2007 r. i 2009 r. Najwyższą temperaturę zarejestrowano w Lublinie w lipcu, zarówno w 2007, jak i 2009 r., najniższą zaś w Chojnicach (2007 r.) i Białymstoku (2009 r.). Najniższe temperatury w grudniu zanotowano w 2009 r.; średnia temperatura powietrza dla wszystkich stacji miała wartość ujemną, najniższą zarejestrowano w Białymstoku (–2,8°C). Z kolei w 2007

r. warunki termiczne były zróżnicowane przestrzennie, najcieplejszym rejonem były okolice Chojnic, najniższe temperatury odnotowano w Lublinie. Miesiącami najbardziej odbiegającymi termicznie od normy wieloletniej były kwiecień, październik i grudzień 2009 r.

Obecność grzybni podkorowej *Phlebiopsis gigantea*

Na podstawie oceny symptomów zasiedlenia inokulowanych pniaków, tzn. obecności grzybni podkorowej i/lub owocnika obliczono odsetek pniaków charakteryzujących się powyższymi cechami. Analiza statystyczna otrzymanych wyników dla poszczególnych preparatów wykazała brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy występowaniem na pniakach zabiegowych grzybni podkorowej w porównywanych terminach zabiegów. Wyjątkiem jest preparat PgIBL, którego zastosowanie jesienią 2007 r. wyraziło się istotnie większą ($p=0,0054$) udatnością niż jesienią 2008 r. (tab. 3)

Analizując ogólnie efekty zabiegu pod względem rozwoju grzybni podkorowej, można stwierdzić bardzo wysoką jego udatność, w przypadku wszystkich preparatów wyniosła ona około 70–80% pniaków. Najliczniej (średnio 78% liczby ocenianych pniaków) obecność grzybni była stwierdzana w pniakach zabezpieczanych obydwoma preparatami Rotstop, zarówno w zabiegu wiosennym, jak i w obu terminach jesiennych. W przypadku preparatu PgIBL stwierdzono zarówno najwyższą, jak i najniższą udatność zabiegu, wykonanego odpowiednio jesienią 2007 r. (średnio 92,8%) i wiosną 2008 r. (średnio 69,8% pniaków z symptomami). Efektywność zabiegu z użyciem preparatu PGSuspension była również wysoka, odsetek pniaków z grzybnia zawierał się w przedziale 72–76%.

Tabela 3. Porównanie udatności zabiegów z użyciem 4 pre-paratów biologicznych w trzech terminach zabiegów wyrażonej udziałem pniaków z grzybnią podkorową *P. gigantea* (%)

Table 3. Comparison of success performance of treatment with 4 biological preparations in three treatment terms. Treatment success is expressed as an occurrence of *P. gigantea* mycelium under the bark of stumps (%).

Porównywane terminy zabiegów Comparison of treatment term	Udział pniaków z grzybnią podkorową (%) Occurrence of mycelium under the bark of stumps (%)			
	RotstopF	RotstopS	PGSuspension	PgIBL
Jesień 2007 Autumn 2007	73,7	74,0	72,2	92,8
Wiosna 2008 Spring 2008	79,3	78,6	76,8	69,8
<i>p</i>	0,3095	0,4788	0,5517	0,0817
Wiosna 2008 Spring 2008	79,3	78,6	76,8	69,8
Jesień 2008 Autumn 2008	82,1	81,5	76,5	79,2
<i>p</i>	0,7639	0,9522	0,8721	0,4954
Jesień 2007 Autumn 2007	73,7	74,0	72,2	92,8
Jesień 2008 Autumn 2008	82,1	81,5	76,5	79,2
<i>p</i>	0,1530	0,4807	0,5836	0,0054*

* pogrubioną czcionką oznaczono istotność różnic ($p < 0,05$)
statistically significant differences are printed in bold ($p < 0,05$)

Obecność owocników *Phlebiopsis gigantea*

Spośród ocenianych preparatów zagranicznych najlepszy wynik (tab. 4) pod względem udziału pniaków z owocnikami dał PGSuspension zastosowany wiosną 2008 r. (49% pniaków), podczas gdy w zabiegach jesiennych z wykorzystaniem tego preparatu obecność owocników była niewielka (10–20% pniaków). W pozostałych terminach zabiegów owocniki najliczniej występowały na pniakach zabezpieczonych RotstopS (maksymalna udatność: zabieg – wiosna 2008 r. – 46%). Porównanie wszystkich preparatów pod względem frekwencji owocników wskazało na PgIBL; najliczniejszy udział pniaków z owocnikiem *P. gigantea* (niemal 60%) stwierdzono w przypadku zabiegu przeprowadzonego jesienią 2007 r.

Duże różnice w owocnikowaniu grzyba na pniakach zabezpieczonych badanymi preparatami w analizowa-

Tabela 4. Porównanie udatności zabiegów z użyciem 4 preparatów biologicznych w trzech terminach zabiegów wyrażonej udziałem pniaków z owocnikami *P. gigantea* (%)

Table 4. Comparison of success performance of treatment with 4 biological preparations in three treatment terms. Treatment success is expressed as an occurrence of *P. gigantea* fruiting bodies on stumps (%).

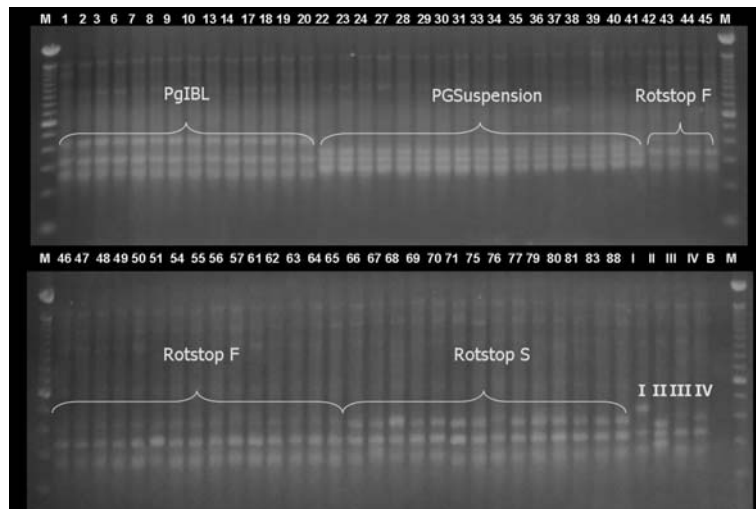
Porównywane terminy zabiegów Comparison of treatment term	Udział pniaków z owocnikami (%) Occurrence of <i>P. gigantea</i> fruiting bodies on stumps (%)			
	RotstopF	RotstopS	PGSuspension	PgIBL
Jesień 2007 Autumn 2007	16,3	23,2	18,9	59,8
Wiosna 2008 Spring 2008	30,1	46,0	49,2	42,4
<i>p</i>	0,2440	0,1415	0,0228*	0,1625
Wiosna 2008 Spring 2008	30,1	46,0	49,2	42,4
Jesień 2008 Autumn 2008	18,6	34,7	9,1	20,1
<i>p</i>	0,3709	0,6409	0,0009*	0,0706
Jesień 2007 Autumn 2007	16,3	23,2	18,9	59,8
Jesień 2008 Autumn 2008	18,6	34,7	9,1	20,1
<i>p</i>	0,6532	0,1479	0,3086	0,0008*

* pogrubioną czcionką oznaczono istotność różnic ($p < 0,05$)
statistically significant differences are printed in bold ($p < 0,05$)

nych latach potwierdziły obliczenia statystyczne (tab. 4). Wynika z nich, iż w przypadku preparatu PGSuspension zabieg przeprowadzony wiosną 2008 r. był istotnie bardziej efektywny niż obydwa zabiegi jesiennie. Kolejne istotne statystycznie różnice dotyczą frekwencji owocników dla preparatu PgIBL; zabieg przeprowadzony jesienią 2007 r. okazał się zdecydowanie efektywniejszy pod tym względem niż zabieg wykonany rok później.

Ocena zgodności DNA grzybni *P. gigantea* z DNA grzybni w preparacie

Izolaty *P. gigantea* wyhodowane z tkanek niemających styku ze środowiskiem zewnętrznym, a więc pobieranych świdrem prostopadle do pnia, po zdjęciu kory oraz odciętych siekierą po usunięciu górnej warstwy pnia, wykazywały najlepszy wzrost na pożywce agarowej, natomiast z fragmentów tkanek wycinanych świdrem prostopadle do powierzchni ścinki, wraz z



Rycina 3. Wynik reakcji RAMS dla badanych izolatów *P. gigantea*. Numery ścieżek odpowiadają oznaczeniom izolatów w tabeli 2. Symbolami M oznaczono molekularny marker wielkości, I – izolat wzorcowy PgIBL, II – izolat wzorcowy PGSuspension, III – izolat wzorcowy RotstopF, IV – izolat wzorcowy RotstopS, B – próba ślepa (woda)

Figure 3. Examples of RAMS-patterns of investigated *P. gigantea* isolates. The number of lane corresponds with the isolate symbol in Table 2. Lanes M – molecular weight marker, Lane I – PgIBL representative isolate, Lane II – PgSuspension representative isolate, Lane III – RotstopF representative isolate, Lane IV – RotstopS representative isolate, B – negative control (water).

P. gigantea izolowano bardzo często inne gatunki grzybów, których szybki wzrost uniemożliwiał wyprowadzenie czystych kultur *P. gigantea*.

Na podstawie obecności charakterystycznych prążków potwierdzono zróżnicowanie szczepów używanych w preparatach biologicznych do zabezpieczania pniaków (ryc. 3). Preparaty PgIBL oraz PGSuspension można z łatwością odróżnić na podstawie markerów RAMS od preparatów RotstopF i RotstopS. Przeprowadzone badania nie wykazały występowania w badanych próbkach hybryd lub obcych szczepów *P. gigantea*, o których obecności świadczyłyby nietypowe markery molekularne. Oznacza to, że w tkankach zabezpieczanych pniaków rozwijały się izolaty grzyba stanowiącego substancję aktywną zastosowanych preparatów.

4. Omówienie wyników i wnioski

Wyniki analizy molekularnej badanych próbek drewna, pobranych z inokulowanych pniaków, potwierdziły obecność *Phlebiopsis gigantea* tożsamego z izolatami grzyba wprowadzanego w danym preparacie. W wyniku amplifikacji wielu miejsc w genomie *P. gigantea* powstał bowiem szereg produktów PCR (tab. 5), charakterystyczny dla każdego szczepu z danego preparatu (Hantula et al. 1996; Vainio et al. 1998). Stwierdzono jednakże, że rozróżnienie preparatów Rotstop między sobą na podstawie markerów RAMS

Tabela 5. Markery molekularne charakterystyczne dla wybranych szczepów *P. gigantea*

Table 5. Molecular markers typical of selected *P. gigantea* strains

Preparat Preparation	Wielkość markerów RAMS (pz) Size of RAMS markers (bp)
RotstopF	(400), 330, 265
RotstopS	400, 330, 265
PGSuspension	380, 330, 280
PgIBL	440, 330, 265

jest utrudnione i polega na ocenie intensywności świecenia markera o masie ok. 400 pz, w odniesieniu do wzorca (Pilot 2005; Rutkowski 2005).

Uzyskane wyniki analiz molekularnych wskazują zarówno na trwałość (obecność w ocenianym okresie) wprowadzonego inokulum, brak innych szczepów *P. gigantea* teoretycznie obecnych w środowisku, jak i na poprawność metody genetycznej zastosowanej do badania tożsamości DNA grzyba obecnego w drewnie pniaka.

Śród wszystkich testowanych preparatów najwyższą efektywnością, mierzoną występowaniem grzybni podkorowej, wykazał się preparat porównawczy PgIBL zastosowany w zabiegu wykonanym jesienią 2007 r. (ponad 90% pniaków). W odniesieniu do analogicznych wyników tego preparatu otrzymanych w terminie jesiennym w 2008 r. różnice były statystycznie

istotne. Może to oznaczać, że warunki pogodowe jesienią 2007 oraz zimą i wiosną 2008 r. sprzyjały w większym stopniu aktywnemu rozwojowi grzybni w preparacie PgIBL niż warunki zaistniałe po zabiegu jesienią 2008 r. Zabiegi z użyciem preparatów pochodzenia zagranicznego dały zadowalające (choć nieco gorsze od PgIBL) rezultaty, przy czym w przypadku obydwu preparatów Rotstop najkorzystniejszym terminem zabiegu okazała się jesień 2008 r., zaś – PGSuspension również wiosna tegoż roku. Dość wyrównane dla wszystkich terminów zabiegów wyniki dla preparatów liofilizowanych wskazują, że pogoda zarówno jesienią 2007 r., jak i jesienią 2008 r. oraz wpływ zimy oraz warunki atmosferyczne wiosną i latem nie ograniczały kiełkowania zarodników ani wzrostu grzybni tak inokulowanych pniaków. Oznacza to także, że dawki zastosowanych preparatów były wystarczające dla udanej kolonizacji pniaka, a zabieg został wykonany prawidłowo.

Owocnikowanie grzyba *P. gigantea* na inokulowanych pniakach generalnie występowało w mniejszym nasileniu niż grzybnia podkorowa i obejmowało średnio 20–40% pniaków, w zależności od preparatu. Owocniki *P. gigantea* najczęściej stwierdzane były w pniakach zabezpieczanych preparatem PgIBL (średnio 40%) i analogicznie do frekwencji grzybni podkorowej najbardziej sprzyjającym ich tworzeniu był jesienny termin zabiegu w 2007 r. Z kolei wiosenny termin zabiegu okazał się najkorzystniejszy dla tworzenia się owocników na pniakach zabezpieczanych preparatami zagranicznymi, z których najlepszy rezultat (49% pniaków) dał PGSuspension. Wynik ten statystycznie istotnie różnił się od wyników otrzymanych w zabiegach jesiennych 2007 r. i 2008 r. (odpowiednio 18,9% i 9,1% pniaków), co potwierdza, że warunki rozwoju (wyrażonego również najwyższą frekwencją grzybni podkorowej) grzyba, były dla preparatu PGSuspension optymalne w Polsce wiosną 2008 r. i w kolejnych miesiącach. Analiza wyników (prezentowanych w tabelach 3 i 4), przeprowadzonych w latach 2007–2008 zabiegów ochronnych, jednoznacznie wskazuje na termin jesienny 2007 r. jako korzystny dla zastosowania preparatu PgIBL, a termin wiosenny 2008 r. dla PGSuspension.

Uzyskane wyniki wskazują, że:

1) stosowanie środków ochrony pniaków przed hubą korzeni, zawierających liofilizowane zarodniki grzyba konkurencyjnego *Phlebiopsis gigantea*, jest równie skuteczne, jak sprawdzony preparat PgIBL;

2) grzybnia *P. gigantea* aktywnie rozwija się pod korą pniaka i jest obecna w części bielastej pniaka oraz w napływach korzeniowych już po roku od wykonania zabiegu, niezależnie od terminu jego przeprowadzenia;

3) na wytwarzanie owocników grzyba istotny wpływ ma przebieg pogody w okresie wykonywania zabiegu,

przy czym przy stosowaniu preparatów liofilizowanych okres wiosny z opadami jest bardziej korzystny.

Podziękowanie

Autorzy pragną podziękować Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych za umożliwienie prowadzenia badań (BLP 329) oraz Panom Nadleśniczym i pracownikom nadleśnictw za udzieloną pomoc i życzliwość w trakcie wykonywania zabiegów i dokonywania ich ocen.

Literatura

- Hantula J., Dusabenyagasani M., Hamelin R. C. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 26: 159–166.
- Łakomy P. 2001. Comparison of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stump treatment with PG and ROTSTOP based on *Phlebiopsis gigantea* (Fr.: Fr.) Julich. *Forestry*, 4: 139–146.
- Łakomy P., Zarakowski T. 2000. Pine wood decomposition ability of different *Phlebiopsis gigantea* isolates. *Acta Mycologica*, 35(2): 323–329.
- Nelson R. R. 1993. Interspecific hybridization in the fungi. *Annual Review of Microbiology*, 17: 31–48.
- Pilot M. 2005. Zastosowanie metod genetyki molekularnej w badaniach ekologicznych, w: Zastosowanie metod molekularnych w badaniach ekologicznych (red. M. Pilot, R. Rutkowski). Warszawa, Muzeum i Instytut Zoologii PAN: 7–22. ISBN 8388147056.
- Pratt J. E., Niemi M., Sierota Z. H. 2000. Comparison of three products based on *Phlebiopsis gigantea* for the control of *Heterobasidion annosum* in Europe. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 467–477.
- Rutkowski R. 2005. Sekwencje mikrosatelitarne i ich wykorzystanie w badaniach zoologicznych, w: Zastosowanie metod molekularnych w badaniach ekologicznych (red. M. Pilot, R. Rutkowski). Warszawa, Muzeum i Instytut Zoologii PAN: 65–75. ISBN 8388147056.
- Schardl C. L., Craven K. D. 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology*, 12(11): 2861–73.
- Sierota Z. 1995. Rola grzyba *Phlebiopsis gigantea* (Fr.: Fr.) Julich w ograniczaniu huby korzeni w drzewostanach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na gruntach porolnych. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa*, ser. A, 810: 1–180.
- Sierota Z. H. 2003. Costs and effects of biological control of root rot in Poland, in: Root and Butt Rot of Forest Trees (eds. Laflamme, G., Bérubé, J.A., Bussières, G.), 10th International Conference on Root and Butt Rots. Canada, Québec: 194–196. ISBN 0662333322.
- Thor M., Stenlid J. 1998. *Heterobasidion annosum* infection following mechanized first thinning and stump treatment

- in *Picea abies*, in: Root and Butt Rots of Forest Trees. (eds C. Delatour, B. Marcais, J. J. Guillaumin, B. Lung-Escarment). 9th International Conference on Root and Butt Rots. France, Carcans-Maubuisson, INRA: 397–407. ISBN 2738008216.
- Vainio E., Korhonen K., Hantula J. 1998. Genetic variation in *Phlebiopsis gigantea* as detected with random amplified microsatellite (RAMS) markers. *Mycological Research*, 102(2): 187–192.
- Żółciak A. 2005. Wstępne wyniki inokulacji pniaków świerkowych preparatem biologicznym z żyłakiem olbrzymim (*Phlebiopsis gigantea*). *Leśne Prace Badawcze*, 4: 29–40.
- Żółciak A. 2007. Scots pine stumps inoculation with *Phlebiopsis gigantea* biological preparations. *Leśne Prace Badawcze*, 2: 77–94.
- Żółciak A., Kornilowicz-Kowalska T. A., Sierota Z., Iglík H. 2008. Enzymatic activity of *Phlebiopsis gigantea* isolates. *Acta Mycologica*, 43(1): 41–48.
- Żółciak A., Sierota Z. 2010. Rejestracja i stosowanie grzyba *Phlebiopsis gigantea*. *Głos Lasu*, 1: 7–9.