

Instytut Dendrologii PAN

**Struktura zbiorowisk grzybów mikoryzowych
dębu szypułkowego i bezszypułkowego
na obszarze Płyty Krotoszyńskiej**

Marcin Pietras

**Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Marii Rudawskiej**

Kórnik 2013

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować

Pani Profesor Marii Rudawskiej, za wprowadzenie w świat mikoryz, opiekę naukową i cierpliwość, której doświadczałem podczas wykonywania pracy doktorskiej, oraz za cenne i pomocne uwagi, zarówno w trakcie badań, jak i przygotowania niniejszej rozprawy.

Panu dr Tomaszowi Leskiemu i dr Leszkowi Karlińskiemu, za wszelką okazaną pomoc w trakcie prowadzenia badań.

Panu Nadleśniczemu Andrzejowi Wawrzyniakowi, mgr. inż. Tomaszowi Kwiecińskiemu, mgr. inż. Ryszardowi Szymakniewiczowi oraz pracownikom Nadleśnictwa Piaski, w szczególności leśniczym: mgr. inż. Romanowi Weberowi, inż. Rafałowi Bayerowi, inż. Krzysztofowi Serkowi i mgr. inż. Przemysławowi Jagle za umożliwienie przeprowadzenia prac terenowych na terenie ich leśnictw oraz za wszelką pomoc w trakcie wykonywania badań.

Wszystkim pracownikom Instytutu Dendrologii PAN, którzy w jakikolwiek sposób przyczynili się do powstania tej pracy.

Pracownikom Pracowni Badań Mikoryzy, a w szczególności Pani Halinie Narożnej i Marii Wójkiewicz, za cenną pomoc w badaniach laboratoryjnych oraz za życzliwość i miłą atmosferę pracy.

Moim Rodzicom za wsparcie.

Pracę tą dedykuję
mojej żonie Kasi

Spis treści

Streszczenie	6
Abstract	8
1. Wstęp	9
1.1. Symbioza mikoryzowa	9
1.2. Ektomikoryza	10
1.3. Dlaczego badamy zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych?	12
1.4. Dąb szypułkowy oraz dąb bezszypułkowy, jako gatunki obligatoryjnie mikoryzowe	12
1.4.1. Znaczenie dębu szypułkowego i bezszypułkowego w gospodarce leśnej	12
1.4.2. Historia badań nad mikoryzą dębów	14
1.4.3. Badania zbiorowisk GEM oparte na obserwacjach występowania owocników	15
2. Cele pracy	17
2.1. Cel 1. Określenie dynamiki zbiorowisk grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej	18
2.2. Cel 2. Określenie zróżnicowania GEM wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów	20
2.3. Cel 3. Określenie zbiorowiska grzybów mikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej	23
3. Materiał i Metody	26
3.1. Opis powierzchni badawczych	26
3.2. Część I. Zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej	28
3.2.1. Określenie zróżnicowania GEM występujących w szkółce leśnej Miranowo	28
3.2.2. Określenie dynamiki zbiorowiska grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej	30
3.2.3. Zawartość cukrów niestrukturalnych w korzeniach	31
3.3. Część II. Zróżnicowanie grzybów ektomikoryzowych wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami	

	w układzie chronosekwencji drzewostanów	32
3.4.	Część III. Zbiorowiska grzybów mikoryzowych zamierających dąbrów na Płycie Krotoszyńskiej	33
3.5.	Jakościowa i ilościowa analiza morfologiczna mikoryz	36
3.6.	Analizy molekularne i identyfikacja gatunkowa mikoryz	38
	3.6.1. Ekstrakcja DNA	38
	3.6.2. Amplifikacja regionu ITS rDNA w reakcji PCR	39
	3.6.3. Analiza sekwencji nukleotydowych regionu ITS rDNA	41
	3.6.4. Analizy filogenetyczne	42
3.7.	Analizy statystyczne	42
4.	Wyniki	44
4.1.	Dynamika zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu w szkółce leśnej	44
	4.1.1. Analiza zbiorowiska GEM Szkołki Leśnej Miranowo	44
	4.1.2. Dynamika zbiorowisk grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu w szkółce leśnej	44
4.2.	Zróżnicowanie grzybów ektomikoryzowych wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów	48
	4.2.1. Struktura zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych w analizowanym układzie chronosekwencji	51
4.3.	Zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej	57
	4.3.1. Ocena zdrowotności analizowanych drzewostanów	57
	4.3.2. Struktura zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej	58
4.4.	Analiza filogenetyczna zidentyfikowanych przedstawicieli rodziny <i>Thelephoraceae</i>	64
5.	Dyskusja	66
5.1.	Dynamika zbiorowisk grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej	66
5.2.	Zróżnicowanie grzybów ektomikoryzowych wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów	71

5.3.	Zbiorowiska grzybów mikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej	77
5.4.	Dyskusja ogólna	82
5.4.1.	Bogactwo gatunkowe zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych u badanych dębów	82
5.4.2.	Skuteczność wykorzystania metod molekularnych	85
5.4.3.	Różnorodność GEM związanych z dąbrowami Płyty Krotoszyńskiej	86
6.	Podsumowanie i weryfikacja hipotez badawczych	92
7.	Wnioski	94
8.	Bibliografia	95
9.	Fotografie mikoryz zidentyfikowanych w niniejszych badaniach	110

Streszczenie

Dąb szypułkowy (*Quercus robur* L.) i bezszypułkowy (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) należą do najważniejszych ekonomicznie i ekologicznie drzew lasów strefy umiarkowanej Europy. Oba gatunki zaliczane są do drzew obligatoryjnie ektomikoryzowych, co oznacza, że nawiązanie symbiozy mikoryzowej jest niezbędne dla ich prawidłowego wzrostu i rozwoju rośliny. Celem niniejszej rozprawy było kompleksowe opisanie jakościowej i ilościowej struktury zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych (GEM) na dębach rosnących na terenie Płyty Krotoszyńskiej, uważanej za największy obszar drzewostanów dębowych w Polsce. Badania zostały podzielone na trzy odrębne części, które skupiły się na 1) opisanu zmian jakie zachodzą w zbiorowisku GEM dębów w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej; 2) określeniu zróżnicowania grzybów mikoryzowych wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów 3) zbadaniu zbiorowiska GEM zamierających drzewostanów dębowych.

Łącznie z 15 drzewostanów (12 drzewostanów reprezentowało 4 fazy rozwojowe drzew, 3 drzewostany różne fazy zamierania lasu) i szkółki leśnej pobrano 460 prób korzeniowych. Mikoryzy identyfikowane były przy zastosowaniu metody morfologicznej oraz molekularnej, wykorzystującej sekwencjonowanie fragmentu ITS rDNA powielonego w reakcji PCR. Analiza 165 jednorocznych siewek dębu oraz 103 260 wierzchołków mikoryzowych pozwoliła na identyfikację 97 taksonów GEM, z których najczęstszym i najliczniej występującym był grzyb z kompleksu *Cenococcum geophilum*.

W doświadczeniu szkółkowym odnotowano 9 gatunków GEM. Kolonizacja korzeni drobnych rozpoczęła się po 50 dniach od wysiewu żołądki. W tym czasie obserwowano największą zawartością cukrów niestrukturalnych w korzeniach drobnych. Infekcja siewek przez patogenicznego grzyba *Erysiphe alphitoides* spowodowała wzrost zawartości skrobi w korzeniach oraz spowodowała masowe zamieranie mikoryz.

Badania chronosekwencji drzewostanów pozwoliły na identyfikację 75 taksonów GEM. Kompozycja gatunkowa GEM badanych drzewostanów zmieniała się najbardziej w momencie przejścia z fazy uprawy do fazy młodnika. W fazie rozwojowej upraw odnotowano największy udział grzybów workowych głównie z grupy *Hymenoscyphus ericae*. W późniejszych fazach rozwojowych następuje stabilizacja zbiorowiska, a zmiany w strukturze grzybów EM są niewielkie. Wraz z wiekiem drzewostanów zaobserwowano wzrastającą liczbę gatunków *Russula* spp.

Badania przeprowadzone z zamierających drzewostanach dębowych ujawniły występowanie 37 taksonów GEM, z których najczęstszymi i najliczniejszymi były

Cenococcum geophilum oraz *Lactarius quietus*. Drzewostan w najgorszym stanie zdrowotnym charakteryzował się najniższym bogactwem gatunkowym GEM. Wraz ze wzrostem stopnia uszkodzeń pojedynczych drzew zwiększała się obfitość występowania grzyba *L. quietus*.

Spośród 97 taksonów zidentyfikowanych w niniejszej rozprawie najwyższym bogactwem gatunkowym (17 taksonów) cechowała się rodzina *Thelephoraceae*. Badania pozwoliły na identyfikację gatunków GEM jak dotąd nie notowanych w Polsce (*Tomentella castanea*, *T. liliacingrisea*, *T. italica*), jak również kilkunastu gatunków rzadkich w skali kraju (np. *Tomentella stupasa*, *T. ellisii*, *Byssocorticium atrovirens*, *Tuber puberulum* czy *Russula graveolens*).

Abstract

Pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) are a widespread species of ecological and economic importance in Europe. Both are obligatorily associated with ectomycorrhizal fungi (EMF). Until now several papers describing ECM communities of pedunculate and others oak species in different ecosystems and site conditions has been published, but none of the previous studies has focused on comprehensive description of EMF communities from one distinctive region. Therefore the aim of this study was to present extensive data describing the fungal species richness and composition of oak seedlings growing in bare-root forest nurseries, trees along a chronosequence of stands and in the various declining tree stage.

Study sites were located in Krotoszyńskie Forests considered as the largest oak forests in Poland. Altogether 460 soil samples were taken from 15 study sites and nursery. Morphological assessment and molecular approach based on PCR and sequencing of the fungal ITS rDNA were performed to identify fungal partner of ectomycorrhizas.

Alltogether 97 EMF taxa associated with oaks have been recorded.

In nursery experiment altogether 9 EMF taxa has been recorded during the first year of seedlings growth. First mycorrhizas of *Scleroderma verrucosum* were observed 50 days after acorns outplanting. Nursery experiment also shown that leave infection by pathogenic fungus, *Erysiphe alphitoides* strongly reduce number of living ectomycorrhizas.

Chronosequence study revealed high diversity of EMF (75 taxa) and has shown correlation between relative abundance of some group of fungi and age of the trees. *Cadophora/Rhizoscyphus/Meliniomycetes* group was strongly connected with youngest (regeneration) stage of stand development. On the other hand number of *Russula* spp. increased with stand age from one taxon in regeneration stage to nine species in mature tree stage. The most common fungus was *Cenococcum geophilum aggregate* with relative abundance ranging 7,11% to 53,01%.

In declining stands 37 EMF taxa were identified. Lowest number of EMF species richness and highest abundance of *L. quietus* were noted for oak stands with high average defoliation level. My study clearly shown that health status of trees affect EMF community composition and richness, especially regarding stand-level estimation.

This study significantly increased our knowledge about ECM fungal symbionts accompanying pedunculate and sessile oak trees. Thelephoroid (17taxa) and russuloid fungi (14 taxa) has been found as the most common group of oak symbionts,. Three EMF taxa (*Tomentella castanea*, *T. italica*, *T. liliosingrisea*) has been noted for the first time in Poland.

1. Wstęp

1.1 Symbioza mikoryzowa*

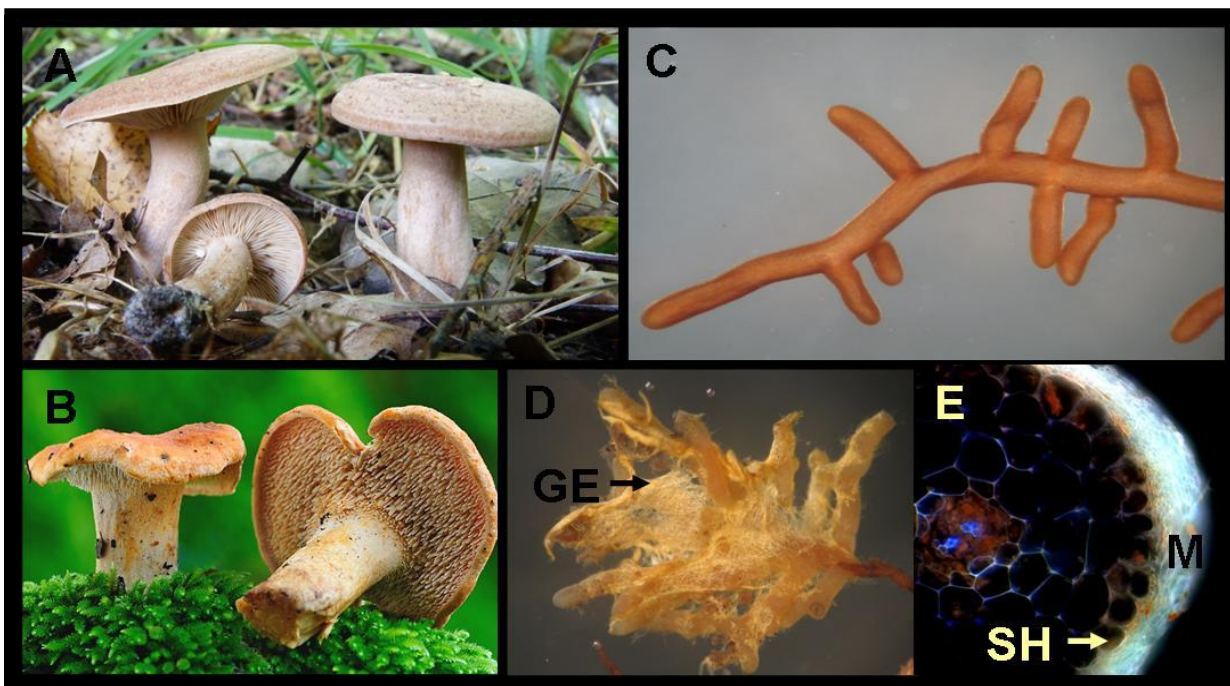
Termin mikoryza (z greckiego: *mykes* = grzyb, *rhiza* = korzeń) określa symbiotyczny, mutualistyczny związek pomiędzy grzybami a korzeniami roślin. Po raz pierwszy termin ten zastosowany został w roku 1885 przez niemieckiego fitopatologa Alberta Bernarda Franka, który przeprowadził szeroko zakrojone badania występowania mykoryz u drzew oraz postawił hipotezę o odżywianiu się roślin poprzez mikoryzy (Frank 1885). Hipotezy i obserwacje Franka doprowadziły do zmiany myślenia o patogeniczności grzybów mikoryzowych, na rzecz rewolucyjnego poglądu o mutualistycznej, czyli obopólnie korzystnej symbiozie partnera roślinnego (fytobionta) i grzybowego (mykobionta). Nawiązywanie symbiozy mikoryzowej z grzybami charakterystyczne jest dla około 90% gatunków roślin naczyniowych występujących na Ziemi, co czyni tą zależność najbardziej powszechnym związkiem symbiotycznym w przyrodzie. W toku ewolucji ukształtowały się cztery główne typy związków mikoryzowych, które różnią się cechami anatomicznymi i morfologicznymi tj.: mikoryza arbuskularna, ektomikoryza, mikoryza roślin wrzosowatych (erikoidalna) oraz storczykowatych. Większość opracowań wyróżnia ponadto mniej rozpowszechnione typy mikoryz: ektendomikoryzę, mikoryzę arbutoidalną i monotropoidalną. Poprzez przywiązanie do różnych grup roślin każdy z typów mikoryz spełnia różną funkcję ekologiczną. Dominującym typem symbiozy w świecie roślin jest mikoryza arbuskularna. Przyjmuje się, że we wszystkich strefach klimatycznych ponad 250000 gatunków lądowych roślin naczyniowych związanych jest ściśle z grzybami arbuskularnymi. Mikoryza arbuskularna tworzona jest przez filogenetycznie najstarszą grupę grzybów zakwalifikowaną do typu *Glomeromycota*. Uważa się, że w procesie ewolucyjnym to właśnie grzyby arbuskularne koewoluowały z pierwszymi roślinami, umożliwiając im wyjście na ląd. Dane paleontologiczne wskazują że miało to miejsce w ordowiku, drugim okresie ery paleozoicznej, około 450 milionów lat temu. (Pirozynski i Malloch, 1975; Selosse i Le Tacon 1998). Na podstawie zmian ewolucyjnych, jakie zachodziły w królestwie roślin na przestrzeni ostatnich 450 milionów lat, uważa się, że z roślin tworzących mikoryzę arbuskularną wykształciły się rośliny ektomikoryzowe, storczykowate oraz rośliny wtórnie

* W niniejszym opracowaniu stosuje się termin „mikoryza” zgodnie z tytułem pracy doktorskiej przyjętym przez radę naukową ID PAN w Kórniku. Zgodnie z decyzją Rady Języka Polskiego przy Prezydium Polskiej Akademii Nauk z dnia 27.VI.2011, która opowiedziała się za przyjęciem jako jedynie poprawnej formy zapisywanej przez „y”, czyli: mykologia, mykologiczny etc.

pozbawione mikoryz (Bruns i Shefferson 2004; Wang i Qui 2006). Najmłodsza grupa, są rośliny tworzące mikoryzę erikoidalną, która prawdopodobnie ewoluowała z roślin ektomikoryzowych, ale jako partnera grzybowego zaadoptowała odmienną grupę grzybów, filogenetycznie bliską grzybom endofitycznym (Cullings 1996). Pomimo różnic w anatomii, morfologii i fizjologii wszystkie typy symbiozy mikoryzowej są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemów lądowych, szczególnie w odniesieniu do obiegu w przyrodzie węgla, oraz azotu, fosforu i innych pierwiastków. Najbardziej ogólna zasada funkcjonowania mikoryz polega na tym, że rośliny przekazują partnerowi grzybowemu węglowodany wytworzone w procesie fotosyntezy, w zamian za zwielokrotnioną ilość wody i soli mineralnych pobieranych przez grzybnię z podłoża glebowego. Nie do przecenienia jest funkcja ochronna, jaką spełniają wobec partnera roślinnego grzyby mikoryzowe, występujące wewnątrz korzeni lub na ich powierzchni. Funkcja ochronna szczególnie uwidacznia się w momencie wystąpienia warunków stresowych, a zwłaszcza niedoboru wody, oddziaływania metali ciężkich i zasolenia oraz zagrożenia ze strony patogenów glebowych.

1.2. Ektomikoryza

Z uwagi na występującą mufkę grzybniową ektomikoryza jest najłatwiej dostrzegalnym związkiem symbiotycznym, tworzonym pomiędzy grzybami a korzeniami roślin. Jednak podstawowym wyznacznikiem symbiozy ektomikoryzowej jest występowanie strzępek grzybniowych pomiędzy komórkami kory pierwotnej partnera roślinnego, czyli tzw. sieć Hartiga, która jest zasadniczym miejscem kontaktu pomiędzy grzybem a rośliną (Rycina 1E). Dla wielu gatunków drzew liściastych występowanie sieci Hartiga ogranicza się do przestrzeni pomiędzy komórkami epidermy, podczas gdy u roślin iglastych strzępki sieci Hartiga obejmują zarówno epidermę jak i kilka pierwszych warstw komórek kory pierwotnej korzenia, niekiedy sięgając aż do endodermy. Za główne czynniki decydujące o intensywności przenikania strzępek grzybniowych w głąb korzenia należy uznać specyfikę zarówno gatunku grzyba jak i partnera roślinnego, warunki środowiskowe oraz zawartość składników mineralnych w glebie. Obok mufki oraz sieci Hartiga ważnym elementem ektomikoryz jest grzybnia ekstramatrykalna (Rycina 1D), która odpowiedzialna jest głównie za transport składników pokarmowych pobieranych z gleby do mufki, a przez nią do sieci Hartiga. Bezpośrednią ekspresją obecności ektomikoryz na korzeniach, jest występowanie owocników, zarówno nadziemnych jak i podziemnych. Główne elementy strukturalne symbiozy ektomikoryzowej przedstawione są na Rycinie 1.



Rycina 1. Charakterystyczne elementy symbiozy ektomikoryzowej
 A–owocniki *Lactarius quietus*; B–owocniki *Hydnum rufescens*;
 C–mikoryza *Lactarius quietus*; D–mikoryza *Hydnum rufescens*; (GE–grzybnia ekstramatrykalna)
 E – przekrój poprzeczny przez mikoryzę tworzoną przez grzyba *Hydnum rufescens* (M–mufka, SH–sieć Hartiga) strzałka nie pokazuje sieci Hartiga

Symbioza EM jest charakterystyczna dla ok. 8.000 gatunków roślin wyższych. Przyjmuje się, że na Ziemi występuje do 25 000 gatunków grzybów ektomikoryzowych (Brundrett 2009), należących głównie do *Asco-* i *Basidiomycota*, ale również w nielicznych przypadkach do *Zygomycota*. W odniesieniu do całkowitej liczby gatunków grzybów występujących na Ziemi, szacowanej na 1,5 miliona gatunków (Hawksworth 1991) liczba ta wydaje się być niewielka, jednakże rola jaką spełniają te grzyby jest ogromna. Symbioza ektomikoryzowa jest szeroko rozpowszechniona w strefie klimatu umiarkowanego i borealnego półkuli północnej. Obejmuje większość ekonomicznie i ekologicznie ważnych drzew iglastych i liściastych, zwłaszcza należących do rodzin: sosnowatych (*Pinaceae*), bukowatych (*Fagaceae*), brzoźowatych (*Betulaceae*) oraz wierzbowatych (*Salixaceae*). Powszechne występowanie ektomikoryz w strefie klimatu umiarkowanego i borealnego półkuli północnej decyduje o tym, że w tej części świata ektomikoryza odgrywa kluczową rolę w obiegu materii większości ekosystemów leśnych. Szacuje się, że trzecia część węgla będącego w obiegu zdeponowana jest w grzybni mikoryzowej zlokalizowanej w środowisku glebowym (Högberg i Högberg 2002).

1.3. Dlaczego badamy zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych?

Zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych (GEM), definiowane są jako zbiór gatunków koegzystujących w określonej przestrzeni i czasie (Begon i wsp. 1990). Zastosowanie w ostatnich dwudziestu latach zaawansowanych metod molekularnych pozwoliło wykazać, że w większości ekosystemów leśnych strefy klimatu umiarkowanego i borealnego półkuli północnej, GEM tworzą zbiorowiska o wysokim bogactwie, sięgającym setek gatunków (Richard i wsp. 2005; Walker i wsp. 2005, 2008; Ishida i wsp. 2007; Smith i wsp. 2007; Jumpponen i Jones 2009, 2010a; Bahram i wsp. 2011). Jednak występowanie poszczególnych gatunków oraz funkcja, jaką spełniają lub potencjalnie mogą pełnić w relacji z partnerem roślinnym w środowisku, zależy może od szeregu czynników, które, jak dotąd, nie zostały w pełni zdefiniowane, lub ich wpływ jest trudny do oszacowania. Współczesne kierunki badań nad różnorodnością GEM oraz zbiorowiskami przez nie tworzonymi zmierzają w kierunku zrozumienia funkcjonalnego znaczenia różnorodności grzybów mikoryzowych oraz ich „nadmiarowości” (ang. functional redundancy) (Allen i wsp. 1995; Rineau i Courty 2011) i wpisują się w nurt badań tzw. funkcjonalnej ekologii grzybów ektomikoryzowych. Z punktu widzenia ekologii ekosystemów zagadnienia te starają się wyjaśnić powiązania pomiędzy partnerem roślinnym i/a grzybowym oraz środowiskiem. W tym celu konieczne jest pełne opisanie struktury jakościowej i ilościowej zbiorowisk GEM występujących w różnych ekosystemach.

1.4. Dąb szypułkowy oraz dąb bezszypułkowy, jako gatunki obligatoryjnie mikoryzowe

1.4.1. Znaczenie dębu szypułkowego i bezszypułkowego w gospodarce leśnej

Współczesna systematyka zalicza do rodzaju *Quercus* 500 gatunków, występujących głównie na półkuli północnej. W Polsce występują trzy gatunki dębów: *Q. robur* L. (dąb szypułkowy), *Q. petraea* (Matt.) Liebl. (dąb bezszypułkowy) oraz *Q. pubescens* L. (dąb omszony), z których znaczenie gospodarcze mają tylko dwa pierwsze. Wszystkie wyróżniane w Polsce dęby należą do podrodzaju *Quercus* (sekcja *Quercus*).

Dąb szypułkowy jest gatunkiem rozpowszechnionym od zachodnich krańców Europy (Portugalia i zachodnia Hiszpania) do Gór Uralu na wschodzie i sięgającym aż do tajgi na północy. Zasięg występowania dębu bezszypułkowego jest bardziej ograniczony, choć również obejmuje większą część Europy. Wyjątek stanowią jej południowo-zachodnie i wschodnie obrzeża. W Polsce dąb bezszypułkowy osiąga północno-wschodnią granicę występowania. Brak go w północno-wschodniej części Krainy Mazursko-Podlaskiej. Oba

omawiane gatunki wykazują cechy drzew wybitnie nizinnych i nie występują na terenach powyżej 500-700 m. n.p.m.

W zależności od regionu Polski dęby mogą być gatunkami panującymi lub współpanującymi w drzewostanach wielogatunkowych. Lasy z udziałem sosny, buka, jodły, świerka, graba z dębem bezszypułkowym są optymalnym miejscem wzrostu dla dębu szypułkowego. Jest on również spotykany na siedliskach łągowych wraz z jesionem wyniosłym. Dąb bezszypułkowy występuje głównie na siedliskach mniej żyznych (borowych), jako gatunek współpanujący obok sosny, rzadziej świerka, oraz w lasach mieszanych wraz z dębem szypułkowym, sosną, bukiem i grabem. Oba omawiane dęby wykorzystywane są jako gatunki domieszkowe w wielogatunkowych drzewostanach mieszanych. Mniejsze wymagania w stosunku do światła, predysponują wykorzystanie dębu bezszypułkowego, jako gatunku podszytowego i biocenotycznego na ubogich siedliskach borowych. Właściwym zespołem dla dębów są więc drzewostany wielogatunkowe. Jednogatunkowe drzewostany dębowe uważane są za zbiorowiska sztuczne (Murat 2002), a ich występowanie związane jest z działalnością człowieka. W zbiorowiskach takich widoczny jest niekorzystny wpływ drzewostanu na glebę, która ulega zachwaszczeniu oraz powierzchniowemu przesuszeniu. Przyczyną tego jest świetlista korona dębów, przez którą dociera do dna lasu zbyt dużo światła, co skutkuje nadmiernym rozwojem traw, szczególnie z rodzaju trzcinnik (*Calamagrostis* spp.) oraz spowolnieniem tempa rozkładu ściółki.

Rozmieszczenie drzewostanów dębowych w Polsce jest bardzo nierównomierne. Przyczyną tego jest nieodpowiednia gospodarka leśna poprzednich dwu stuleci, która doprowadziła do postępującej degradacji siedlisk żyzniejszych przez zbyt częste wprowadzanie na niżu gatunków iglastych, zwłaszcza sosny. Procentowy udział dębów wynosi 6,9% powierzchni leśnej kraju (GUS 2010). Największy udział lasów dębowych przypada na Krainę Śląską, a zwłaszcza na mezoregiony Równiny Wrocławskiej, Przedgórze Sudeckiego oraz Wysoczyzny Średzkiej. Prowadzona w ostatnich latach na terenach zarządzanych przez Państwowe Gospodarstwo Leśne Lasy Państwowe przebudowa drzewostanów, których skład gatunkowy niedostosowany jest do siedliska powoduje, że znaczenie dębów dla gospodarki leśnej stale rośnie. Świadczyć o tym mogą zapisy „Krajowego programu zwiększania lesistości”, które zakładają osiągnięcie lesistości kraju do 30% oraz zwiększenie udziału gatunków liściastych do 33% w 2050r. (Ustawa o lasach 1991; Polityka ekologiczna państwa 1991; Polityka Leśnej Państwa 1997).

1.4.2. Historia badań nad mikoryzą dębów

Pierwsze doniesienia o możliwej koegzystencji drzew z grzybami dotyczą właśnie dębów i datowane są na przełom trzeciego i czwartego wieku przed naszą erą. Wtedy to grecki filozof, Teofrast (ok. 370-287 p.n.e.) zauważył predyspozycje pewnych gatunków grzybów do występowania w sąsiedztwie określonych gatunków drzew (Boullard 1968). W swoim dziele *Historia Plantarum* Teofrast pisze: „Jeśli chodzi o grzyby rosnące z korzeni (dębu) lub około nich, to występują one również u innych drzew” (Kelly 1950). Kolejne dwa tysiąclecia przyniosły nikłe zainteresowanie zjawiskiem symbiozy grzybów i drzew. Jako jeden z pierwszych, zjawisko symbiozy pomiędzy tymi dwoma grupami organizmów obserwował polski botanik, Franciszek Kamiński (1882). Układ opisany przez Kamińskiego okazał się jednym z najbardziej skomplikowanych zależności symbiotycznych obserwowanych w przyrodzie, gdyż poza partnerem roślinnym, jakim jest roślina fotosyntetyzująca, i partnerem grzybowym, obejmuje również bezzieleniową roślinę z rodzaju *Monotropa*. Obecnie taka trójstronna zależność określana jest mianem mykoheterotrofii i stanowi odrębny, rzadki rodzaj symbiozy (mikoryza monotropoidalna). Wspomniany już twórca terminu mikoryza Albert Bernhard Frank jako pierwszy, na podstawie obserwacji *Q. robur* i *Q. petraea* zakwalifikował dęby do drzew ektomikoryzowych. Zarówno praca Kamińskiego, jak i Franka stały się podwaliną współczesnych badań nad zjawiskiem mikoryzy, o czym świadczyć może powtórna publikacja prac obu tych autorów wydana w języku angielskim (Frank 2005; Berch i wsp. 2005). W Polsce pierwsze badania nad mikoryzą dębu prowadzone były przez Dominika (1951). Badania te dotyczyły występowania mikoryz u dębów na wydmach nadmorskich w okolicach Łeby oraz na wydmach śródlądowych pod Warszawą. Autor zauważa w nich, że na ubogich siedliskach mikoryza rozwijała się w bardzo ograniczonym stopniu. Badania mikoryz dębu kontynuowane były na terenie Wielkopolskiego Parku Narodowego przez Dominika i Wojciechowską (1963) i pozwoliły na opisanie na korzeniach dębów w różnym wieku dziesięciu różnych morfotypów mikoryzowych. Autorzy opisali szczegółowo mikoryzy tworzone przez grzyba workowego, *Cenococcum granifome* (= *geophilum*) i sformułowali wniosek o wysokiej dominacji mikoryz tworzonych przez ten gatunek w warunkach suszy. Inne badania prowadzone na dębach w Polsce skupiały się na określeniu wpływu warunków środowiska na występowanie i rozwój mikoryz (Pachlewski i Gągalska 1953). Badania te potwierdziły przynależność dębu szypułkowego do drzew ektomikoryzowych. Opisy morfologiczne mikoryz Dominika (1961, 1969) zostały częściowo wykorzystane do sporządzenia klucza do oznaczania mikoryz w zespołach leśnych z udziałem dębu szypułkowego i bezszypułkowego w północno-

wschodniej Francji (Voiry 1981), gdzie wyróżnionych zostało 15 morfotypów mikoryzowych. Po raz pierwszy część z opisanych morfotypów mikoryzowych przypisano do określonych gatunków GEM. Badania mikoryz w oparciu o ich cechy morfologiczno-anatomiczne znacznie rozwinął badacz niemiecki Reinhard Agerer, autor *Colour Atlas of Ectomycorrhizae* oraz *Descriptions of ectomycorrhizae*, które to opracowania zawierają między innymi opis anatomiczny 74 ektomikoryz występujących na różnych gatunkach dębów (Agerer 1997-2008).

1.4.3. Badania zbiorowisk GEM oparte na obserwacjach występowania owocników

Przez długie lata jedynym sposobem określania bogactwa gatunkowego GEM były obserwacje występowania ich owocników. Metoda ta wykorzystywana była przez wielu badaczy, w stosunku do wielu gatunków drzew, w tym także dębów. Trappe (1962), w pracy przeglądowej opartej o badania wielu autorów, podaje 124 taksony, które mogą być powiązane z dębem szypułkowym i bezszypułkowym. Garbaye i wsp. (1986) podają 50 gatunków grzybów nadziemnych (epigeicznych), których owocniki masowo występują w litych dąbrowach Lotaryngii. W zbiorowiskach leśnych Gór Świętokrzyskich z dużym udziałem dębów, Łuszczynski (1998) odnotował 58 gatunków grzybów mikoryzowych. Kovacs i wsp. (2000), opierając się na obserwacjach mykosocjologicznych wskazali przynajmniej 74 gatunki wielkoowocnikowych GEM, występujących w dojrzałych drzewostanach dębowych północno – wschodniej Austrii. Opracowanie przedstawione przez Rudawską (2006) w monografii na temat dębów obejmuje ponad 70 taksonów grzybów, należących do 31 rodzajów, które z dużym prawdopodobieństwem można uznać za tworzące mikoryzy z dębem szypułkowym i bezszypułkowym. Najnowsze, długoterminowe obserwacje przeprowadzone w Czechach ujawniły bogactwo gatunkowe GEM występujących w lasach dębowych na poziomie blisko 100 taksonów (Peskowa i wsp. 2013). Trzeba mieć jednak na uwadze, że wyniki otrzymane dzięki metodzie obserwacji owocników są przynajmniej z dwóch powodów niedoszacowane. Nie obejmują one na ogół grzybów tworzących owocniki podziemne (hypogeiczne), takich jak trufle (*Tuber* spp.) czy jeleniaki (*Elephomyces* spp.), jak również grzybów o owocnikach rozpostartych, tzw. resupinatowych (głównie grzyby z rodziny *Thelephoraceae*). Grupa grzybów tworząca utajnione owocniki (zarówno hypogeiczne jak i resupinatowe) i nawiązująca symbiozę mikoryzową z dębami uważana jest za bardzo liczną i zróżnicowaną. Drugim powodem niedoszacowania bogactwa gatunkowego GEM, w oparciu o metody obserwacji owocników jest efemeryczność

pojawiania się owocników, bardzo uzależniona od rozmaitych warunków, w tym także pogodowych (Ogaya i Penuelas 2005; Egli i wsp. 2010). Przez większość swojego cyklu życiowego GEM egzystują w postaci rozprzestrzeniających się w glebie strzępek grzybniowych, które nawiązują kontakt z korzeniami tworząc mikoryzy, bądź przelegują w glebie w formie zarodników i przetrwalników w oczekiwaniu na dogodne warunki do rozwoju. Dlatego też ocena bogactwa gatunkowego GEM w oparciu o obserwacje owocników, choć bardzo ważna wymaga bardzo długich obserwacji i może dawać niedoszacowane wyniki. Obserwacje mikoryz okazały się w badaniach zbiorowisk GEM znacznie efektywniejsze.

Krokiem milowym w badaniach zbiorowisk GEM było odkrycie łańcuchowej reakcji polimerazy przez uhonorowanych Nagrodą Nobla Kary'ego Mullisa (1993). Dzięki opracowaniu w kolejnych latach specyficznych starterów dostosowano tą metodę do badań nad różnorodnością GEM (Tedersoo i wsp. 2008, Bahram i wsp. 2011). Jedne z pierwszych artykułów opisujących możliwość wykorzystania specyficznych starterów w identyfikacji gatunków grzybów wprost z mikoryz opublikowane zostały przez White i wsp. (1990) oraz Gardes i Burns (1993). Przez ostatnie 20 lat, dzięki rozwojowi technik sekwencjonowania oraz opracowaniu wielu nowych starterów, często specyficznych w stosunku do rodziny, rodzaju a nawet gatunku, badania zbiorowisk GEM stały się odrębną dziedziną mikologii. W niniejszej rozprawie przedstawionych zostanie szereg przykładów wykorzystania metod molekularnych w badaniach nad różnorodnością zbiorowisk GEM w oparciu o analizy mikoryz.

2. Cele pracy

Nadrzędnym celem pracy było kompleksowe zbadanie i opisanie zbiorowisk GEM związanych z dębem szypułkowym i bezszypułkowym na obszarze Płyty Krotoszyńskiej; należącej do największych regionów występowania lasów dębowych w Polsce. Całość prowadzonych badań podzielona została na trzy części, odpowiadające odrębnym, cząstkowym celom badawczym.

Cel 1. Określenie dynamiki zbiorowisk grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej

HIPOTEZA: Struktura jakościowa i ilościowa zbiorowisk GEM siewek dębów będzie zmieniała się wraz ze wzrostem i rozwojem roślin.

Cel 2. Określenie zróżnicowania grzybów mikoryzowych wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów

HIPOTEZA: Struktura zbiorowisk GEM dębów będzie zmieniała się wraz z wiekiem drzewostanu

Cel 3. Określenie zbiorowiska grzybów mikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej

HIPOTEZA: Zróżnicowanie zbiorowisk GEM zamierających drzewostanów dębowych będzie związane ze zdrowotnością poszczególnych drzew.

2.1. Cel 1. Określenie dynamiki zbiorowisk grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej

HIPOTEZA: Struktura jakościowa i ilościowa zbiorowisk GEM siewek dębów będzie zmieniała się wraz ze wzrostem i rozwojem roślin.

Badania symbiozy ektomikoryzowej na wczesnym etapie wzrostu sadzonek w szkółkach leśnych prowadzone były od połowy lat 80-tych. Zależność między pojawieniem się owocników w szkółkach, a wiekiem sadzonek dębu badał Garbaye i wsp. (1986). Jego badania ujawniły występowanie 4 gatunków grzybów, *Hebeloma crustuliniforme*, *H. sacchariolum*, *Laccaria laccata*, *Thelephora terrestris*, na jednorocznych siewkach dębów. W drugim roku stwierdzono występowanie owocników kolejnych gatunków grzybów: *Scleroderma areolatum*, *Inocybe umbrina*, *I. decipiendolis* oraz innych z rodzaju *Inocybe*. W trzecim roku życia sadzonek zaznaczała się obecność gatunków z rodzaju *Laccaria*, szczególnie *L. tortilis* oraz *L. proxima*. Występowały również owocniki grzybów: *Hebeloma mesophaeum*, *Inocybe maculata*, *Paxillus involutus*, *Scleroderma aurantium* oraz *Tuber albidum*. W późniejszych latach, obok występujących wcześniej *Inocybe* spp. oraz *Scleroderma* spp., pojawiały się gatunki określane jako grzyby późnego stadium rozwojowego z rodzajów: *Amanita*, *Cortinarius*, *Elaphomyces* oraz *Russula*. Obserwacje te wskazują na postępującą w szkółkach leśnych sukcesję grzybów mikoryzowych, czyli zwiększanie się liczby partnerów mikoryzowych wraz z wiekiem partnera roślinnego. Wyniki innych badań z tego okresu (Beckjord i wsp. 1985), przeprowadzonych na siewkach północnoamerykańskich gatunków dębów (*Q. alba* i *Q. rubra*) ukazują pozytywny wpływ stosowania nawozów fosforowych i azotowych na kolonizację mikoryzową siewek zaszczerpionych dwoma gatunkami grzybów, *Pisolithus tinctorius* oraz *Scleroderma aurateum*. Podobne badania wykorzystujące inokulowane sadzonki dębów, w tym przypadku dębu szypułkowego i bezszypułkowego, wykazały znaczący, pozytywny wpływ grzyba *Paxillus involutus* na wzrost sadzonek wprowadzonych na uprawy (Garbaye i Churin 1997).

Metody molekularne w badaniach nad różnorodnością GEM we wczesnym etapie wzrostu dębów wykorzystano po raz pierwszy w odniesieniu do gatunków północnoamerykańskich. Szczegółowa lista symbiontów grzybowych związanych z sadzonkami *Q. rubra* oraz *Q. prinus*, rosnącymi na dwóch siedliskach, przedstawiona została przez Walkera i wsp. (2005). Badania te ujawniły duże zróżnicowanie gatunkowe mykobiontów, sięgające 75 taksonów. Do najczęstszych gatunków należały: *Craterellus*

lutescens, *Laccaria laccata*, *Lactarius chrysorheus*, *Russula decolarans*, *Thelephora tarrestris*, *Tuber borchii*, oraz morfotyp zakwalifikowany jako *Hebeloma* spp. Spośród zidentyfikowanych grzybów 43 taksony stwierdzono tylko w pojedynczych próbach. W kolejnej pracy (2008) ci sami autorzy przedstawili sezonową zmienność zbiorowiska GEM. Sezonowość występowania mikoryz zauważalna była dla gatunków z rodziny *Thelephoraceae* oraz z rodzajów *Cortinarius* i *Amanita*. Badania zbiorowiska GEM innego północnoamerykańskiego gatunku dębu, *Q. garryana*, przeprowadzone w szkółkach leśnych wykazały występowanie zaledwie czterech taksonów: *Tuber* sp., *Laccaria* sp., *Peziza* sp. oraz *Entoloma* sp. (Southworth i wsp. 2009). Kolonizacja korzeni przez grzyby *Tuber* sp. oraz *Laccaria* sp. pozytywnie wpływała na wysokość i masę sadzonek. Na korzeniach sadzonek wysadzonych na plantacji zidentyfikowano kolejnych 11 gatunków. Wśród nich najczęstsze były mikoryzy tworzone przez *Cenococcum geophilum* oraz *Lactarius* sp.

Innym przykładem wykorzystania metod molekularnych do identyfikacji partnera grzybowego były badania sadzonek dębu szypułkowego i bezszypułkowego prowadzone w szkółkach leśnych na terenie Polski. Leski i wsp. (2010) wykazali na dwuletnich sadzonkach dębów w pięciu szkółkach produkujących materiał sadzeniowy z odkrytym systemem korzeniowym występowanie 23 taksonów GEM. Nie wykazano różnic jakościowych i ilościowych pomiędzy zbiorowiskiem GEM dębu szypułkowego i bezszypułkowego. Bogactwo gatunkowe liczone na próbę składającą się z 5 sadzonek wynosiło od 2 do 9 taksonów grzybów, średnio 5,56 taksonów. Najobficiej występowały mikoryzy tworzone przez grzyb *Peziza ostracoderma*, natomiast najczęściej znajdowany był *Tuber* sp. (jeden z gatunków trufli jak dotąd nieopisany do gatunku). Przedstawione badania wykazały również istotne różnice w obfitości występowania poszczególnych taksonów pomiędzy badanymi szkółkami, co świadczyć może o silnym wpływie lokalnych warunków siedliskowych na kształtowanie się zbiorowisk GEM. Wysokie bogactwo gatunkowe (28 taksonów) oraz znaczne różnice w składzie gatunkowym pomiędzy poszczególnymi szkółkami stwierdzono także na sadzonkach blisko spokrewnionego z dębami buka zwyczajnego (Pietras i wsp. 2013). Wyniki obu przytoczonych prac (Leski i wsp. 2010; Pietras i wsp. 2012), uzyskano w oparciu o jednorazowy zbiór materiału, przeprowadzony późną jesienią drugiego roku wzrostu siewek w szkółce, po zakończonym okresie wegetacyjnym. Jak dotąd nie wiemy, które z symbiontów mikoryzowych pojawiają się na systemie korzeniowym dęba jako pierwsze i jak następnie w ujęciu jakościowym i ilościowym przebiega kolonizacja mikoryzowa. Także w literaturze światowej brak jest doniesień podejmujących problematykę zmian zachodzących w zbiorowisku GEM we wczesnym etapie wzrostu roślin w warunkach

szkółki leśnej. Dlatego prace te stały się inspiracją do podjęcia badań nad dynamiką zbiorowiska GEM na wczesnym etapie wzrostu i rozwoju siewek w szkółce od momentu pojawienia się pierwszych mikoryz po skielkowaniu żołądzi do końca pierwszego okresu wegetacyjnego. **Hipoteza badawcza zakłada, że wraz ze wzrostem siewek struktura zbiorowiska GEM będzie się zmieniać, a o kolejności kolonizacji systemu korzeniowego przez poszczególne gatunki grzybów decydować będą wymagania tych gatunków w stosunku do „oferowanej” przez partnera roślinnego ilości cukrów niestrukturalnych.** Dla weryfikacji tej hipotezy, obok obserwacji mikoryz, przeprowadzono pomiar zawartości cukrów niestrukturalnych w korzeniach.

2.2. Cel 2. Określenie zróżnicowania GEM wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów

HIPOTEZA: Struktura zbiorowisk GEM dębów będzie zmieniała się wraz z wiekiem drzewostanu

Większość ekosystemów leśnych charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem gatunkowym występujących w nich GEM. W literaturze światowej znaleźć można wiele prac opisujących zbiorowiska GEM występujących na różnych gatunkach drzew w różnych uwarunkowaniach siedliskowych i ekologicznych. Badania prowadzone w układzie chronosekwencji są w rzeczywistości badaniami sukcesji GEM, opisywanej, jako „kierunkowe zmiany w gatunkowej kompozycji, względnej obfitości występowania i przestrzennego rozmieszczenia gatunków tworzących zbiorowisko” (Frankland 1998). W odniesieniu do GEM pojęcie sukcesji zostało zapożyczone wprost z ekologii roślin. Zmiany struktury zbiorowisk GEM o charakterze sukcesyjnym badane były w wielu ekosystemach leśnych Ameryki Płn. i Europy. Dotyczyły one zarówno nadziemnej (Dighton i wsp. 1986; Hintikka 1988; Termorschuisen 1991; Laganà i wsp. 2002; Smith i wsp. 2002; Bonet i wsp. 2004; Kranabetter i wsp. 2005; Durall i wsp. 2006), jak i podziemnej struktury zbiorowisk GEM (Visser 1995; Peter i wsp. 2001b; Horton i wsp. 2005; Palfner i wsp. 2005; Gebhardt i wsp. 2006; Wang i wsp. 2012). Zjawisko następstwa występowania jednych gatunków GEM po innych zbadane zostało również w warunkach sukcesji pierwotnej na terenach powulkanicznych (Nara i wsp. 2003a, 2003b) i polodowcowych (Helm i wsp. 1996; Jumpponen i wsp. 2002; Cázares i wsp. 2005).

Za jedno z pierwszych badań nad chronosekwencją GEM należy uznać obserwacje, dotyczące dynamiki występowania owocników grzybów GEM wokół pojedynczych brzoź (Deacon i wsp. 1983; Last i wsp. 1983; Mason i wsp. 1983). Autorzy ci wykazali, że wraz z postępującym wiekiem drzew, kompozycja gatunkowa obserwowanych owocników ulegała zmianie. Pojawiały się owocniki grzybów z rodzajów: *Lactarius*, *Leccinum*, *Russula*. Badania te pozwoliły na wprowadzenie podziału GEM na grupy wczesnego i późnego stadium rozwojowego. Zaproponowany podział po dziś dzień budzi pewne kontrowersje, ponieważ niekiedy znajdowano grzyby późnego stadium na korzeniach młodych roślin (np. Smith i Read, 1997; Pietras i wsp. 2013). Ponadto autorom koncepcji wczesnego i późnego stadium rozwojowego nie udało się znaleźć przekonujących argumentów tłumaczących istotę funkcjonowania tego zjawiska.

W kontekście niniejszej rozprawy warto odnotowania są badania Digtona i Masona (1985) tłumaczące zmiany sukcesyjne w zbiorowisku GEM. Autorzy uważają, że sukcesja GEM uzależniona jest od zmian akumulacji materii organicznej zachodzącej wraz z rosnącym wiekiem drzewostanu oraz od zmiennej, sumarycznej ilości węglowodanów dostarczanych do korzeni drzew w poszczególnych stadiach rozwojowych. Według tej hipotezy gatunki wczesnego stadium opisywane są jako gatunki pionierskie (termin ten po dziś dzień funkcjonuje w badaniach ekologii grzybów), charakteryzujące się małą specyficznością względem partnera roślinnego. Wraz z postępującym wiekiem drzew, pionierskie gatunki grzybów przegrywają konkurencję z gatunkami bardziej wyspecjalizowanymi względem rośliny. W sprzeczności z opisaną koncepcją stoją badania Moliny i wsp. (1992), którzy dowiedli, że zarówno siewki, jak i dojrzałe drzewa daglezi zielonej (*Pseudotsuga menziesii*), kolonizowane były przez grzyby z rodzaju *Rhizopogon*, które uznawane są za gatunki pionierskie.

Według Jumponena i Egerton-Warburton (2005) czynnikiem sprawczym zjawiska sukcesji zbiorowisk GEM jest selekcja środowiskowa czyli tzw. 'filtry', definiowane jako abiotyczne i biotyczne warunki środowiskowe. Filtry te selekcionują, z całkowitej puli GEM, grzyby nawiązujące symbiozę, a tym samym predestynują pewne z nich do przeżycia. Selekcja poszczególnych gatunków GEM z puli dostępnych grzybów odbywa się przez wykluczanie gatunków, które nie są przystosowane do zaistniałych warunków środowiska. Grzyby niezdolne do zawiązania efektywnej mikoryzy w danym środowisku, pozostają w puli potencjalnych gatunków w formie uśpionego inokulum. Zmiany w środowisku, jak też pojawienie się kompatybilnych względem uśpionych gatunków partnerów roślinnych,

powodować będzie wznowienie aktywnościowych gatunków, a co za tym idzie zmiany jakościowe w zbiorowisku GEM.

Jak do tej pory nie udało się w pełni zweryfikować trafności założeń żadnej z hipotez odnoszących się do zjawiska sukcesji GEM. Wcześniejsze wyniki badań przeprowadzonych w układzie chronosekwencyjnym na gatunkach iglastych nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków (Visser 1995; Peter i wsp. 2001; Horton i wsp. 2005; Palfner i wsp. 2005; Iwański i wsp. 2007). Co gorsza, ze względu na różnice metodologiczne utrudnione jest porównywanie ww. prac. Ze względu na przyjętą metodę identyfikacji mikoryz, opartą na sekwencjonowaniu DNA, najbardziej przekonujące wydają się być wyniki prezentowane przez Iwańskiego (2007). W badaniach tych bogactwo gatunkowe zbiorowisk GEM obserwowane na powierzchniach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) w różnym wieku było podobne. Wyjątek stanowią tu najmłodsze drzewostany, w których odnotowane bogactwo gatunkowe (18 gatunków) było mniejsze co najmniej o 25% od bogactwa gatunkowego drzewostanów starszych (24-27 gatunków). Zarówno skład gatunkowy jak i udział procentowy poszczególnych gatunków GEM różnił się znacząco między badanymi powierzchniami. Łącznie zidentyfikowano 47 taksonów GEM należących do 13 rodzin. Podobne badania przeprowadzone na jednym z azjatyckich gatunków dębów (*Q. liaotungensis* Koidz.) ujawniły nieco wyższe bogactwo gatunkowe grzybów nawiązujących symbiozę z badanym dębem (Wang i wsp. 2012). Łącznie autorzy podają 66 taksonów, z których zaledwie 6 zidentyfikowanych było do gatunku. W przypadku tej pracy prezentowane bogactwo gatunkowe mogło być zawyżone, w szczególności w odniesieniu do gatunków z rodziny *Sabacinaceae* oraz *Thelephoraceae*. Autorzy nie przedstawiają analizy filogenetycznej, które mogłyby rozwiązać wątpliwości na temat przynależności taksonomicznej nieopisanych gatunków z rodziny *Sabacinaceae* oraz *Thelephoraceae*. Nie wykazano również różnic pomiędzy zbiorowiskami GEM siewek, „młodych” i dojrzałych drzew, twierdząc, iż wiek partnera roślinnego ma marginalny wpływ na zbiorowisko GEM. Brak jednoznacznych wyników wpływu chronosekwencji drzewostanu na zbiorowiska GEM, stał się inspiracją do przeprowadzenia takich badań na dębach rosnących na obszarze Płyty Krotoszyńskiej. Celem tej części badań rozprawy doktorskiej było przedstawienie zróżnicowania GEM wchodzących w symbiozę z dębami w następującym układzie chronosekwencyjnym: uprawa-młodnik-tyczkowina-drzewostan dojrzały.

Hipoteza badawcza zakłada, iż zbiorowiska GEM, badane w różnych stadiach rozwojowych, będą się różniły zarówno strukturą jakościową jak i ilościową.

2.3. Cel 3. Określenie zbiorowiska grzybów mikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej

HIPOTEZA: Zróżnicowanie zbiorowisk GEM zamierających drzewostanów dębowych będzie związane ze zdrowotnością poszczególnych drzew.

Przez ostatnie dziesięciolecia masowe zamieranie lasów dębowych dotknęło wiele regionów zarówno w Europie (Thomas i wsp. 2002) jak i na całym świecie (Woodall i wsp. 2005; Kabrick i wsp. 2008). Według Maniona (1991) w zamieraniu lasów biorą udział trzy rodzaje czynników: czynniki predysponujące, aktywujące i przyczyniające. Czynniki predysponujące to takie, które mogą aktywować proces chorobowy. W przypadku dębów można tu zaliczyć głównie błędy w gospodarce leśnej ostatnich dwu stuleci (niedostosowanie składu gatunkowego do siedliska, odnawianie lasu z użyciem sadzonek wyprodukowanych w szkółkach) oraz zmiany środowiskowe wywołane np. globalnymi zmianami klimatycznymi. Do drugiej grupy należą czynniki aktywujące, których wystąpienie w krótkim czasie powoduje wystąpienie symptomów chorobowych. Mogą to być anomalie pogodowe (okresy ekstremalnej suszy bądź mrozów), czy też błędy w bieżącej gospodarce leśnej (np. zbyt duże przerzedzenie drzewostanu w cięciach pielęgnacyjnych). Ostatnia grupa czynników biorących udział w zamieraniu lasów, tzw. czynniki przyczyniające, powodują gwałtowny spadek zdrowotności drzew i są bezpośrednią przyczyną ich obumierania. Za takie należy uznać żerowanie folio- i ksylofagicznych owadów, oraz infekcje grzybów patogenicznych. W takim przypadku naturalne mechanizmy odpornościowe nie pozwalają roślinom na efektywną obronę. W układzie „gospodarz-patogen” powstaje wtedy nowy jakościowo organizm „chora roślina” (Sierota 2011), którego funkcjonowanie zasadniczo różni się od funkcjonowania rośliny zdrowej. W przypadku zamierania dębów symptomy procesu chorobowego widoczne są zarówno w koronach drzew jak i na ich pniach. Liście chorych drzew żółkną i z czasem opadają, powodując pojawienie się bezlistnych pędów w koronach. Na pniach pojawiają się charakterystyczne wycieki, z czasem widoczne są również ślady żerowania owadów ksylofagicznych oraz owocniki grzybów patogenicznych. Niewidocznym, aczkolwiek bardzo istotnym symptomem zamierania dębów są infekcje grzybowe korzeni. Szczególną uwagę zwraca się tu na grzybobływki lęgniowe (*Oomycota*) z rodzaju *Phytophthora* i *Pythium*, które w sposób istotny mogą redukować liczbę korzeni drobnych. Wraz z rosnącą redukcją aparatu asymilacyjnego (defoliacją), uszkodzeniami pnia oraz redukcją liczby korzeni drobnych, zmienia się fizjologiczny obraz funkcjonowania drzewa. W koronie produkowanych jest

mniej asymilatów, mniej wody i soli mineralnych jest pobieranych i transportowanych z korzeni do koron, co powoduje radykalne zmiany w relacjach pomiędzy rośliną, a wszystkimi organizmami z nią koegzystującymi, w tym także z grzybami ektomikoryzowymi.

Rola i znaczenie mikoryz w procesie chorobowym związanym z zamieraniem pojedynczych drzew, jak i całych drzewostanów jest jak dotąd słabo poznana. Pierwsze hipotezy mówiły o ścisłym związku zamierania drzew ze zmniejszającą się liczbą mikoryz (Meyer 1984; Raggazi 1999). O wpływie czynników antropogenicznych na proces zamierania lasów mogą świadczyć badania Fellnera i Peskovej (1995), którzy wykazali zmniejszenie się bogactwa gatunkowego grzybów mikoryzowych oraz zmniejszenie liczby mikoryz żywych pod wpływem czynników takich jak: zanieczyszczenie powietrza, nawożenie czy zakwaszenie gleby. Podobne zależności uzyskali Causin i wsp. (1996) w około pięćdziesięcioletnich dąbrowach we Włoszech, oraz Kovacs i wsp. (2000) w lasach dębowych w Austrii. Wspomniane powyżej badania przeprowadzone były w oparciu o metody morfologicznej identyfikacji mikoryz, a więc mogą być obarczone znacznym błędem wynikającym z niedoszacowania rzeczywistego bogactwa gatunkowego.

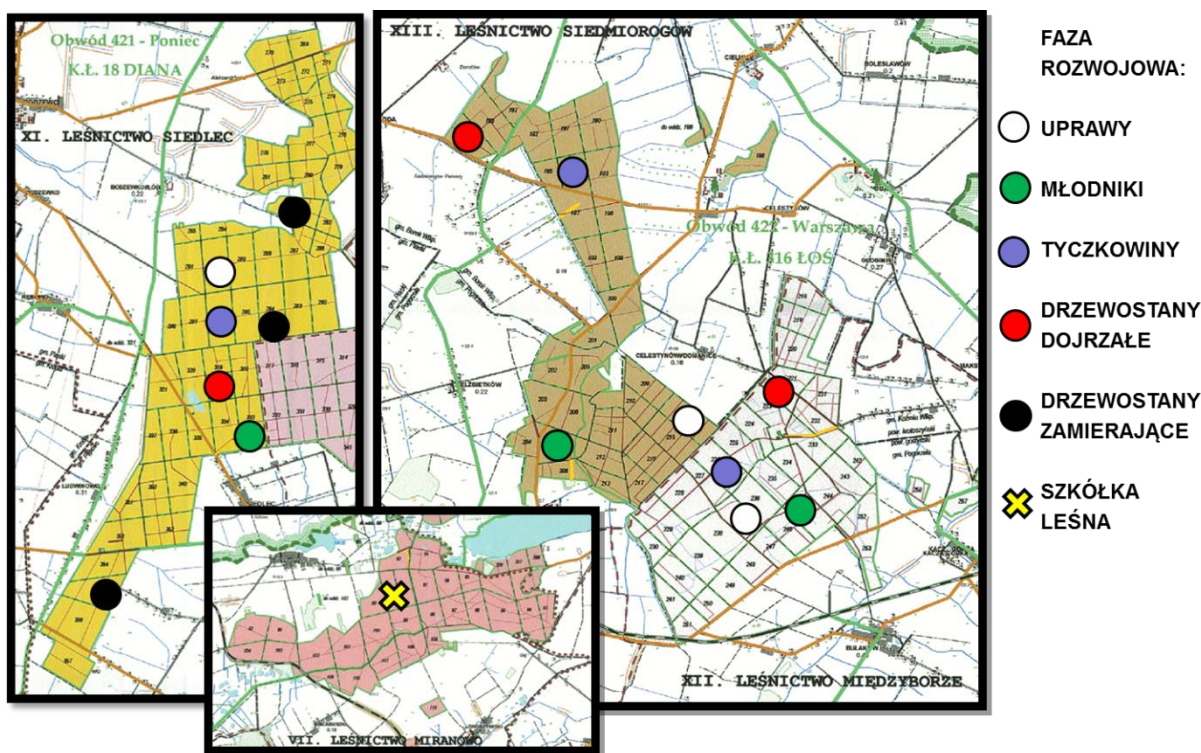
Rozwój metod molekularnych pozwolił na pełniejsze opisanie zbiorowisk GEM związanych z zamierającymi dębami. Wyniki badań nad wpływem stopnia zamierania drzew oraz rolą przeprowadzonych zabiegów pielęgnacyjnych na bogactwo gatunkowe GEM opublikowane zostały przez Mosca i wsp. (2007a). W badaniach tych zidentyfikowano molekularnie 64 anatomotypy mikoryzowe. Do najbardziej powszechnych należały gatunki z rodzin *Thelephoraceae*, *Russulaceae*, *Sebacinaceae* oraz *Pezizaceae*. Autorzy wykazali istotne różnice w strukturze zbiorowisk GEM drzewostanów trzebionych/nietrzebionych oraz bardziej/mniej zamierających. Niestety w opracowaniu tym brak jest dokładniejszych wyników na temat zmian zachodzących w zbiorowisku GEM pod wpływem zamierania drzew. Autorzy również nie określają szczegółowo zdrowotności analizowanych drzew, dzieląc je jedynie na dwie umowne klasy zdrowotności. Kontynuacją tych obserwacji są badania aktywności enzymatycznej niektórych zidentyfikowanych taksonów (*Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina*, *Russula* spp.) (Mosca i wsp. 2007b). W omawianej pracy na uwagę zasługują wyniki mówiące o różnicach aktywności enzymatycznej, szczególnie w odniesieniu do kwaśnej fosfatazy i β – glukozydazy, pomiędzy mikoryzami znajdowanymi w obu klasach zamierania oraz badanymi w trakcie okresu wegetacyjnego, które pokazały, że aktywność enzymatyczna poszczególnych grzybów może się zmieniać w zależności od warunków, dostosowując możliwości pobierania koniecznych do rozwoju związków węgla, niezależnie od partnera roślinnego.

W opisanych powyżej pracach brak jest danych wiążących szczegółowo opisany stopień zamierania drzew ze zmianami w strukturze zbiorowiska GEM. W związku z tym celem tej części rozprawy było opisanie zmian jakościowych i ilościowych zachodzących w zbiorowisku GEM wraz ze zmianą zdrowotności drzew, wyrażonych stopniem uszkodzenia koron (defoliacją) i witalnością drzew. **Hipoteza badawcza zakłada, że zróżnicowanie zbiorowisk GEM zamierających drzewostanów dębowych będzie związane ze zdrowotnością poszczególnych drzew.** Poprzez ukazanie uwarunkowań ekologicznych opisanych w zamierających dąbrowach uzyskane wyniki powinny pozwolić na wskazanie funkcjonalnej roli, jaką mogą pełnić najobficiej występujące w zbiorowisku taksony. Takie podejście wpisuje się we współczesne kanony badań nad ekologią grzybów ektomikoryzowych.

3. Materiały i metody

3.1. Opis powierzchni badawczych

Wybrane do badań powierzchnie znajdują się na terenie Nadleśnictwa Piaski (Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych w Poznaniu) w granicach czterech leśnictw: Miranowo, Siedlec, Międzyborze, Siedmiorogów (Rycina 2). Klimat występujący na terenie Nadleśnictwa Piaski ma charakter przejściowy z wyraźnie zaznaczonymi wpływami klimatu morskiego Europy Zachodniej. Według klasyfikacji Wosia (1999) analizowane leśnictwa znajdują się w strefie klimatu XVI Południowowielkopolskiego. Średnia roczna suma opadów wynosi 597 mm, średnia roczna temperatura to 8,6°C, natomiast długość sezonu wegetacyjnego wynosi 220 dni.



Rycina 2. Plan lokalizacji powierzchni badawczych

Szkółka Leśna Miranowo leży w granicach Leśnictwa Miranowo. Trampler i wsp. (1990) zalicza ten region do Krainy Wielkopolsko-Pomorskiej, Dzielnicy Niziny Wielkopolsko-Kujawskiej i Mezonegion Pojezierza Wielkopolskiego. Szkółka została założona w 1978 r. na siedlisku lasu mieszanego świeżego. Tereny przyległe do szkółki stanowią lasy mieszane iglasto liściaste i mieszane liściaste, w różnym stopniu zmieszania.

Warunki glebowe pozwalają na produkcję materiału sadzeniowego zarówno drzew iglastych (głównie sosny) jak i liściastych (oba gatunki dębów).

Leśnictwa Siedlec, Siedmiorogów i Międzyborze w całości znajdują się na obszarze Płyty Krotoszyńskiej. W ramach podziału przyjętego przez Trampler i wsp. (1990) analizowane stanowiska leżą w Krainie Wielkopolsko-Pomorskiej, Dzielnicy Płyty Krotoszyńskiej, Mezoregionu Krotoszyńskiego. Region ten znajduje się w zasięgu zlodowacenia Środkowopolskiego i obejmuje płaską równinę morenową ze specyficznymi glebami hydrogenicznymi typu opadowo-glejowego. Ten rodzaj utworów glebowych wykształca się na płytko, rzadziej średnio głęboko spiaszczonych glinach zwałowych, gdzie w następstwie okresowego stagnowania wód opadowych dominującym procesem glebowym jest oglejenie odgórne. Gleby te charakteryzują się procesami tlenowymi i beztlenowymi zachodzącymi w górnych partiach profilu.

Krajobraz Płyty Krotoszyńskiej charakteryzuje się niewielkim urozmaiceniem rzeźby terenu oraz brakiem jezior. Ze względu na żyzne gleby jest to region typowo rolniczy o niskiej, sięgającej zaledwie 17% lesistości. Z drugiej jednak strony lasy rosnące na Płycie charakteryzują się znacznym, prawie 65%-owym udziałem żyznych siedlisk lasowych – lasu świeżego (Lśw) i lasu mieszanego świeżego (LMśw) z bardzo wysokim udziałem dębu. W związku z tym obszary Nadleśnictwa Piaski, oraz sąsiadującego Nadleśnictwa Krotoszyn nazywane są zwyczajowo Dąbrowami Krotoszyńskimi. Cały ten kompleks, obejmujący prawie 23 tys. ha., uważany jest za unikalny w skali kraju, gdyż ten typ dąbrów charakterystyczny jest dla obszarów o klimacie kontynentalnym, szczególnie na Węgrzech i w Rumunii. Można więc uznać, że Dąbrowy Krotoszyńskie zbliżone są do dąbrów znanych z Europy Środkowej i Zachodniej.

Powierzchnie badawcze należą potencjalnie do zbiorowiska grądu środkowoeuropejskiego (*Galio-Carpinetum*) jednak ze względu na uproszczony skład gatunkowy stanowią drzewostany liściaste o niskim stopniu zróżnicowania. Drzewostan badanych powierzchni jest z reguły jednowarstwowy, utworzony głównie ze sztucznie wprowadzonego dębu szypułkowego z domieszką dębu bezszypułkowego, grabu (*Carpinus betulus*) oraz świerka pospolitego (*Picea abies*). W najstarszych badanych drzewostanach (Część II Rozprawy), a szczególnie w zamierających drzewostanach (Część III Rozprawy) często występuje mniej lub bardziej wykształcony podrost grabowy oraz świerkowy. W zależności od stopnia rozwoju drzewostanu charakter wykształconego runa był różny, od silnie zadarnionej w uprawach, przez pokrywę zielną w drzewostanach w średnim wieku, do silnie zadarnionej pokrywy z przewagą trzcinnika (*Calamagrostis* spp.) w drzewostanach

dojrzałych, a szczególnie zamierających (analizowanych w Części III Rozprawy). Szczegółowa charakterystyka wybranych do badań powierzchni przedstawiona została w Tabeli 1.

3.2. Część I. Zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej

3.2.1. Określenie zróżnicowania GEM występujących w szkółce leśnej Miranowo

Badania tzw. „potencjału inokulacyjnego” szkółki Miranowo przeprowadzono w celu określenia jakie grzyby mikoryzowe kolonizują jedno i dwuletnie sadzonki produkowane w szkółce Leśnej Miranowo. Uzyskane dane niezbędne były w dyskusji wyników części I pracy, w której badano sekwencję pojawiania się symbiontów ektomikoryzowych na siewkach dębu szypułkowego w warunkach szkółki leśnej.

Łącznie pobrano 16 zbiorczych prób, z których każda składała się z 5-10 sadzonek (w zależności od wieku sadzonek i ilości produkowanego materiału sadzeniowego). Każda próba zbiorcza reprezentowała jeden gatunek drzewa w danym wieku. Razem przeanalizowano 130 sadzonek. Analizy morfologiczne i molekularną identyfikację znalezionych mikoryz wykonano dwukrotnie, późną wiosną i jesienią, w sezonie wegetacyjnym poprzedzającym założenie doświadczenia. Lista analizowanych gatunków drzew wraz z liczbą prób pobranych do analiz przedstawione są w Tabeli 2.

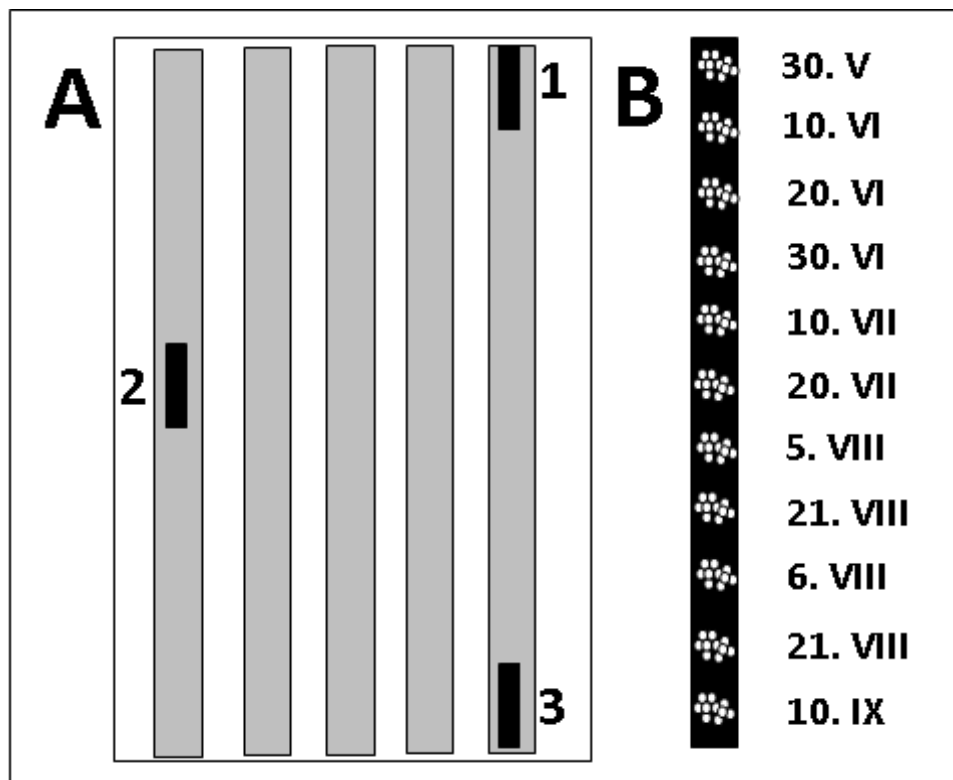
Tabela 2. Pochodzenie i wielkość prób pobranych dla oszacowania „potencjału inokulacyjnego” Szkołki Leśnej Miranowo

Gatunek	Wiek (lat)	Symbol produkcyjny	Kwaterna	Liczba sadzonek/siewek w próbie
Sosna zwyczajna	1	So 1/0	VI	10
	2	So2/0	V	5
Świerk pospolity	2	Św1/1	III	5
Modrzew europejski	2	Md1/1	III	5
Dąb szypułkowy	1	Db sz 1/0	V	10
	1	Db sz 1/0	Substrat torf	5
	2	Db sz 2/0	IV	5
Dąb bezszypułkowy	2	Db sz 2/0	VI	5
	1	Db bsz 1/0	V	10
	1	Db sz 1/0	Substrat torf	10
Buk zwyczajny	2	Db bsz 2/0	V	5
	1	Bk 1/0	I	10
Grab zwyczajny	2	Bk 2/0	I	5
	1	Gb 1/0	IV	10
Lipa drobnolistna	2	Gb 2/0	IV	5
	1	Lp 1/0	IV	10

3.2.2. Określenie dynamiki zbiorowiska grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej

Żołędzie dębu szypułkowego zebrane zostały jesienią 2010 roku w Nadleśnictwie Jarocin. Po zbiorze zostały poddane termoterapii (3 godziny w temperaturze 40°C) i zaprawione przyjętym w praktyce leśnej środkiem VITAVAX, a następnie przechowywane w szczelnie zamkniętych beczkach w temperaturze -3°C przy wilgotności 40%.

Następnego roku żołędzie o podobnej wielkości i wadze (średnio 3 gr., masa 1000 nasion ≈ 3 kg) zostały przycięte na 1/5 długości liścieni, a następnie wysadzone w trzech powtórzeniach na jednej kwaterze produkcyjnej w szkółce leśnej Miranowo. Zgodnie z metodyką opisaną przez Giertycha i Suszkę (2011) przycięcie nasion miało na celu przyspieszenie i wyrównanie wschodów siewek. Aby uniknąć potencjalnych szkód od przymrozków późnych, eksperyment został założony względnie późno, tj. 3-go maja 2011 roku. Żołędzie wysadzano w pojedynczych rzędach, w każdym rzędzie znajdowało się 11 grup żołędzi, które później reprezentowały 11 terminów pobrania siewek. Dla uzyskania optymalnej ilości korzeni do analiz w każdej wysadzonej grupie znajdowało się 10 żołędzi. Szczegółowy schemat doświadczenia przedstawia Rycina 3.



Rycina 3. Schemat doświadczenia przeprowadzonego w Części I.

A – rozmieszczenie powtórzeń (1,2,3) na kwaterze;

B – schemat wysiewu żołądzi w jednym powtórzeniu wraz z terminem pobrania siewek

W czerwcu i lipcu próby pobierane były w odstępach 10-dniowych, natomiast w okresie od początku sierpnia do początku października w odstępach 15 dniowych. W każdym terminie pobrania wykopywano po jednej grupie siewek (wraz z glebą otaczającą systemy korzeniowe) z każdego z trzech miejsc (powtórzeń), razem 30 siewek. Z każdej grupy analizowanych było 5 siewek. Łącznie przeanalizowano 33 próby (3 powtórzenia × 11 terminów pobrania), co odpowiada 165 siewkom. Każda próba pakowana była oddzielnie do plastikowego worka i w takiej formie transportowana do laboratorium, gdzie siewki były bezzwłocznie poddawane analizom.

3.2.3. Zawartość cukrów niestrukturalnych w korzeniach

Analiza wykonana była w oparciu o metodykę Hassiga i Dicksona (1979) zmodyfikowaną przez Oleksyna i wsp. (2000). Wielkość naważki wynosiła 0,02g. Ekstrakcja cukrów rozpuszczalnych przeprowadzona była w mieszaninie metanol:chloroform:woda (12:5:3 v/v), z korzeni drobnych suszonych w 65°C przez 48h. Supernatant posłużył do określenia zawartości cukrów rozpuszczalnych, natomiast pozostały osad do określenia

zawartości skrobi. Spektrofotometryczny pomiar ekstraktu został dokonany przy długości fali 625 nm, używając antronu rozpuszczonego w 75% kwasie siarkowym.

Zawartość cukrów rozpuszczalnych w przeliczeniu na glukozę obliczano wg wzoru:

$$Zg = C \times W \times m^{-1}$$

gdzie: Zg – zawartość cukrów niestrukturalnych w przeliczeniu na mg glukozy [mg/g s.m.];

C – stężenie glukozy odczytane z krzywej wzorcowej;

W – współczynnik odczytany z krzywej wzorcowej;

m – masa naważki

Skrobia została poddana hydrolizie za pomocą α -amyloglukozydazy dla uzyskania glukozy, która oznaczana była spektrofotometrycznie (przy długości fali 450 nm).

$$Zs = C \times 0,005 \times 5 \times m^{-1}$$

gdzie: Zs – zawartość skrobi w przeliczeniu na mg glukozy [mg/g s.m.];

C – stężenie glukozy odczytane z krzywej wzorcowej;

0,005 – objętość po rozcieńczeniu w 2 dniu analiz;

5 – wartość rozcieńczenia w 3 dniu analiz;

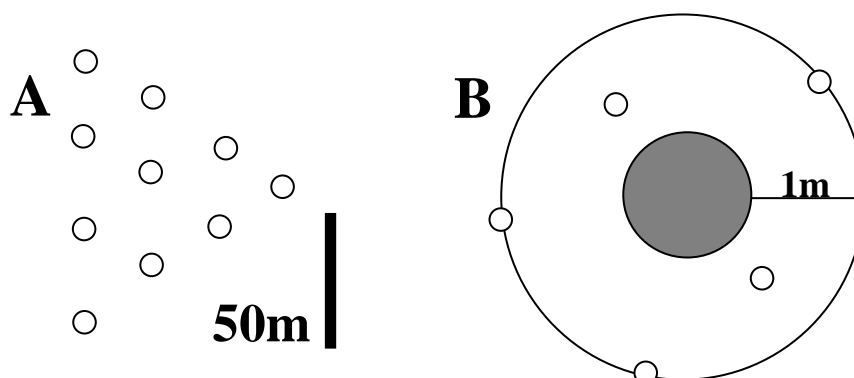
m – masa naważki

Całkowita zawartość rozpuszczalnych cukrów niestrukturalnych glukozy oraz skrobi wyrażona jest w mg/g suchej masy.

3.3. Część II . Zróżnicowanie grzybów ektomikoryzowych wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów

Na terenie każdego z trzech leśnictw wyznaczono 4 powierzchnie badawcze w różnych stadiach rozwojowych tj, w stadium uprawy, młodnika, tyczkowiny i drzewostanu dojrzałego. (Tabela 1A). Łącznie przeanalizowano 12 powierzchni, z których każda stanowiła drzewostan, będący odrębnym wydzieleniem lasu (zazwyczaj pododdziałem). Na każdej z tych powierzchni wyznaczono po 10 drzew, oddalonych od siebie o około 20-30 metrów. Dla późniejszych analiz statystycznych próby oznaczono zgodnie z gatunkiem drzewa (dąb szypułkowy/bezszypułkowy), spod którego były pobierane. Schemat pobierania prób przedstawia Rycina 4A. W dalszej części pracy powierzchnie badawcze w różnym stadium

rozwojowym określane będą symbolami: U – uprawa, M – młodnik, T - tyczkowina, D – drzewostan dojrzały.



Rycina 4. Schemat rozmieszczenia drzew badanych w układzie chronosekwencji (A) oraz sposób wzór pobierania podprób przy pojedynczym drzewie (B)

Próby glebowe przeznaczone do morfologicznych i molekularnych analiz ektomikoryz dębu pobrano późną jesienią, w listopadzie 2009 r. Spod każdego wybranego do analiz drzewa pobierano 5 podpróbek według schematu przedstawionego na Rycinie 4B. Każda podpróbka stanowiła objętość ok. 100 cm^3 gleby, pobranej próbnikiem o wymiarach $h=5\text{cm}$, $\varnothing=5\text{cm}$. Następnie podpróby łączono, w celu uzyskania próby zbiorczej o objętości 500 cm^3 , reprezentującej pojedyncze badane drzewo. W przypadku najmłodszej fazy rozwojowej (odnowienia sztucznego) próby pobierano szpadlem przez wykopanie całej, kilkuletniej rośliny wraz z bryłą gleby o wymiarach $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ (500 cm^3). Łącznie analizom poddano 120 prób glebowych ($3 \text{ leśnictwa} \times 4 \text{ stadiów rozwojowych} \times 10 \text{ prób glebowych}$). Pobrane próby glebowe transportowane były do laboratorium w plastikowych woreczkach i przechowywane w temperaturze -10°C do momentu rozpoczęcia analiz.

3.4. Część III. Zbiorowiska grzybów mikoryzowych zamierających dąbrów na Płycie Krotoszyńskiej

W Leśnictwie Siedlec wytypowano trzy drzewostany dębu szypułkowego. Każdy z drzewostanów znajdował się w odmiennym stadium zamierania, wyrażonym stopniem redukcji aparatu asymilacyjnego (defoliacja) oraz stopniem uszkodzeń pnia. Wstępnym kryterium wyboru drzewostanów był szacunek brakarski wykonany w okresie poprzedzającym pobieranie prób, a szczególnie ilość drewna planowana do pozyskania w następnych cięciach sanitarno – selekcyjnych. Inne cechy drzewostanu, szczególnie te mogące wpływać na różnorodność GEM (skład gatunkowy, wiek, siedlisko, stopień

zadrzewienia, rodzaj pokrywy) były porównywalne, co obrazuje Tabela 1B. W każdym z trzech drzewostanów wytypowano po 15 drzew, dla których przeprowadzono analizy. Prace terenowe przeprowadzone były w okresie odpowiednim dla oceny zdrowotności drzew (początek czerwca 2009 r.) i obejmowały pobór materiału do badań oraz ocenę stanu zdrowotnego poszczególnych drzew.

Próby korzeniowe pobierane były spod drzew, wokół których nie występowały inne krzewiaste i drzewiaste rośliny tworzące ektomikoryzy. Każde z wytypowanych drzew rosło w możliwie największej odległości od innych drzew, jednak nie mniej niż 15m. Łącznie spod każdego drzewa pobrano trzy próbki, które były łączone tworząc w ten sposób próbę reprezentującą jedno drzewo. W tej części badań, ze względu na duże zadarnienie, próby pobierane były szpadlem, a nie próbnikiem. Materiał badawczy pakowany był do plastikowych woreczków i transportowany do laboratorium, gdzie w temperaturze -10°C przechowywany był do momentu rozpoczęcia analiz.

Dla oceny zdrowotności drzew brano pod uwagę następujące cechy:

- wysokość drzewa mierzona wysokościomierzem Sounto z dokładnością do 0,5 m,
- pierśnicę drzewa mierzona na „krzyż” (N-S i W-E) z dokładnością do 0,1 cm,
- defoliację górnej i środkowej części koron drzew ocenianą w 5% odstopniowaniu, przez dwóch taksatorów z dwóch różnych kierunków, z odległości równej minimum wysokości drzewa, z wykorzystaniem barwnych tablic ubytku aparatu asymilacyjnego i lornetek o ośmiokrotnym powiększeniu,
- stopień witalności koron drzew wg poniższego schematu:
 - **stopień 0** – faza eksploracji (drzewo witalne, nieuszkodzone, cała strefa wierzchołkowa składa się z gęstej sieci długopędów, równomiernie wypełniających przestrzeń, sieciowate; harmonijne ugałężenie; korona bez większych luk),
 - **stopień 1** – faza degeneracji (drzewo osłabione, w górnej części korony występują struktury podłużne; we wnętrzu korony mogą występować nieliczne luki),
 - **stopień 2** – faza stagnacji (drzewo uszkodzone, na obrzeżach korony struktury pędzelkowate (tzw. ogony pudła); we wnętrzu korony stale występują większe luki; wierzchołek spłaszczony; występują prawie wyłącznie krótkopędy),

- **stopień 3** – faza rezygnacji (drzewo silnie uszkodzone, obumierające, stadium grubych gałęzi, korona rozpada się na odizolowane części; zamierający wierzchołek; obumieranie większych gałęzi; duże luki w ugałęzieniu),
- jakość korony wg poniższego schematu:
 - **klasa 1** – korona dobra, symetryczna, dobrze ulistniona i żywotna,
 - **klasa 2** – korona średnia, ściętniona, asymetryczna, jeszcze żywotna,
 - **klasa 3** – korona zła, słabo ulistniona, zdegenerowana, zamierająca,
- uszkodzenia pnia drzewa wg poniższego schematu:
 - **stopień 0** – pień bez uszkodzeń (tzn. bez objawów chorobowych, i uszkodzeń),
 - **stopień 1** – pień słabo uszkodzony (tzn. występują nieliczne zabliźnione drobne spękania kory, mogą występować ciemne plamy),
 - **stopień 2** – pień średnio uszkodzony (tzn. występują rany i spękania niezabliźnione do szerokości 5 cm, mogą występować ciemne plamy i wycieki soków, listwy mrozowe i piorunowe, oznaki etiologiczne występowania grzybów rozkładających drewna oraz wstępnych stadiów zgnilizny drewna),
 - **stopień 3** – pień silnie uszkodzony (tzn. występują rany i spękania niezabliźnione szersze niż 5 cm, listwy mrozowe i piorunowe, oznaki występowania zgnilizny, owocniki i utwory grzybów rozkładających drewno, kora zaczyna odstawać i odpadać),
 - **stopień 4** – pień bardzo silnie uszkodzony (tzn. występują rozległe rany i martwice, silna i rozległa zgnilizna, występują ubytki i dziuple, liczne owocniki grzybów rozkładających drewno, płatami odpada kora).

Dane zebrane w terenie pozwoliły na wyliczenie następujących wskaźników:

- średnią pierśnicę dla każdego drzewa,
- wskaźnik defoliacji dla grupy drzew w danym drzewostanie według poniższego wzoru:

$$x = \frac{n + 2n + \dots + 10n}{N}$$

gdzie:

x - wskaźnik defoliacji;

n - liczba drzew w dziesięcioprocentowych przedziałach;

N - liczba wszystkich drzew;

$1, 2, \dots, 10$ - numery przedziałów.

- dla grupy drzew w danym drzewostanie wskaźnik witalności drzewostanu według poniższego wzoru:

$$wit = \frac{n + 2n + 3n}{N}$$

gdzie:

wit - wskaźnik witalności

n - liczba drzew w danym stopniu witalności

N - liczba wszystkich drzew;

$1, 2, 3$ - stopnie witalności

- syntetyczny wskaźnik uszkodzenia pojedynczego drzewa i drzewostanu według poniższego wzoru:

$$Syn = \frac{0,03 \sum Def + \sum Wit}{2 \cdot n}$$

gdzie:

Syn - syntetyczny wskaźnik uszkodzenia drzewa lub drzewostanu;

Def - określona w procentach wartość defoliacji;

Wit - stopień witalności drzewa;

n - liczba drzew.

Wartość syntetycznego wskaźnika uszkodzenia drzewostanu może wahać się od 0 do 3. Po zaokrągleniu oszacowanych wartości do liczb całkowitych otrzymuje się stopnie uszkodzenia, według poniższego schematu:

Stopień	Stan drzewa/drzewostanu
0	zdrowy,
1	osłabiony,
2	uszkodzony,
3	obumierający.

3. 5. Jakościowa i ilościowa analiza morfologiczna mikoryz

We wszystkich trzech częściach rozprawy stosowana procedura jakościowej i ilościowej analizy morfologicznej mikoryz była podobna. Po przewiezieniu prób do laboratorium, względnie po okresie krótkoterminowego przechowywania w temperaturze -10°C , korzenie wybierane były z gleby, zalewane wodą na ok. 6 godzin a następnie płukane pod bieżącą wodą na sicie o średnicy oczek równej 1 mm. Tak przygotowane korzenie wykładane były na szalki Petriego wypełnione wodą destylowaną. Następnie usuwano z nich korzenie trzeciego i wyższego rzędu. Korzenie pozostawione na szalce (pierwszego i

drugiego rzędu) przeznaczone były do analiz. W Części I, gdzie materiałem badawczym były siewki, analizom poddawano całe systemy korzeniowe. W tej części badań systemy korzeniowe pojedynczych siewek stanowiły oddzielne podpróby i traktowane były jako oddzielne powtórzenia.

W części I oraz części II analiza ilościowa obejmowała całe próby. Ze względu na duże zadarnienie powierzchni wytypowanych w części III i konieczność pobierania prób szpadlem, analizowane były reprezentatywne części prób. W tym celu spośród wszystkich fragmentów korzeni, wybieranych było losowo około 1000 wierzchołków mikoryzowych. Przy użyciu mikroskopu stereoskopowego NIKON (w powiększeniu od 10 do 50 razy) zliczano ilość korzeni nieskolonizowanych, liczbę mikoryz żywych oraz liczbę mikoryz martwych. Za mikoryzy martwe uznawano wszystkie te, które cechowały się ciemniejszą barwą połączoną z brakiem turgoru oraz uszkodzeniami mufki. W ramach frakcji mikoryz żywych wydzielano i zliczano poszczególne morfotypy. Klasyfikację morfotypów prowadzono w oparciu o wcześniej opublikowane prace (Agerer, 1987-2008; Ingleby i wsp., 1990,) a także bazę danych zgromadzonych w Pracowni Badania Mikoryz ID PAN w Kórniku, szczególnie dotyczących dębów i buka (Leski i wsp. 2010; Pietras i wsp. 2013). Wyznacznikami morfotypu były różnice w ramach następujących cech morfologicznych:

- (a) – sposób rozgałęzienia mikoryz;
- (b) – barwa mufki grzybniowej;
- (c) – faktura mufki grzybniowej;
- (d) – grubość mufki grzybniowej;
- (e) – kształt wierzchołków mikoryzowych;
- (f) – charakter i barwa grzybni ekstramatrykalnej;
- (g) – obecność, stopień zróżnicowania, sposób rozgałęzienia i barwa sznurów grzybniowych;
- (h) – obecność sklerocjów
- (i) – obecność cystyd

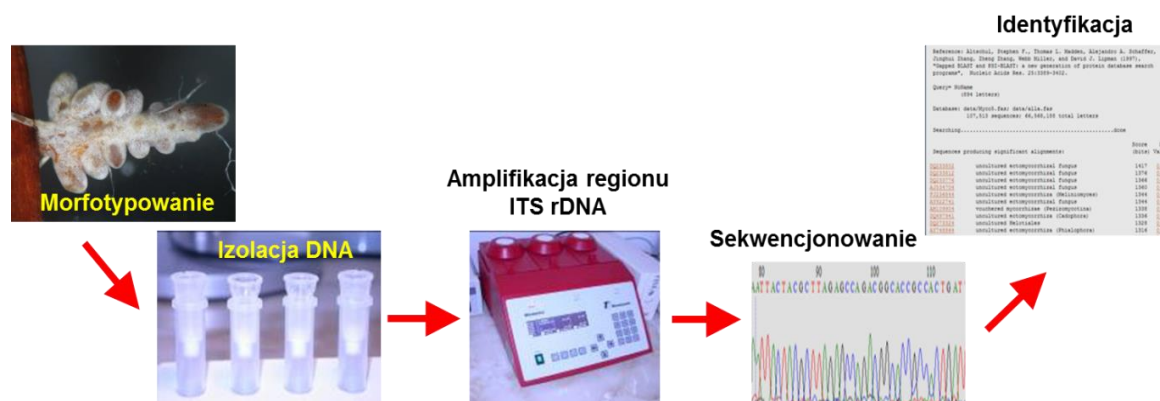
Początkowo nazewnictwo morfotypów pochodziło od prawdopodobnej przynależności taksonomicznej. Jednak w toku prac zrezygnowano z nazywania poszczególnych morfotypów określeniami rodzajów, czy wyższych jednostek taksonomicznych. Wynikało to z jednej strony z dużej ilości różniących się morfotypów tworzonych przez jeden gatunek grzyba, z drugiej z podobieństw między morfotypami mikoryzowymi tworzonymi przez kilka, często filogenetycznie oddalonych gatunków grzybów. Często również, jak na przykład w przypadku grzyba *Hydnum rufescens* (Rycina 1D), którego mikoryzy opisane zostały po raz pierwszy na korzeniach dębu, brakowało danych umożliwiających przypisanie morfotypowi

prawdopodobnej przynależności taksonomicznej. Ostatecznie wydzielone morfotypy oznaczane były symbolem literowym, przyporządkowującymi je do powierzchni, z której pochodziły (Tabela 1) i liczbami porządkowymi (wg. kolejności opisywania). W przypadku odnalezienia morfotypów identycznych i podobnych w próbach pochodzących z różnych powierzchni badawczych, analizowane były one niezależnie.

Mikoryzy zakwalifikowane do poszczególnych morfotypów zliczane były w ramach każdej z prób. Następnie, każdy opisany morfotyp był fotografowany przy użyciu aparatu cyfrowego Canon 365, sprzężonego z mikroskopem stereoskopowym, pozwalającym na uzyskanie powiększenia od $\times 16$ do $\times 40$. Z każdego wydzielonego morfotypów wybierano od 2 do 8 pojedynczych wierzchołków mikoryzowych i umieszczano osobno w odpowiednio oznaczonych probówkach Eppendorfa i przechowywano mroząc „na sucho” w temperaturze -10°C .

3.6. Analizy molekularne i identyfikacja gatunkowa mikoryz

Dla każdej części rozprawy, analizy molekularne przeprowadzane były oddzielnie. Dla określenia przynależności taksonomicznej wydzielonych morfotypów, DNA izolowane było z pojedynczych mikoryz, w 2 do 8 powtórzeniach dla każdego morfotypu, Schemat postępowania obejmujący wszystkie etapy analiz molekularnych przedstawia Rycina 5.



Rycina 5. Schemat przedstawiający tok analiz molekularnych

3.6.1. Ekstrakcja DNA

Ekstrakcja całkowitego DNA z wierzchołków mikoryzowych przeprowadzona była przy użyciu specjalistycznego zestawu do izolacji DNA grzybowego (Plant and Fungal DNA Isolation and Purification KIT, Qiagen). Analizowane wierzchołki mikoryzowe oczyszczone

były z pozostających na nich zanieczyszczeń, płukane w wodzie destylowanej i/lub 10%-owym roztworze detergentu (np. DOMESTOS), a następnie umieszczano w 400µl buforu ekstrakcyjnego dołączonego do zestawu do izolacji DNA. Dalsze postępowanie przy izolacji DNA zgodne było z instrukcją producenta. Produktem końcowym izolacji była matryca o nieznanym stężeniu DNA grzybowego. Objętość roztworu uzyskana w jednej izolacji (z jednego wierzchołka mikoryzowego) wynosiła od 50 do 100µl. Tak przygotowane matryce DNA przechowywane były w temperaturze 4°C w przypadku przechowania na okres krótszy niż miesiąc, i temperaturze -20°C, gdy zachodziła potrzeba dłuższego przechowywania.

3.6.2. Amplifikacja regionu ITS rDNA w reakcji PCR

Amplifikację regionu ITS rDNA prowadzono w łańcuchowej reakcji polimerazy PCR. Reakcje wykonywano przy użyciu 1.5 – 2.5u *Taq* DNA polimerazy, 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTP i 0.5µM każdego ze starterów w zmiennej objętości, od 10µl do 25µl (wszystkie odczynniki Qiagen). Ze względu na brak możliwości prawidłowego oznaczenia stężenia DNA partnera grzybowego z mieszaniny DNA roślinnego i grzybowego, optymalne stężenie DNA ustalano eksperymentalnie, prowadząc reakcje PCR z szeregiem rozcieńczeń analizowanej matrycy (1:10; 1:20; 1:50; 1:100; 1:200; 1:300). Początkowo do amplifikacji używano uniwersalnej i szeroko stosowanej pary starterów ITS-1 i ITS-4. W toku prac zaczęto używać innych bardziej specyficznych starterów. Dla prób, których produkt PCR był niejednorodny (powstawały produkty PCR różnej długości), lub dla których uzyskane sekwencje były nieczytelne, powtarzano amplifikację używając następujących par starterów: ITS-1f i ITS-4, ITS-3 i ITS-4, ITS-5 i ITS-4 oraz Ctb6 i TW14. Wszystkie wymienione kombinacje starterów dawały z reguły jednorodny produkt. Częstym wyjątkiem była tu para ITS-1f i ITS-4, dla której podobnie jak w przypadku ITS-1 i ITS-4 otrzymywano niejednorodny produkt amplifikacji, widoczny w trakcie elektroforezy jako charakterystyczne smugi na żelu agarozowym. Ze względu na ograniczoną liczbę ilość sekwencji referencyjnych dla regionu LSU, opublikowanych w bazach danych, ostatecznie zrezygnowano z użycia pary Ctb6 i TW14. Dodatkowo dla mikoryz tworzących charakterystyczny morfotypy *Tomentella* przeprowadzono amplifikację z użyciem grzybowego startera ITS1f oraz specyficznego dla grzybów z rodziny *Telephoraceae* startera LR3-*Tom*. Szczegółowe informacje dotyczące starterów użytych w prezentowanych badaniach ujęte są w Tabeli 3. Schemat przyłączania starterów zawiera Rycina 6.

Tabela 3. Charakterystyka starterów wykorzystanych w badaniach

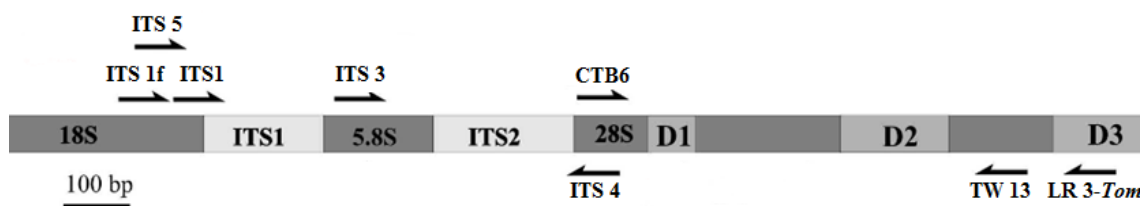
Nazwa	Sekwencja	Region	Kierunek*	Specyficzność	Referencje
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	F	Uniwersalny	White et al. 1990
ITS-1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS	F	Grzybowy	Gardes & Bruns 1993
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	R	Uniwersalny	White et al. 1990
ITS-3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ITS	F	Uniwersalny	White et al. 1990
ITS-5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS	F	Grzybowy	White et al. 1990
Ctb6**	GCATATCAATAAGCGGAGG	LSU	F	Grzybowy	nieopublikowany
TW14**	GCTATCCTGAGGGAACTTC	LSU	R	Uniwersalny	T.J. White, nieopublikowany
LR2 <i>Tom</i>	CTACCGTAGAACCGTCTCC	ITS i LSU	R	Specyficzny dla <i>Telephoraceae</i>	Tedersoo et al. 2008

* F (Forward) – kierunek 3' do 5'; R (Reverse) – kierunek 5' – 3'

** startery niewykorzystane w późniejszych analizach

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze Biometra T3. Dla par starterów ITS 1 (ITS-1f) i ITS 4 proces amplifikacji regionu ITS rDNA przebiegał według następujących parametrów: wstępna denaturacja (10 min. 94°C), 35 cykli kolejno: denaturacja (20 - 40s. 92°C); przyłączanie starterów (20 - 40s. 57°C); elongacja (40 - 80s. 72°C) oraz końcowa elongacja (7 min. 72°C) i schładzanie produktu PCR do temperatury -4°C (Kåren et al., 1997). Dla pozostałych kombinacji starterów zwiększono czas (do 15 min.) i zmniejszono temperaturę (do 90°C) wstępnej denaturacji. Pozostałe parametry pozostawały bez zmian.

Rezultaty reakcji PCR sprawdzano wykorzystując elektroforezę produktów PCR (ok 5µl) na 1,5% żelu agarozowym (10V/cm; 0.5h) (Prone Agarose), barwionym odczynnikiem GELVIEW (FERMENTAS). Skuteczność amplifikacji DNA w reakcji PCR weryfikowana była w świetle UV. Do sekwencjonowania przeznaczone były tylko próby charakteryzujące się obecnością jednego amplikonu (jeden wyraźnie widoczny prążek na żelu) w produkcie PCR. Próby negatywne (bez prążka na żelu) oraz próby z charakterystyczną smugą (obecność niespecyficznego produktu PCR) amplifikowane były powtórnie z użyciem innej pary starterów. W przypadku braku rezultatów powtórnej amplifikacji, powtarzano całą procedurę izolacji. Ponowna izolacja miała także miejsce w przypadku prób z więcej niż jednym prążkiem na żelu, dla których prawdopodobne było wyizolowanie DNA z więcej niż jednego gatunku grzyba (tzn. wierzchołek mikoryzowy zanieczyszczony grzybnią innego gatunku grzyba, dwa gatunki występujące blisko siebie tworzące jedną mikoryzę, odrębne taksony rosnące jeden na drugim).



Rycina 6. Schemat przyłączania starterów użytych w badaniach

3.6.3. Analiza sekwencji nukleotydowych regionu ITS rDNA

Produkty PCR poddawano analizie sekwencji regionu ITS rDNA przy użyciu starterów ITS-4 oraz LR3 *Tom* (tylko dla produktu PCR amplifikowanego z użyciem startera LR3 *Tom*) na automatycznym sekwenatorze CEQ 20000XL i odczytników producenta (Beckman Coulter DTCS Quick Start Kit). Sekwencjonowanie prowadzono w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Przy pomocy oprogramowania BioEdit version 7.0.0 (Hall, 1999) sekwencje edytowano, a następnie przycinano (głównie na początku i końcu chromatogramów), ręcznie poprawiano pojedynczo występujące niezidentyfikowane zasady. W końcowym etapie sporządzano sekwencje konsensusowe. Uzyskane sekwencje konsensusowe analizowano pod względem obecności fragmentów chimerycznych (Nilsson i wsp. 2009, <http://unite.ut.ee/workbench.php>), a następnie porównywano z bazami danych UNITE (www.unite.ut.ee) oraz GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) przy zastosowaniu algorytmu BLASTn (Altschul i wsp., 1990). Sekwencje pochodzące z baz danych, o statystycznie istotnym podobieństwie do analizowanej próby ($\geq 97\%$ na długości powyżej 450 nukleotydów; e-value o wartości 0.0, przy domyślnym progu istotności 10) pozyskiwano w celu zestawienia z analizowanymi próbami. Zestawienia sekwencji i ich współosiowanie (alignment) (Falniowski, 2003), wykonywano przy użyciu programu MEGA5 (Tamura i wsp. 2007). W przypadkach, kiedy analizowane próby wykazywały istotne podobieństwo do sekwencji określonych jako tzw. próby środowiskowe o niejasnej pozycji taksonomicznej (pozyskane z mikoryz, gleby), notowano najbliższe skojarzenia BLASTn, a następnie zestawiano sekwencje i poddawano współosiowaniu z pokrewnymi sekwencjami o znanej pozycji taksonomicznej.

3.6.4. Analizy filogenetyczne

Dla określenia relacji filogenetycznych grzybów z rodziny *Thelephoraceae* zidentyfikowanych do poziomu rodzaju lub rodziny konstruowano drzewa podobieństwa filogenetycznego. Drzewa podobieństwa filogenetycznego konstruowano przy użyciu programu MEGA5 przy zastosowaniu algorytmu przyłączania sąsiada (Neighbor Joining - NJ) z dwuparametrowym modelem Kimury dla odległości między sekwencjami. Algorytm ten używany jest powszechnie w badaniach filogenetycznych. Przyjęta metoda jest metodą odległościową i polega na odnalezieniu w macierzy odległości dwóch najbardziej podobnych sekwencji i stworzenia węzła je łączącego. Kolejnym krokiem jest obliczenie nowej macierzy odległości mierzonej dla powstałego węzła i kolejno analizowanej sekwencji. Procedura ta jest powtarzana do momentu wyczerpania sekwencji, w wyniku czego powstaje jedno drzewo, dla którego oszacowana sumaryczna długość wszystkich gałęzi na drzewie jest jak najkrótsza. Wsparcie dla uzyskanych topologii drzew filogenetycznych szacowano metodą numerycznego próbkowania (Bootstrap-test) wykonując 1000 powtórzeń z losowym dodawaniem sekwencji. Drzewa filogenetyczne konstruowano łącznie dla wszystkich sekwencji pochodzących z poszczególnych eksperymentów i na kilku poziomach taksonomicznych.

3.7. Analizy statystyczne

Dla opisu zbiorowisk GEM określone zostały następujące parametry oraz wykorzystane następujące metody statystyczne:

W Części I rozprawy określono:

- procentowy udział korzeni nieskolonizowanych, zmikoryzowanych oraz martwych mikoryz w całkowitej puli korzeni drobnych;
- całkowite bogactwo gatunkowe GEM w poszczególnych terminach pobrania,
- względną obfitość występowania poszczególnych taksonów GEM w ramach frakcji korzeni zmikoryzowanych.

Dla zbadania różnic zawartości cukrów niestrukturalnych (glukozy i skrobi) występujących w korzeniach, przeprowadzono analizę wariancji oraz test Tukey'a przy poziomie ufności $p = 0,05$. Test Rank Srearmana został wykorzystany do oceny korelacji pomiędzy występowaniem poszczególnych taksonów a zawartością cukrów niestrukturalnych w korzeniach.

W części II i III rozprawy określano:

- całkowitą liczbę korzeni drobnych w próbie (tylko w części II)
- procentowy udział korzeni niemikoryzowych, zmikoryzowanych oraz martwych mikoryz w całkowitej puli korzeni drobnych;
- całkowite i średnie bogactwo gatunkowe GEM;
- współczynniki ekologiczne (dominacji gatunkowej Simpsona, różnorodności gatunkowej Shannon'a);
- względną obfitość oraz frekwencję występowania zidentyfikowanych taksonów GEM w ramach frakcji korzeni zmikoryzowanych;

Analiza wariancji oraz test Tukey'a przy poziomie ufności $p = 0,05$ został przeprowadzony dla zbadania różnic obfitości poszczególnych taksonów w poszczególnych fazach rozwojowych

Test Rank Spearmana został wykorzystany do ocenienia korelacji pomiędzy stanem zdrowotnym drzewa, a wyliczonymi współczynnikami ekologicznymi

Dla porównania zbiorowisk GEM w układzie chronosekwencji oraz pomiędzy drzewostanami w różnym stopniu zamierania wykorzystano metodę ANOSIM przy użyciu współczynnika Bray – Curtisa. Wyniki analizy ANOSIM przedstawione zostały na wykresie NMDS (PAST 2.17b) (Hammer i wsp. 2001).

4. Wyniki

4.1. DYNAMIKA ZBIOROWISK GRZYBÓW EKTOMIKORYZOWYCH DĘBU SZYPUŁKOWEGO W PIERWSZYM ROKU WZROSTU SIEWEK W SZKÓLCE LEŚNEJ

4.1.1. Analiza zbiorowiska GEM Szkółki Leśnej Miranowo

W celu oceny bogactwa gatunków GEM Szkółki Leśnej Miranowo przebadano 115 sadzonek reprezentujących siedem gatunków drzew. Łącznie zidentyfikowano 14 gatunków GEM. Największym bogactwem gatunkowym charakteryzowały się dwuletnie sadzonki drzew liściastych (dąb szypułkowy 8 gat.; dąb bezszypułkowy 7 gat., buk zwyczajny 5 gat.), natomiast najniższym jednoroczne sadzonki gatunków iglastych (sosna pospolita 2 gat.), sadzonki szkółkowane (modrzew europejski 2 gat., świerk pospolity 3 gat.) oraz jednoroczne sadzonki hodowane w substracie torfowym (dąb szypułkowy 1 gat., dąb bezszypułkowy 2 gat.). Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że najpospolitszymi gatunkami GEM w analizowanej szkółce są *Hebeloma sacchariolens*, *Laccaria tortilis* i *Scleroderma verrucosum* dla drzew liściastych, oraz *Willcoxina mikolae* dla drzew iglastych. Trzy taksony, *Tuber* sp. 1, *H. sacchariolens* oraz *Cenococcum geophilum* odnotowywane były zarówno na sadzonkach iglastych, jak i liściastych. Szczegółowa lista zidentyfikowanych gatunków wraz z ich identyfikacją molekularną przedstawia Tabela 4.

4.1.2. Dynamika zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu w szkółce leśnej

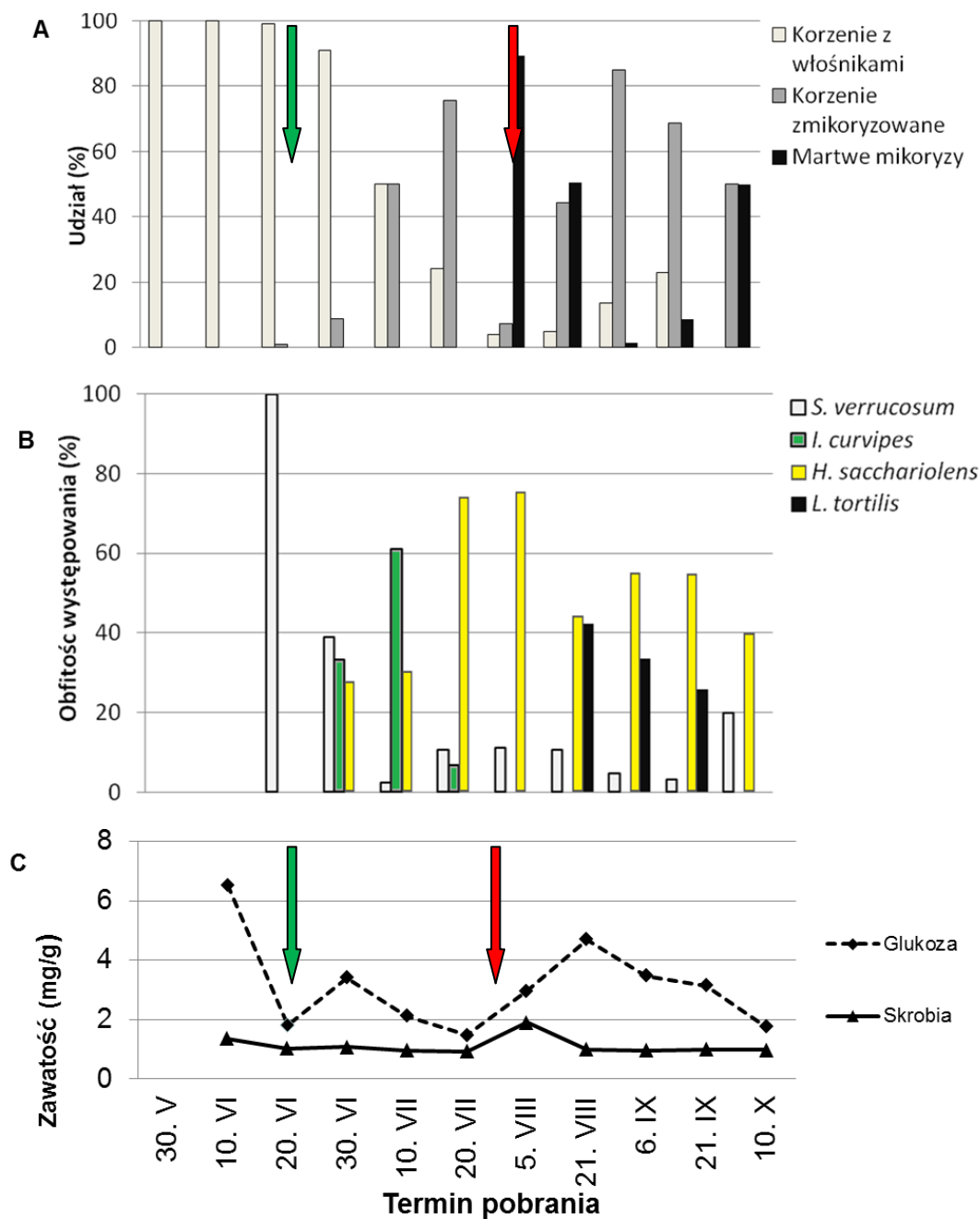
Łącznie przebadano 165 siewek dębu szypułkowego. W pierwszym i drugim terminie pobrania próbek do analiz (tj. po około 30 i 40 dniach od wysiewu) mikoryz na korzeniach badanych dębów nie stwierdzono. Pierwsze mikoryzy zaobserwowano w trzecim terminie pobrania czyli 50 dni od wysiewu żołędzi. Udział mikoryz żywych zmieniał się gwałtownie, od 1,12% w trzecim terminie pobrania, do 9,23% po 60 dniach i 50,01% po 70 dniach od wysadzenia żołędzi, osiągając 75,71% 10 dni później (po 80 dniach). Pomiędzy 20 lipca a 5 sierpnia siewki zostały silnie zainfekowane przez grzyb *Erysiphe alphitoides* ((Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam. 2000), powodujący mączniaka prawdziwego dębu. Spowodowało to dziesięciokrotną redukcję udziału mikoryz żywych (z 75,71% do 7,50%) oraz gwałtowny wzrost udziału frakcji mikoryz martwych, sięgający 89,16%. W przeciągu następnego miesiąca odnotowano wzrost liczby żywych mikoryz do 82,56%. W ostatnim

terminie pobrania (10. X) udział żywych mikoryz na badanych dębach wyniósł ok. 50% .
Zmiany obserwowane w zbiorowisku GEM na korzeniach dębów przedstawia Rycina 7 A i B
oraz Tabela 5.

Tabela 4 Identyfikacja molekularna oraz występowanie GEM obecnych w Szkółce Leśnej Miranowo

Takson	Sekwencja referencyjna	E value	Podobieństwo (%)	Występowanie
<i>Cenococcum geophilum</i> Fr.1829	JN943887 Cenococcum geophilum	0.0	98	Św 1/1, Dbs 2/0 Bk 2/0, Gb 2/0
<i>Rhizoscephus eriace</i>	DQ233802 Meliniomyces bicolor	0.0	98	Db b 2/0
<i>Peziza ostracoderma</i> Korf 1961	JQ764766 Peziza ostracoderma	0.0	97	Dbs 1/0
Tuber sp. 1	JF419494 uncultured Tuber	0.0	100	So 2/0, Dbs 1/0, Dbbs1/0, Dbs2/0, Dbbs2/0, Bk 1/0, Bk 2/0, Lp 1/0
<i>Wilcoxina mikolae</i> Chin S. Yang & Korf 1985	AY880942 Wilcoxina mikolae	0.0	99	So 1/0, So 2/0 Św 1/1, Md 1/1
<i>Hebeloma sacchariolens</i> Qué. 1880	JX030286 Hebeloma sacchariolens	0.0	99	Św 1/1, Dbs 1/0, Dbbs 1/0, Dbs2/0 Dbbs 2/0, Bk 1/0, Bk 2/0, Gb 2/0
<i>Inocybe curvipes</i> Karst. 1890	UDB000616 Inocybe curvipes	0.0	98	Dbs 1/0, Dbbs 1/0 Dbs 2/0, Dbbs 2/0
<i>Laccaria tortilis</i> Cooke 1884	UDB001589 Laccaria tortilis	0.0	100	Dbs 2/0, Dbbs 2/0 Bk 1/0, Bk 2/0 Gb 1/0, Gb 2/0
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr. 1838	EU346879 Paxillus involutus	0.0	99	Dbs 2/0
<i>Scleroderma verrucosum</i> (Bull.) Pers. 1801	UDB 000044 Scleroderma verrucosum	0.0	99	Dbs 1/0 Dbbs 2/0, Bk 1/0, Bk 2/0
<i>Suillus luteus</i> Roussel 1796	UDB000930 Suillus luteus	0.0	98	So 1/0, So 2/0
<i>Suillus</i> sp.	UDB000930 Suillus luteus	0.0	93	Md 1/1
<i>Tomentella ellisii</i> (Sacc.) Jülich & Stalpers 1980	HQ406823 Tomentella ellisii	0.0	97	Dbs 1/0, Dbbs 1/0, Dbs 2/0, Dbbs 2/0, Lp 1/0 Gb 1/0, Gb 2/0
Tomentella sp. 1	DQ068971 Tomentella ellisii	0.0	92	
<i>Thelephora terrestris</i> Ehrh. 1787	JX030232 Thelephora terrestris	0.0		So2/0
UN. 1	Brak identyfikacji molekularnej			

Wytłuszczonym drukiem zaznaczono taksony zidentyfikowane na korzeniach dębów w trakcie prowadzenia doświadczenia



Rycina 7. Parametry systemu korzeniowego siewek dębu szypułkowego ze szkółki leśnej w poszczególnych terminach pobierania do analiz: **A** - udział korzeni z włośnikami (bez mikoryz), zmikoryzowanych i martwych mikoryz; **B** – względna obfitość występowania 4 gatunków grzybów często i obficie pojawiających się w doświadczeniu **C** - zawartość cukrów niestrukturalnych w korzeniach (opis osi X wspólny dla A, B i C); zieloną strzałką zaznaczono pojawienie się pierwszych mikoryz *S. verrucosum*, czerwoną strzałką zaznaczono początek infekcji siewek przez *E. albitoides*

Tabela 5. Obfitość występowania grzybów mikoryzowych kolonizujących korzenie drobne dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu w szkółce leśnej

Gatunki EM	10. VI	20. VI	30. VI	10. VII	20. VII	5. VIII	21. VIII	6. IX	21. IX	10. X
<i>Scleroderma verrucosum</i>	---	100	38,89	2,44	10,74	11,11	10,70	4,78	3,13	20,01
<i>Inocybe curvipes</i>	---	0	33,33	60,98	6,85	0	0	0	0	0
<i>Hebeloma sacchariolens</i>	---	0	27,27	30,49	74,07*	75,55*	44,23*	55,22	54,79	41,99*
<i>Tomentella ellisii</i>	---	0	0	3,66	8,33	13,22	2,82	0	11,04	38,00
<i>C. geophilum</i>	---	0	0	2,44	0	0	0	0	0	0
<i>Laccaria tortilis</i>	---	0	0	0	0	0	42,25	33,58	25,83	0
<i>Tuber</i> sp.	---	0	0	0	0	0	0	5,97	1,04	
<i>Tomentella</i> sp.1	---	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0
NM 1	---	0	0	0	0	0	0	0	4,17	0

*morfotyp z wykształconymi sklerocjami

Łącznie na analizowanych siewkach zidentyfikowano 9 taksonów GEM (ich identyfikacja molekularna przedstawiona jest w Tabeli 4, a taksony zidentyfikowane na korzeniach dębów w trakcie opisywanego doświadczenia zaznaczono wytłuszczonym drukiem). Jako pierwsze zaobserwowano mikoryzy tworzone przez grzyba *Scleroderma verrucosum*. Miało to miejsce w trzecim terminie pobrania po około 50 dniach od wysadzenia żółodzi (20. VI). Pierwsze zauważone mikoryzy wykształcone przez grzyb *S. verrucosum* były bardzo delikatne, z charakterystyczną świetlistą, nierównomiernie wykształconą mufką. W późniejszych terminach pobrania morfotyp przybierał formę typową dla tego grzyba, z charakterystyczną grubą wełnistą mufką barwy białej i szaro-białej, z delikatnymi żółtymi przebarwieniami. Kolejnymi odnotowanymi grzybami były: *Inocybe curvipes* i *Hebeloma sacchariolens* zaobserwowane po raz pierwszy po 60 dniach od wysiewu (30. VI). Już 10 dni później znaleziono mikoryzy tworzone przez *Tomentella ellisii* i *Cenococcum geophilum* (10. VII = 70 dni od założenia doświadczenia). Po infekcji sadzonek patogenicznym grzybem *E. alphitoides* (5. VIII) i gwałtownym zamarcium większości mikoryz, powtórny rozwój nowych wierzchołków mikoryzowych wraz ze stopniowym pojawianiem się ww. gatunków grzybów EM (z wyjątkiem *I. curvipes*) odnotowano już w kolejnym pobraniu prób tj. 21

sierpnia. Dodatkowo zaobserwowano nowe taksony takie jak: *Laccaria tortilis* (21. VIII), *Tuber* sp., *Tomentella* sp. 1 (6. IX) oraz nierozpoznany morfotyp NM 1 (21. IX). Zawartość glukozy w korzeniach drobnych zmieniała się w okresie prowadzenia badań od 1,47mg/g do 4,69mg/g. Analiza wariancji zawartości cukrów wykazała istotne różnice w ilości glukozy w korzeniach ($F=35,30$; $p\geq 0,05$). Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie zmian w zawartości skrobi ($F=2,42$; $p\geq 0,05$), której stężenie wahało się od 0,93mg/g do 1,91mg/g. Zmiany zawartości glukozy i skrobi w korzeniach zachodzące w pierwszym sezonie wegetacyjnym przedstawia Rycina 7C. Test Spearmana wykazał negatywną korelację pomiędzy zawartością skrobi a poziomem kolonizacji systemu korzeniowego ($R = 0,84$; $p\geq 0,05$) oraz obfitością występowania grzyba *S. verrucosum* ($R = 0,67$; $p\geq 0,05$) i *H. sacchariolens* ($R = 0,82$; $p\geq 0,05$).

4.2. ZRÓŻNICOWANIE GRZYBÓW EKTOMIKORYZOWYCH WCHODZĄCYCH W SYMBIOZĘ MIKORYZOWĄ Z DĘBAMI W UKŁADZIE CHRONOSEKWENCJI DRZEWOSTANÓW

Łącznie w tej części pracy przebadano 51 625 wierzchołków mikoryzowych. Liczba mikoryz w przeliczeniu na jednostkę objętości wynosiła od 77,9 szt./100cm³ gleby w fazie uprawy do 113,13 szt./100cm³ gleby w tyczkownikach. W młodnikach i drzewostanach dojrzałych odnotowano wartości pośrednie, odpowiednio 92,86 i 92,22 mikoryzy/100cm³ gleby. Średnia liczba mikoryz na jednostkę objętości nie różniła się statystycznie ($F = 0,38$; $p=0,65$) pomiędzy badanymi fazami rozwoju drzewostanu. Łącznie przebadano 120 prób reprezentujących pojedyncze drzewa (87 dębu szypułkowego i 33 dębu bezszypułkowego). Analiza ANOSIM nie wykazała różnic pomiędzy zbiorowiskami GEM dębu szypułkowego i bezszypułkowego.

W całym badanym materiale nie znaleziono korzeni bez mikoryz. Spośród wszystkich 51 625 przeanalizowanych wierzchołków mikoryzowych, 37 330 czyli około 72% zakwalifikowano jako żywe mikoryzy. W ramach frakcji mikoryz żywych wydzielono 75 morfotypów mikoryzowych, z których zidentyfikowano 63 taksony (45 do poziomu gatunku, 9 do poziomu rodzaju, 9 do poziomu rodziny lub rzędu). Dwanaście morfotypów pozostało nierozpoznanych. Szczegóły dotyczące identyfikacji molekularnej przedstawia Tabela 6.

Tabela 6. Identyfikacja molekularna taksonów grzybów mikoryzowych wyróżnionych w badaniach nad chronosekwencją

Takson	Identyfikacja	E*	P**
<i>Amanita citrine</i> (Schaeff.) Pers. 1797	JN235140 <i>Amanita citrina</i>	0.0	98
<i>Amanita fulva</i> Fr. 1815	UDB002417 <i>Amanita fulva</i>	0.0	100
<i>Amanita muscaria</i> Lam. 1783	GQ914927 <i>Amanita muscaria</i>	0.0	99
<i>Boletus edulis</i> Bull. 1782,	UDB015732 <i>Boletus edulis</i>	0.0	99
<i>Byssocorticium atrovirens</i> Singer 1944	EU819526 <i>Byssocorticium atrovirens</i>	0.0	100
<i>Cadophora</i> sp.	AB543057 <i>Cadophora finlandica</i>	0.0	98
<i>Cenococcum geophilum</i> Fr. 1829	JN943886 <i>Cenococcum geophilum</i>	0.0	99
<i>Cortinarius anomalus</i> Fr. 1838,	UDB001008 <i>Cortinarius anomalus</i>	0.0	98
<i>Cortinarius sertipes</i> Kühner 1955	UDB000068 <i>Cortinarius sertipes</i>	0.0	100
<i>Genea hispidula</i> Berk. ex Tul. & C. Tul. 1851	UDB001408 <i>Genea hispidula</i>	0.0	99
<i>Hebeloma sacchariolens</i> Quél. 1880	JF419502 <i>Hebeloma sacchariolens</i>	0.0	98
<i>Hebeloma velutipes</i> Bruchet 1970	AY818351 <i>Hebeloma velutipes</i>	0.0	98
<i>Hydnotrya tulasnei</i> Berk. & Broome 1846	UDB000095 <i>Hydnotrya tulasnei</i>	0.0	99
<i>Hydnum rufescens</i> Pers. 1800	AM087246 <i>Hydnum rufescens</i>	0.0	99
<i>Inocybe cincinnata</i> Quél. 1872	UDB015296 <i>Inocybe cincinnata</i>	0.0	98
<i>Laccaria amethystina</i> Cooke 1884	HM189776 <i>Laccaria amethystina</i>	0.0	100
<i>Laccaria laccata</i> (Scop.) Cooke 1884	UDB000767 <i>Laccaria laccata</i>	0.0	99
<i>Laccaria tortilis</i> (Bolton) Cooke 1884	UDB001589 <i>Laccaria tortilis</i>	0.0	100
<i>Lactarius camphoratus</i> (Bull.) Fr. 1838	UDB011414 <i>Lactarius camphoratus</i>	0.0	99
<i>Lactarius quietus</i> (Fr.) Fr. 1838	UDB002413 <i>Lactarius quietus</i>	0.0	100
<i>Lactarius tabidus</i> Fr. 1838	UDB000385 <i>Lactarius tabidus</i>	0.0	99
<i>Meliniomycetes variabilis</i>	JN943607 <i>Meliniomycetes variabilis</i>	0.0	97
<i>Naucoria salicis</i> P.D. Orton 1960	FJ904180 <i>Naucoria salicis</i>	0.0	98
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr. 1838	GQ154496 <i>Paxillus involutus</i>	0.0	98
<i>Pseudotomentella tritidis</i> M.J. Larsen 1971	UDB000029 <i>Pseudotomentella tritidis</i>	0.0	99
<i>Rhizoscyphus</i> sp.	AF169309 <i>Hymenoscyphus monotropae</i>	5e-93	100
<i>Russula atropurpurea</i> Peck 1888	JF908660 <i>Russula atropurpurea</i>	0.0	99
<i>Russula emetica</i> (Schaeff.) Pers. 1796	AF418619 <i>Russula emetic</i>	0.0	99
<i>Russula betularum</i> Hora 1960	GU220371 <i>Russula betularum</i>	0.0	98
<i>Russula fragilis</i> Fr. 1838	JF834201 <i>Russula fragilis</i>	0.0	99
<i>Russula ochroleuca</i> Fr. 1838	JF908647 <i>Russula ochroleuca</i>	0.0	99
<i>Russula</i> sp. 1	HQ604845 <i>Russula bicolor</i>	e-120	99
<i>Russula</i> sp. 2	GU220371 <i>Russula betularum</i>	0.0	94
<i>Russula velenovskyi</i> Melzer & Zvára 1927	HM189951 <i>Russula velenovskyi</i>		
<i>Scleroderma areolatum</i> Ehrenb. 1818	EU819518 <i>Scleroderma areolatum</i>		
<i>Scleroderma citrinum</i> Pers. 1801	EU718119 <i>Scleroderma citrinum</i>	0.0	98
<i>Scleroderma verrucosum</i> Pers. 1801	UDB000044 <i>S. verrucosum</i>	0.0	99
<i>Thelephora terrestris</i> Ehrh. 1787	JQ711902 <i>Teleophora terrestris</i>	0.0	99
<i>Thichophaea voolhopeia</i>	GU174764 <i>Thichopea voolchia</i>	0.0	99
<i>Tomentella botryoides</i> Bourdot & Galzin 1924	UDB000255 <i>Tomentella botryoides</i>	0.0	100
<i>Tomentella italica</i> (Sacc.) M.J. Larsen 1967	UDB011123 <i>Tomentella italica</i>	0.0	100
<i>Tomentella lilacinogrisea</i> Wakef. 1966	UDB016500 <i>Tomentella lilacinogrisea</i>	0.0	98
<i>Tomentella</i> sp.2	UDB003309 <i>Tomentella cinaerens</i>	0.0	95
<i>Tomentella</i> sp.3	UDB003329 <i>Tomentella coerulea</i>	0.0	95
<i>Tomentella stiposa</i> (Link) Stalpers 1984	UDB002428 <i>Tomentella stiposa</i>	0.0	97
<i>Tomentella sublilacina</i> Wakef. 1962	HM190004 <i>Tomentella sublilacina</i>	0.0	99
<i>Tuber</i> sp. 1	GQ154517 <i>Un Tuber</i> sp.	0.0	100
<i>Tuber</i> sp. 2	AM900418 <i>Tuber</i> sp.	0.0	96
<i>Un Helotiales</i> 1	AB636433 uncultured <i>Helotiales</i>	0.0	100
<i>UN Helotiales</i> 2	JN655598 <i>Helotiales</i> sp	0.0	95
<i>UN Pezizales</i> 1	UN <i>Pezizales</i>		
<i>UN Pezizales</i> 2	FR852090 <i>Peziza</i> sp.	0.0	100
<i>UN Pezizales</i> 3	FJ013079 uncultured <i>Peziza</i>	0.0	99

Tabela 6cd.

<i>Xerocomus badius</i> Wakef. 1962	HQ207696 <i>Xerocomus badius</i>	0.0	100
<i>Xerocomus pruinatus</i> (Fr. & Hök) Quél. 1888	UDB000477 <i>Xerocomus pruinatus</i>	0.0	100
<i>Xerocomus subtomentosus</i> (L.) Quél. 1888	UDB002281 <i>X. subtomentosus</i>	0.0	98
NM <i>Boletaceae</i>	Identyfikacja morfologiczna		
NM <i>Hebeloma</i> sp. 1	Identyfikacja morfologiczna		
NM <i>Thelephoraceae</i> 1	Identyfikacja morfologiczna		
NM <i>Thelephoraceae</i> 2	Identyfikacja morfologiczna		
NM <i>Thelephoraceae</i> 3	Identyfikacja morfologiczna		
NM 2	Brak identyfikacji		
NM 3	Brak identyfikacji		
NM 4	Brak identyfikacji		
NM 5	Brak identyfikacji		
NM 6	Brak identyfikacji		
NM 7	Brak identyfikacji		
NM 8	Brak identyfikacji		
NM 9	Brak identyfikacji		
NM 10	Brak identyfikacji		
NM 11	Brak identyfikacji		
NM 12	Brak identyfikacji		
NM 13	Brak identyfikacji		

* E (E- value)-wartość współczynnika mówiącego o długości, na której przyrównane zostały sekwencje; (gdy E- value=0.0 sekwencje przyrównane na długości większej niż 450 par zasad)

** P – podobieństwo wyrażone w procentach

Spośród 12 niezidentyfikowanych molekularnie morfotypów największą ich liczbę odnotowano w drzewostanach dojrzałych (7 morfotypów) oraz tyczkownikach (3 morfotypów). W młodnikach 2 morfotypy pozostały niezidentyfikowane, natomiast w uprawach rozpoznane zostały wszystkie wyróżnione morfotypy. Część niezidentyfikowanych morfotypów (głównie z rodziny *Thelephoraceae*), przyporządkowano do rodzin na podstawie cech typowych dla danej grupy grzybów (Tabela 6). Zidentyfikowane taksony GEM reprezentują 2 klasy, 10 rzędów, 18 rodzin i 29 rodzajów (Tabela 7).

Tabela 7. Przynależność taksonomiczna taksonów zidentyfikowanych molekularnie oraz ich występowanie w poszczególnych częściach rozprawy. (S – szkółka, U – uprawa, M – młodnik, T – tyczkowina, D – drzewostan dojrzały, Z – drzewostany zamierające) (na podstawie www.indexfungorum.org.)

TYP	Rząd	Rodzina	Rodzaj	Liczba gatunków							
				S	U	M	T	D	Z	Łącznie	
Ascomycota	<i>Eurotiales</i>	<i>Elaphomycetaceae</i>	<i>Elaphomyces</i>						+	1	
	<i>Helotiales</i>	<i>Helotiaceae</i>	<i>Meliniomycetes</i>		1						1
			<i>Rhizoscyphus</i>		1						1
		<i>Incertae sedis</i>	<i>Cadophora</i>		1						1
		Uncultured <i>Helotiales</i>			1			1			2
	<i>Hysteriales</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Cenococcum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Pezizales</i>	<i>Discinaceae</i>	<i>Hydnotrya</i>		1						1
		<i>Pyronemataceae</i>	<i>Genea</i>				1				1
			<i>Trichophaea</i>					1			1
		<i>Tuberaceae</i>	<i>Tuber</i>		1	1	2	1	1	2	3
	Uncultured <i>Pezizales</i>			1	1	1				3	
Basidiomycota	<i>Agaricales</i>	<i>Amanitaceae</i>	<i>Amanita</i>			1		2	1	4	
		<i>Cortinariaceae</i>	<i>Cortinarius</i>				2		1	3	
		<i>Hydnangiaceae</i>	<i>Laccaria</i>	1	1	1	2	1	1	3	
		<i>Inocybaceae</i>	<i>Inocybe</i>	1		1				2	
		<i>Strophariaceae</i>	<i>Hebeloma</i>	1	1	1	1				3
	<i>Naucoria</i>				1					1	
	<i>Atheliales</i>	<i>Atheliaceae</i>	<i>Byssocorticium</i>					1		1	
	<i>Boletales</i>	<i>Boletaceae</i>	<i>Boletus</i>				1				1
			<i>Xerocomus</i>				1	1	2	3	4
		<i>Paxillaceae</i>	<i>Melanogaster</i>							1	1
<i>Paxillus</i>						1			1	1	
	<i>Sclerodermantaceae</i>	<i>Scleroderma</i>	1	1	2		1	1	3		
<i>Cantharellales</i>	<i>Hydnaceae</i>	<i>Hydnum</i>		1					1		
<i>Thelephorales</i>	<i>Thelephoraceae</i>	<i>Pseudotomentella</i>						1	1	1	
		<i>Tomentella</i>	2	2	5	3	1	6	13		
		<i>Tomentelopsis</i>						1	1	1	
		<i>Thelephora</i>		1						1	
<i>Russulales</i>	<i>Russulaceae</i>	<i>Lactarius</i>			3	3	3	1	3		
		<i>Russula</i>		1	3	3	5	4	9		
<i>Zygomycota</i>		<i>Mortierella</i>						1	1		

4.2.1 Struktura zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych w analizowanym układzie chronosekwencji

Całkowite bogactwo gatunkowe GEM różniło się pomiędzy analizowanymi fazami rozwojowymi, natomiast było porównywalne między powierzchniami analizowanymi w

ramach tych samych faz rozwojowych (Tabela 8). Największe całkowite bogactwo GEM odnotowano w stadium młodnika i drzewostanu dojrzałego (odpowiednio 31 i 32 taksonów). W tyczkownikach znaleziono 19 taksonów. W najmłodszej fazie rozwojowej (uprawy) całkowite bogactwo gatunkowe było niższe i wynosiło 15 taksonów.

Tabela 8. Wartości współczynników ekologicznych opisujących zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych w badanych fazach rozwojowych

	Faza rozwojowa			
	U	M	T	D
Wiek	3-7	12-15	48-50	120-130
Całkowite bogactwo gatunkowe	15	31	19	32
Średnie bogactwo gatunkowe	4.97	5.20	4.30	4.73
Współczynnik bogactwa gatunkowego Shannona	1.08	1.03	0.92	0.94
Współczynnik dominacji gatunkowej Simpson	0.45	0.48	0.52	0.51

Średnie bogactwo gatunkowe w uprawach i młodnikach wynosiło odpowiednio 4,97 i 5,20 taksonu/próbę, natomiast niższe wartości osiągało w fazie tyczkowiny i w drzewostanach dojrzałych (odpowiednio 4,30 i 4,73 taksonu/próbę). Skutkowało to podobnym rozłożeniem wartości współczynników różnorodności biologicznej (ShDiv) i dominacji gatunkowej (SiDom), które grupują uprawy z młodnikami (odpowiednio 1,08 i 1,03 dla ShDiv oraz 0,45 i 0,48 dla SiDom) oraz fazę tyczkowiny z drzewostanami dojrzałymi (0,92 i 0,94 dla ShDiv oraz 0,52 i 0,51 dla SiDom). Zarówno wartości średniego bogactwa gatunkowego jak i współczynników ekologicznych nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi fazami rozwojowymi drzewostanów dębowych.

W zbiorowiskach GEM analizowanych w układzie chronosekwencji badanych dębów najliczniej reprezentowane były grzyby z rodzin: *Thelephoraceae* (14 taksonów), *Russulaceae* (10 taksonów) oraz *Boletaceae* (3 taksony). Tylko dwa taksony, *C. geophilum* i *Tuber* sp. 1, obecne były we wszystkich fazach rozwojowych (Tabela 8), choć z różną średnią obfitością występowania (38,15 % - *C. geophilum* oraz 0,98% - *Tuber* sp. 1)(dane nie pokazane). Udział *C. geophilum* w całkowitej puli mikoryz wahał się od 7,11% do 55,21% w zależności od analizowanej fazy rozwojowej i nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy fazami rozwojowymi uprawy i młodnika oraz tyczkowiny i drzewostanu dojrzałego. Statystycznie

istotne różnice w obfitości występowania *C. geophilum* wystąpiły natomiast pomiędzy drzewostanami młodszymi (uprawami i młodnikami) i starszymi (tyczkowinami i drzewostanami dojrzałymi). Frekwencja (częstość występowania w próbach) *C. geophilum* była porównywalna w fazie rozwojowej uprawy, tyczkowiny i drzewostanu dojrzałego (odpowiednio 93,33%; 100% i 100%). W młodnikach frekwencja występowania *C. geophilum* wynosiła 80%. We wszystkich analizowanych fazach rozwojowych występował również takson *Tuber* sp. 1. Zarówno obfitość występowania oraz frekwencja tego grzyba nie różniły się statystycznie pomiędzy fazami rozwojowymi ($F=0,21$, $r=0,12$). Zauważalna jest jednak wyższa wartość obu tych parametrów w uprawach. Pięć taksonów, wszystkie z rodziny *Russulaceae* (*Lactarius quietus*, *L. tabidus*, *L. tabidus*, *Russula fragilis*, *R. ochroleuca*) obecnych było w trzech z czterech faz rozwojowych. Spośród nich *L. quietus* cechował się największą obfitością występowania, kolonizując, w zależności od fazy rozwojowej od 2,27% do 37,50% żywych korzeni drobnych. Osiem gatunków (*Laccaria laccata*, *Scleroderma verrucosum*, *Tomentella botryoides*, *T. lilacinogrisea*, *Hebeloma velutipes*, *Cortinarius anomalus*, *Russula betularum*, *Xerocomus subtomentosus*) było wspólnych dla dwóch faz rozwojowych. Pozostałe 60 taksonów występowało tylko na jednej powierzchni badawczej, lub nawet w pojedynczej próbie (12 taksonów). Skutkowało to niską obfitością występowania tych taksonów, która z reguły nie osiągała 10%. Wyjątek stanowią tu taksony o niejasnej pozycji taksonomicznej rozpoznane w uprawach jako *Cadophora* sp. i *Hymenoscyphus* sp., które zaliczane są do grupy *Hymenoscyphus ericae* (*H. ericae* agregate). W fazie młodnika udział mikoryz tworzonych przez tę grupę grzybów wynosił łącznie 23,98%. Liczną grupę (38 taksonów, 54%) stanowiły taksony, których obfitość występowania nie przekraczała 1%. Obfitość występowania oraz frekwencję zidentyfikowanych taksonów przedstawia Tabela 9.

Tabela 9. Obfitość (O) i frekwencja (f) występowania grzybów ektomikoryzowych zidentyfikowanych w badaniach chronosekwencji drzewostanów (U – uprawa, M – młodnik, T – tyczkowina, D – drzewostan dojrzały)

	Faza rozwojowa								
	U		M		T		D		Łącznie
	O	f*	O	f*	O	f*	O	f*	F**
<i>Cenococcum geophilum</i>	7,11	93,33	27,89	80	53,01	100	55,21	100	100
<i>Cadophora</i> sp.	14,96	83,33							25
<i>Rhizoscyphus</i> sp.	14,92	46,67							25
<i>Hebeloma sacchariolens</i>	14,23	16,67							8,3
<i>Scleroderma verrucosum</i>	13,77	26,67							16,7
<i>Naucoria salicis</i>	10,18	26,67							16,7

Tabela 9 cd.

UN Helotiales 1	6,09	10,00							8,3
<i>Hydnotrya tulasnei</i>	6,60	50,00							25
<i>Tuber</i> sp. 1	3,20	26,67	0,22	3,33	0,42	16,67	0,15	3,33	41,6
<i>Laccaria tortilis</i>	3,73	40,00							25
<i>Thelephora terrestris</i>	3,32	16,67							16,7
<i>Hydnum rufescens</i>	1,65	20,00							16,7
<i>Tomentella botroides</i>	0,67	20,00	0,58	13,33					25
<i>Russula velenovskyi</i>	0,55	13,33							16,7
<i>Tomentella italica</i>	0,01	3,33							8,3
<i>Lactarius quietus</i>			37,56	83,33	2,23	20,00	17,04	56,67	58,3
<i>Scleroderma citrinum</i>			5,48	40,00					16,7
<i>Lactarius tabidus</i>			5,39	30,00	0,46	6,67	0,81		25
<i>Russula</i> sp. 1			4,07	6,67					16,7
<i>Tomentella lilacinogrisea</i>			2,44	6,67			14,56	10,00	8,3
<i>Boletus edulis</i>			2,35	26,27					8,3
<i>Inocybe cincinnata</i>			1,88	10,00					8,3
<i>Xerocomus badius</i>			1,67	30,00					16,7
<i>Russula fragilis</i>			1,67	30,00	13,29	26,67	0,73	6,67	33,3
<i>Melinimycetes variabilis</i>			1,24	10,00					8,3
<i>Tuber</i> sp. 2			1,19	10,00					8,3
UN Pezizales1			0,87	3,33					8,3
<i>Genea hispidula</i>			0,76	6,67					8,3
<i>Lactarius camphoratus</i>			0,73	13,33	10,25	43,33	3,63	40,00	58,3
<i>Amanita muscaria</i>			0,73	13,33					16,7
<i>Tomentella</i> sp. 3			0,72	13,33	1,23	3,33			16,7
NM 3			0,67	10,00					8,3
<i>Russula ochroleuca</i>			0,59	10,00	4,04	46,67	1,18	3,33	41,7
NM <i>Hebeloma</i> sp. 1			0,50	6,67					8,3
<i>Laccaria laccata</i>			0,25	6,67			0,51	6,67	16,7
<i>Cortinarius sertipes</i>			0,16	6,67					8,3
<i>Tomentella</i> sp. 2			0,15	3,33			3,67	10,00	16,7
<i>Hebeloma velutipes</i>			0,12	3,33					8,3
<i>Thichophaea voolhopeia</i>			0,07	3,33					8,3
<i>Scleroderma areolatum</i>			0,04	3,33					8,3
<i>Cortinarius anomalus</i>			0,04	3,33			0,64	10,00	25
NM2			0,02	3,33					8,3
<i>Laccaria amethystine</i>					3,47	30,00	0,10	6,67	33,3
<i>Xerocomus subtomentosus</i>					1,78	16,67	0,10	6,67	16,7
NM 5					1,68	20,00			16,7
<i>Tomentella sublilacina</i>					1,54	10,00			8,3

Tabela 9 cd.

<i>Tomentella stuposa</i>	1,15	10,00			8,3
<i>Paxillus involutus</i>	0,84	10,00			16,7
UN Pezizales 2	0,79	2,67			16,7
<i>Russula betularum</i>	0,60	13,33	2,00	3,33	16,7
NM 7	0,27	3,33			16,7
NM 4	0,26	3,33			8,3
NM 6	0,11	6,67			16,7
<i>Pseudotomentella tritii</i>			3,70	36,67	25
NM9			1,80	16,67	8,3
NM <i>Thelephoraceae</i> 1			1,73	13,33	16,7
NM 10			1,09	6,67	16,7
<i>Byssocorticium atrovirens</i>			1,09	13,33	16,7
NM8			1,06	16,67	8,3
<i>Amanita citrine</i>			0,96	16,67	16,7
<i>Xerocomus pruinatus</i>			0,77	6,67	8,3
Un Helotiales 2			0,70	6,67	8,3
<i>Amanita fulva</i>			0,35	6,67	8,3
<i>Russula</i> sp. 2			0,26	6,67	16,7
NM <i>Thelephoraceae</i> 2			0,25	3,33	8,3
UN Pezizales 3			0,19	6,67	8,3
NM 11			0,12	6,67	8,3
NM 12			0,07	6,67	8,3
<i>Russula artopurpurea</i>			0,03	3,33	8,3
NM 13			0,03	3,33	8,3
NM <i>Boletaceae</i>			0,01	3,33	8,3
NM <i>Thelephoraceae</i> 3			0,01	3,33	8,3

* n=30

** n=12

Analiza ANOSIM wykonana z wykorzystaniem współczynnika Bray-Curtisa, wykazała, iż struktura zbiorowisk GEM dębu szypułkowego i bezszypułkowego różniła się statystycznie pomiędzy analizowanymi fazami rozwojowymi (wartość współczynnika R= 0,231; $p < 0,001$; Tabela 10). Największe różnice stwierdzono pomiędzy uprawami a młodnikami, natomiast najmniej różniły się fazy tyczkowiny i drzewostanu dojrzałego. Analiza NMDS ukazuje, iż podobieństwo zbiorowisk GEM w obrębie poszczególnych powierzchni badawczych jest wysokie dla faz młodnika, tyczkowiny oraz drzewostanu

dojrzałego (brak rozgrupowania pomiędzy punktami reprezentującymi ww. fazy rozwojowe) (Rycina 8).

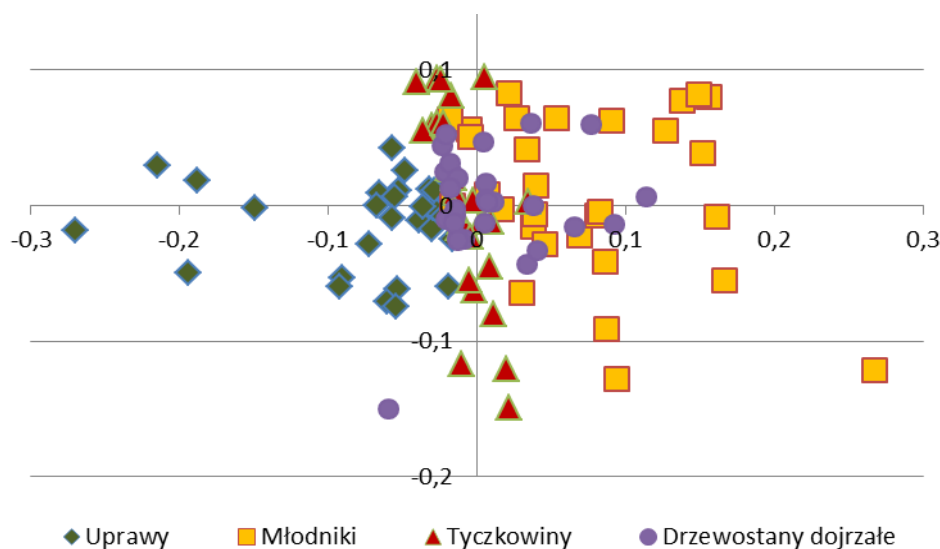
Tabela 10. Wyniki analizy ANOSIM wykonanej z wykorzystaniem współczynnika Bray – Burtisa (pola niezacieniowane wartości R, pola zacieniowane poziom istotności)

	U	M	T	D
U		0,0001	0,0001	0,0001
M	0,4335		0,0001	0,0001
T	0,3091	0,3093		0,001
D	0,2853	0,1909	0,1087	

Zbiorowiska grzybów GEM upraw wyraźnie odbiegają od pozostałych faz rozwojowych, tworząc oddzielne skupienie. Spośród 15 zidentyfikowanych taksonów 11 występuje tylko i wyłącznie w tej fazie rozwojowej. Wysoki jest również udział grzybów workowych z grupy *Hymenoscyphus ericae* o niejasnej pozycji taksonomicznej oraz taksonów łatwo rozprzestrzeniających się za pomocą zarodników (*Naucoria salicis*, *H. sacchariolens*, *S. verrucosum*, *L. tortilis*). W badanych uprawach zidentyfikowano również taksony tworzące owocniki podziemne (*Tuber* sp.1, *Hydnotrya. tulasnei*).

W fazie młodnika pojawia się szereg nowych taksonów należących do rodzin *Russulaceae* (6 taksonów) oraz *Telephoraceae* (4 taksony). W młodnikach taksony z ww. rodzin są obok grzyba *C. geophilum*, istotnym komponentem zbiorowiska GEM. W mniejszej liczbie i niższej obfitości pojawiają się również grzyby z rodziny *Boletaceae* oraz *Cortinariaceae* (po 2 taksony).

W starszych niż uprawa fazach rozwojowych zmniejsza się obfitość występowania taksonów należących do workowców, szczególnie tych zaliczanych do kompleksu *Rhizoscyphus ericae*. Różnice między fazami młodnika, tyczkowiny i drzewostanu dojrzałego nie są już tak widoczne jak pomiędzy tymi fazami a fazą rozwojową uprawy. Na uwagę zasługuje fakt zwiększającej się ilości taksonów z rodziny *Boletaceae* (łącznie do 5 taksonów), rosnąca wraz z wiekiem drzew liczba gatunków z rodzaju *Russula* (z jednego taksonu w fazie uprawy do 4 taksonów w drzewostanie dojrzałym) oraz pojawienie się grzybów z rodzaju *Amanita* (2 gatunki) w drzewostanach dojrzałych. W fazie rozwojowej tyczkowiny i drzewostanu dojrzałego udział grzyba *C. geophilum* zwiększa się do poziomu powyżej 50%.



Rycina 8. Wyniki analizy NMDS dla badanych faz rozwojowych

4.3. ZBIOROWISKA GRZYBÓW EKTOMIKORYZOWYCH W ZAMIERAJĄCYCH DĄBROWACH NA PŁYCCIE KROTOSZYŃSKIEJ

4.3.1. Ocena zdrowotności analizowanych drzewostanów

Przyjęte do badań powierzchnie badawcze cechowały się podobną średnią wysokością drzew, która wynosiła ok. 27 - 28m, oraz porównywalną wartością średniej pierśnicy (od 49 do 51cm). Analizowane drzewostany różniły się natomiast stanem zdrowotnym (Tabela 11 A). Najniższym wskaźnikiem defoliacji, średnią defoliacją i średnim stopniem uszkodzenia pnia oraz najwyższym wskaźnikiem vitalności drzewostanu charakteryzował się Drzewostan I. Drzewostan II charakteryzował się wartościami pośrednimi wszystkich analizowanych cech, natomiast w Drzewostanie III stwierdzono najwyższe wartości wskaźnika defoliacji i średniej defoliacji oraz uszkodzenia pni drzew i najniższy wskaźnik vitalności. Syntetyczny wskaźnik uszkodzenia drzewostanów kwalifikuje analizowane powierzchnie w kategorii drzewostanów uszkodzonych, choć niezaokrąglone wartości tego współczynnika różniły się pomiędzy drzewostanami, przyjmując najniższą wartość dla Drzewostanu I, pośrednią dla drzewostanu II, najniższą natomiast dla Drzewostanu III. Na podstawie wyżej przedstawionej oceny zdrowotności można stwierdzić, że najlepszym stanem zdrowotnym charakteryzował się Drzewostan I, najgorszym zaś Drzewostan III. Potwierdza to ilość pojedynczych drzew w przyjętych stopniach uszkodzeń analizowana oddzielnie dla każdej z badanych powierzchni (Tabela 12). Najmniej uszkodzony drzewostan cechował się najwyższą liczbą drzew osłabionych, natomiast najbardziej uszkodzony największą liczbą drzew obumierających i

martwych. Na żadnej z analizowanych powierzchni nie wyodrębniono zerowego („0”) stopnia uszkodzeń, tj. drzew zdrowych.

Tabela 11. Średnia defoliacja, średni stopień uszkodzenia pnia, wskaźnik defoliacji i witalności (**A**) oraz wartości współczynników ekologicznych opisujących zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych (**B**) w zamierających drzewostanach dębu szypułkowego

	Drzewostan		
	I	II	III
A			
Średni stopień uszkodzenia pnia	1,06	1,58	1,86
Średnia defoliacja	57	66	71
Wskaźnik defoliacji	5,6	6,8	7,2
Wskaźnik witalności	2,2	2,5	2,7
B			
Całkowite bogactwo gatunkowe	20	18	14
Średnie bogactwo gatunkowe	6,20	4,27	3,27
Współczynnik bogactwa gatunkowego Shannona	0,94	0,92	0,75
Współczynnik dominacji gatunkowej Simpson	0,53	0,54	0,59

Tabela 12. Ilość drzew w stopniach witalności opisana dla trzech zamierających drzewostanów

Stopień witalności	Drzewostan		
	I	II	III
0	0	0	0
1	3	1	2
2	9	7	5
3	3	4	7
Martwe	0	3	1

4.3.2. Struktura zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej.

Łącznie przebadano 51 035 wierzchołków mikoryzowych. Ze względu na duże zadarnienie, próby musiały być pobierane szpadlem i dlatego w prezentowanej części niemożliwe było przeliczenie ilości mikoryz na jednostkę objętości gleby. W całym badanym materiale nie znaleziono korzeni niezmikoryzowanych. Spośród wszystkich

przeanalizowanych wierzchołków mikoryzowych 36 497 zakwalifikowano jako żywe mikoryzy (73,53%).

Łącznie wydzielono 76 morfotypów mikoryzowych, wśród których identyfikowano 37 taksonów (22 do poziomu gatunku, 8 do poziomu rodzaju, 1 do poziomu rodziny i rzędu, 6 morfotypów pozostało niezidentyfikowanych, jednak ze względu na unikalne cechy morfologiczne zostały one zakwalifikowane jako oddzielne taksony. Szczegóły dotyczące identyfikacji molekularnej oraz struktury ilościowej zbiorowisk GEM zamieszczone są odpowiednio w Tabeli 13 i Tabeli 14. Zidentyfikowane taksony GEM reprezentują 3 klasy, 8 rzędów, 12 rodzin i 16 rodzajów (Tabela 7). Większość zidentyfikowanych taksonów pokrywa się z tymi zidentyfikowanymi w Części II.

Podobnie jak w przypadku cech opisujących zdrowotność drzewostanów, wartość współczynników ekologicznych różniła się pomiędzy analizowanymi powierzchniami (Tabela 11). Najwyższymi wartościami całkowitego i średniego bogactwa gatunkowego GEM (20 i 6,20) cechował się drzewostan o najlepszym stanie zdrowotnym, natomiast najniższymi (14 i 3,27) stanowisko, na którym drzewa były najbardziej uszkodzone. Wartości pośrednie odnotowano w drzewostanie o średnim stopniu uszkodzeń. Średnie bogactwo gatunkowe było negatywnie skorelowane z defoliacją i stopniem uszkodzenia drzewa (odpowiednio $R = -0,45$ i $R = -0,40$ przy $p \leq 0,05$). W podobny sposób rozkładało się rozłożenie wartości współczynnika różnorodności biologicznej (ShDiv), który malał (od 0,99 do 0,75), oraz współczynnika dominacji (SiDom), który wzrastał (od 0,54 do 0,59) wraz ze zwiększającym się stopniem uszkodzeń drzewostanów. Defoliacja i stopień uszkodzenia drzewa były negatywnie skorelowane z ShDiv (odpowiednio $R = -0,36$ i $R = -0,31$ przy $p \leq 0,05$), oraz pozytywnie związane z SiDom (odpowiednio $R = 0,32$ i $R = 0,30$ przy $p \leq 0,05$). Nie stwierdzono natomiast zależności całkowitego i średniego bogactwa gatunkowego oraz współczynników ShDiv i SiDom w ramach 10 %-owych stopni defoliacji (Tabela 15). Jedynie wartość średniego bogactwa gatunkowego zmniejsza się wraz ze wzrostem stopnia defoliacji, jednak jest to zależność nieistotna statystycznie.

Tabela 13. Identyfikacja grzybów ektomikoryzowych z mikoryz wyróżnionych w zamierających drzewostanach dębu szypułkowego

Takson	Identyfikacja	E*	P**
<i>Amanita rubescens</i> Pers. 1797	UDB000038 <i>Amanita rubescens</i>	0.0	100
<i>Cenococcum geophilum</i> Fr. 1829	JN943887 <i>Cenococcum geophilum</i>	0.0	98
<i>Cortinarius sertipes</i> Kühner 1955	UDB000068 <i>Cortinarius sertipes</i>	0.0	98
<i>Cortinarius</i> sp.	UDB000086 <i>C. praestigiosus</i>	e-146	98
<i>Elaphomyces</i> sp.	JF834198 <i>Elaphomyces muricatus</i>	7e-98	98
NM <i>Hebeloma</i> sp. 2	FJ 943239 <i>Hebeloma vesterholtii</i>	0.0	94
<i>Laccaria amethystina</i> Cooke 1884	UDB000039 <i>Laccaria amethystina</i>	0.0	99
<i>Lactarius quietus</i> (Fr.) Fr. 1838	UDB002413 <i>Lactarius quietus</i>	0.0	100
<i>Melanogaster ambiguus</i> Tul. & C. Tul. 1843	AJ555511 <i>Melanogaster ambiguus</i>	0.0	99
<i>Mortierella</i> sp.	HQ211549 uncultured <i>Mortierella</i>	e-146	95
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr. 1838	EU346879 <i>Paxillus involutus</i>	0.0	100
<i>Russula atropurpurea</i> Peck 1888	JF908660 <i>Russula atropurpurea</i>	0.0	99
<i>Russula fragilis</i> Fr. 1838	JF834201 <i>Russula fragilis</i>	0.0	100
<i>Russula graveolens</i> Romell 1885	UDB002538 <i>Russula graveolens</i>	0.0	99
<i>Russula</i> sp.2	AM087264 <i>Russula virescens</i>	e-166	95
<i>Scleroderma verrucosum</i> (Bull.) Pers. 1801	UDB 000044 <i>S. verrucosum</i>	0.0	99
<i>Tomentella castanea</i> Donk 192	UDB000120 <i>Tomentella castanea</i>	0.0	98
<i>Tomentella botryoides</i> Bourdot&Galzin 1924	UDB000255 <i>T. botryoides</i>	0.0	99
<i>Tomentella italica</i> M.J. Larsen 196	UDB011123 <i>Tomentella italica</i>	0.0	95
<i>Tomentella lapida</i> (Pers.) Stalpers 1984	UDB001659 <i>Tomentella lapida</i>	0.0	97
<i>Tomentella punicea</i> J. Schröt. 1888	UDB000948 <i>Tomentella punicea</i>	0.0	99
<i>Tomentella stupos</i> a (Link) Stalpers 1984	UDB002428 <i>Tomentella stupos</i> a	0.0	97
<i>Tomentella sublilacina</i> Wakef. 1962	HM190004 <i>Tomentella sublilacina</i>	0.0	99
<i>Tomentelopsis submolis</i>	UDB000201 <i>T. submolis</i>	0.0	100
<i>Tuber puberulum</i> Berk. & Broome 1846	UDB001385 <i>Tuber puberulum</i>	0.0	100
<i>Tuber</i> sp. 1	GQ154518ECM fungus (<i>Tuber</i> sp.)	0.0	100
Un fungus	DQ309203 uncultured fungus	0.0	93
Un pezizales 4	FR852090 uncultured <i>Peziza</i>	e-156	99
<i>Xerocomus pruinatus</i> (Fr. & Hök) Quéf. 1888	UDB000049 <i>Xerocomus pruinatus</i>	0.0	99
<i>Xerocomus</i> sp.	HM356014 <i>Xerocomus cisalpinus</i>	0.0	96
<i>Xerocomus subtomentosus</i> (L.) Quéf. 1888	UDB002281 <i>X. subtomentosus</i>	0.0	98
NM 14 – NM 19	Brak identyfikacji		

* E (E- value)-wartość współczynnika mówiącego o długości, na której przyrównane zostały sekwencje; (gdy E- value=0.0 sekwencje przyrównane na długości większej niż 450 par zasad)

** P – podobieństwo wyrażone w procentach

Tabela 14 Obfitość występowania zidentyfikowanych grzybów ektomikoryzowych w zamierających drzewostanach dębu szypułkowego

Takson	Drzewostan		
	I	II	III
<i>Amanita rubescens</i>		1,30	
<i>Cenococcum geophilum</i>	34,04	49,64	41,78
<i>Cortinarius sertipes</i>		0,10	
<i>Cortinarius</i> sp.	0,46	0,26	
<i>Elaphomyces</i> sp.	1,56		
<i>Laccaria amethystina</i>	1,32		
<i>Lactarius quietus</i>	30,89	36,29	32,68
<i>Melanogaster ambiguus</i>			9,03
<i>Mortierella</i> sp.	0,46		
<i>Paxillus involutus</i>	1,38	0,40	
<i>Russula atropurpurea</i>	1,08		0,92
<i>Russula graveolens</i>		0,31	0,91
<i>Russula fragilis</i>		5,45	
<i>Russula</i> sp.2			1,58
<i>Scleroderma verrucosum</i>	4,56		
<i>Tomentella castanea</i>		1,54	
<i>Tomentella lapida</i>	1,55		
<i>Tomentella punicea</i>	0,45		2,41
<i>Tomentella italic</i>			0,28
<i>Tomentella sublilacina</i>	15,00	1,54	
<i>Tomentelopsis submolis</i>	0,58		2,68
<i>Tuber puberulum</i>	1,28		
<i>Tuber</i> sp. 1		0,35	2,96
Un fungus		0,69	
Un pezizales 4	2,31		
<i>Tomentella stuposa</i>	0,60	2,81	
<i>Xerocomus pruinatus</i>	0,08		0,16
<i>Xerocomus</i> sp.		2,06	
<i>Xerocomus subtomentosus</i>		0,03	2,82
NM <i>Hebeloma</i> sp. 2		0,57	
<i>Tomentella botryoides</i>		0,15	0,06
NM 14		0,57	
NM 15	0,59		
NM 16			0,01
NM 17	0,03		
NM 18	0,01		
NM 19			1,73

Analiza ANOSIM przeprowadzona z wykorzystaniem współczynnika Bray-Curtisa, wykazała, że struktura zbiorowisk GEM różniła się statystycznie pomiędzy analizowanymi drzewostanami (wartość współczynnika „global R”=0,0409; Tabela 16A) oraz pomiędzy przyjętymi stopniami defoliacji (wartość współczynnika „global R”=0,259; Tabela 16B).

Tabela 15. Wartości współczynników ekologicznych opisujących zbiorowiska grzybów mikoryzowych w przyjętych stopniach defoliacji drzew

	Klasa defoliacji (%)							
	20-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
Całkowite bogactwo gatunkowe	4.8	5.5	4.0	6.3	5.3	4.5	3.5	2.5
Współczynnik bogactwa gatunkowego Shannona	0.88	1.14	0.86	0.92	0.85	0.97	1.12	0.67
Współczynnik dominacji gatunkowej Simppsona	0.53	0.42	0.61	0.57	0.59	0.49	0.40	0.63

Tabela 16. Wyniki analizy ANOSIM wykonanej z wykorzystaniem współczynnika Bray – Burtisa (pola niezacieniowane wartości R, pola zacieniowane poziom istotności, pola puste zależność nieistotna statystycznie) dla analizowanych powierzchni badawczych (A) oraz przyjętych klas defoliacji (B)

A

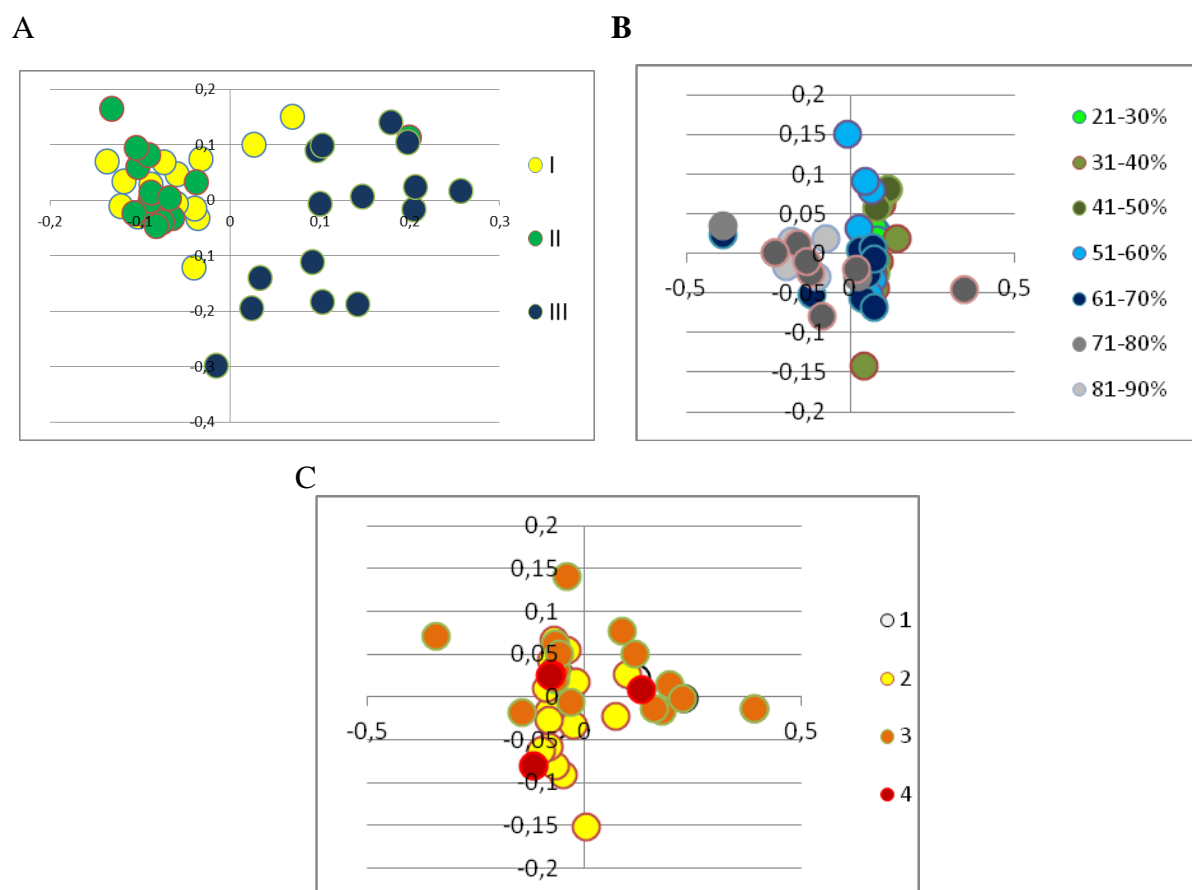
0	1	2	3
1	0	0,0234	0,0001
2	0,1065	0	0,0001
3	0,6151	0,515	0

Tabela 16. B

0	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
21-30	0						0,0082	0,008
31-40	-0,09067	0					0,0051	0,0062
41-50	0	-0,1227	0			0,045	0,0074	0,0016
51-60	-0,01567	0,127	0,09124	0			0,0035	0,0009
61-70	-0,03158	0,06977	0,05921	-0,02	0		0,0291	0,0128
71-80	0,5182	0,3854	0,6455	0,4708	0,2629	0		
81-90	1	0,8095	1	0,8677	0,3879	0,6071	0	
91-100	0,4724	0,4578	0,5441	0,5412	0,3055	0,3168	-0,2224	0

Analiza NMDS pokazała, iż podobieństwo zbiorowisk GEM w ramach analizowanych stanowisk badawczych jest wyższe dla drzewostanów o najlepszym i pośrednim stanie zdrowotnym, natomiast znacznie odbiega od tych dwóch stanowisk drzewostan najbardziej uszkodzony, dla którego punkty reprezentujące pobrane próby grupują się oddzielnie (Rycina 9A). Analiza ANOSIM wykazała statystycznie istotnie różnice w strukturze zbiorowisk GEM pomiędzy drzewami o defoliacji poniżej 70% i drzewami o ubytku aparatu asymilacyjnego powyżej 70% (Tabela 16B). Na wykresie NMDS wyodrębniają się 2 oddzielne zgrupowania

punktów reprezentujących drzewa, których defoliacja mieści się w przedziale do 70% (punkty w różnych odcieniach koloru zielonego i niebieskiego), oraz powyżej 70% (kolor szary). przyjęte stopnie defoliacji (Rycina 9B). Analiza ANOSIM nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy drzewami o różnym stopniu witalności („global R”= 0,111 dane nie pokazane), co skutkuje grupowaniem się drzew o różnym stopniu witalności na jednym obszarze wykresu NMDS (Rycina 9C)



Rycina 9. Wyniki analizy NMDS dla powierzchni badawczych (A), stopni defoliacji (B), oraz stopnia witalności drzew (C)

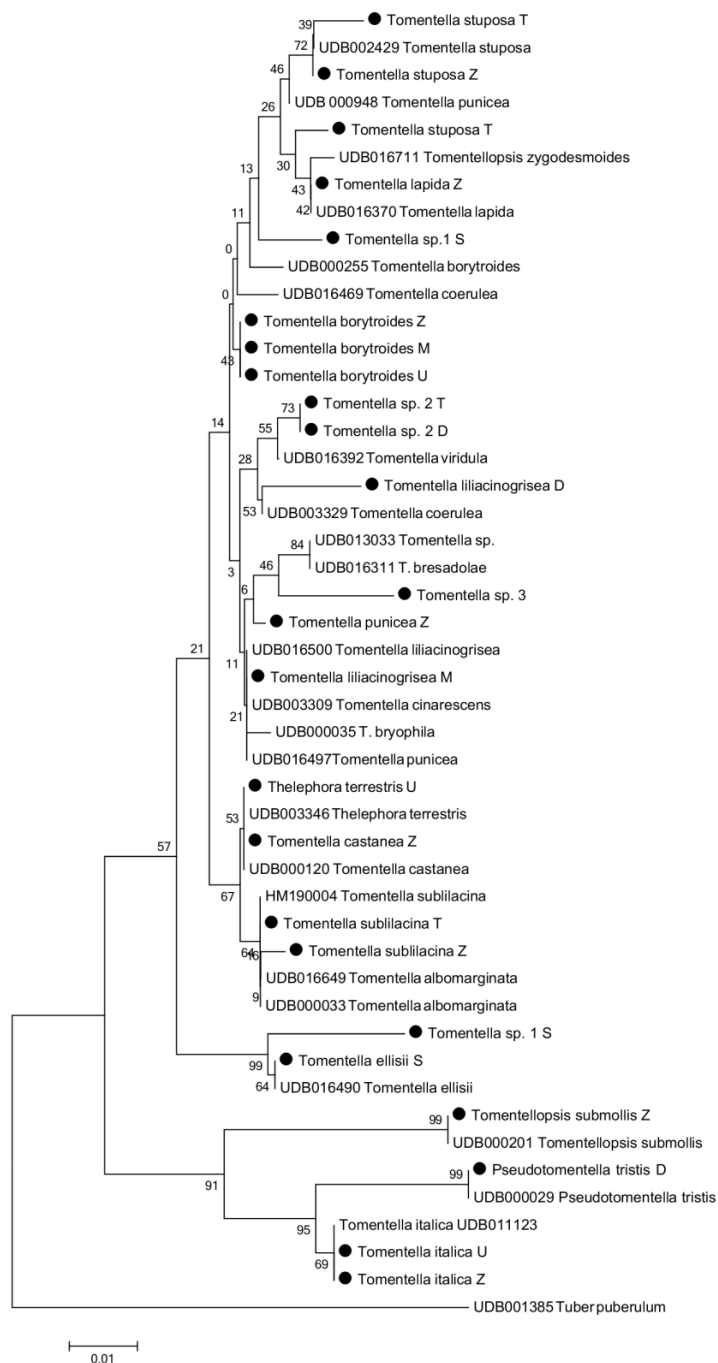
Spośród 37 zidentyfikowanych taksonów tylko dwa tj. *C. geophilum* oraz *L. quietus* odnotowano na wszystkich stanowiskach. Udział obu tych gatunków wzrastał wraz ze stopniem defoliacji, jednak korelacja ta była nieistotna statystycznie ($F=0,18$ dla *C. geophilum* przy poziomie istotności $p=0,75$ oraz $F=0,16$ dla *L. quietus* przy poziomie istotności $p=0,71$). Z drugiej jednak strony obfitość występowania obu taksonów była negatywnie istotnie skorelowana ($F= - 0,55$; $p<0,05$). Istotnie statystyczna jest również zależność pomiędzy udziałem mikoryz martwych a stopniem defoliacji ($F=0,39$; $p<0,05$).

4.4 Analiza filogenetyczna zidentyfikowanych przedstawicieli rodziny *Thelephoraceae*.

W ramach przeprowadzonych badań zidentyfikowano molekularnie 14 taksonów należących do rodziny *Thelephoraceae*. W prezentowanej analizie filogenetycznej wykorzystano 23 sekwencje uzyskane w toku prac oraz 24 sekwencje referencyjne, pozyskane z baz danych UNITE i NCBI. Dla zakorzenienia drzewa filogenetycznego dołączono również sekwencję *Tuber puberulum* (UDB001385), która reprezentuje odrębną linię filogenetyczną. Średni dystans genetyczny pomiędzy analizowanymi sekwencjami wynosił 0,036. Uzyskane drzewo filogenetyczne przedstawia Rycina 10. Dla większości sekwencji topografia uzyskanego drzewa filogenetycznego potwierdza identyfikację molekularną.

Przeprowadzona analiza filogenetyczna zgrupowała kilka wyodrębnionych taksonów (*Tomentella lapida*, *T. botryoides*, *T. ellisii*, *T. submolis*, *Pseudotomentella tristis*) w oddzielne kłady, które charakteryzowały odrębne gatunki. Wynik ten wsparty jest wartościami dystansów ewolucyjnych w obrębie ww. kładów, które mieszczą się w przedziale od 0,00 do 0,03 (dane nie pokazane). Inaczej mówiąc różnice pomiędzy sekwencjami zgrupowanymi w poszczególnych kładach (reprezentujących gatunki) nigdy nie były wyższe niż 3%. W przypadku sekwencji *T. stiposa*, tworzyły one wspólny kład z *T. punicea*. Podobnie było w przypadku *T. lilacinogrisea* (wspólny kład z *T. bryophila* i *T. lapida*), oraz kładów wspólnych dla 2 gatunków (*T. sublilacina*/*T. terrestris* oraz *T. castanea*/*T. albomarginata*). W tych przypadkach wartości dystansów ewolucyjnych często przekraczały 0,03, co potwierdza, iż molekularna identyfikacja sekwencji oparta na algorytmie BLASTn była słuszna (Tabela 5 oraz Tabela 13). Dwie z sekwencji opisanych do rodzaju tj. (*Tomentella* sp. M32 oraz *Tomentella* sp. T28, grupują się w jednym kładzie z sekwencją *T. viridula*. Obliczony dystans pomiędzy sekwencjami M32 i T28 a sekwencją UDB016392 wynosił 0,0035, co teoretycznie uprawnia zakwalifikowanie taksonów *Tomentella* sp. M32 oraz *Tomentella* sp. T28 jako *T. viridula*. Należy jednak pamiętać, że w trakcie przeprowadzenia analiz filogenetycznych część informacji zostaje usunięta z analiz poprzez wyrównanie („odcięcie”) końców sekwencji. W omawianym przypadku różnice pomiędzy porównywanymi sekwencjami mogły być ulokowane w nieanalizowanych (odciętych) fragmentach. Dlatego też nie przekwalifikowano ww. taksonów i pozostawiono im nazwy pierwotnie nadane. W przedstawionej analizie kład utworzony z sekwencji *T. ellisii* najbardziej odbiegał od pozostałych *Tomentella*. W jego skład wchodziły sekwencja referencyjna UDB 0164902 wraz z 2 sekwencjami uzyskanymi w badaniach szkółkowych (*T. ellisii* S oraz zbliżona do niej *Tomentella* sp. S). W przeprowadzonej analizie oddzielnie grupują się kłady składające się z sekwencji należących do rodzaju *Tomentelopsis* oraz

Pseudotomentella. W kładzie *Tomentopsis*/*Pseudotomentella* nieoczekiwanie znalazły się również sekwencje *T. italica*.



Rycina 10. Drzewa podobieństwa filogenetycznego sporządzone dla sekwencji taksonów z rodziny *Thelephoraceae* uzyskanych w toku prac niniejszej rozprawy (zaznaczone czarnymi kołami) oraz pochodzących z baz sekwencji UNITE oraz GenBank (z numerami referencyjnymi). Dla zakotwiczenia drzewa wykorzystano sekwencję UDB001385. Drzewo konstruowane zostało przy użyciu programu MEGA5 przy zastosowaniu algorytmu przyłączania sąsiada (Neighbor Joining - NJ) z dwuparametrowym modelem Kimury. Wsparcie dla uzyskanych topologii drzew filogenetycznych szacowano metodą numerycznego próbkowania (Bootstrap-test) wykonując 1000 powtórzeń z losowym dodawaniem sekwencji.

5. Dyskusja

Celem niniejszej rozprawy było opisanie zbiorowisk GEM związanych z dębem szypułkowym i bezszypułkowym na obszarze Płyty Krotoszyńskiej, na której, ze względu na specyficzne warunki edaficzne, występują unikalne w skali kraju lasy liściaste z przeważającym udziałem dębów. Badania podzielone zostały na trzy części, które odpowiadały trzem odrębnym problemom badawczym. Celem części prowadzonej w szkółce leśnej było określenie zmian zachodzących w strukturze zbiorowisk GEM w pierwszym roku wzrostu siewek, od wysiewu żołądzi do końca sezonu wegetacyjnego. Badania te uwzględniły ponadto jakościowe i ilościowe zmiany w zbiorowisku GEM zachodzące w wyniku infekcji siewek przez patogenicznego grzyba *Erysiphe alphitoides*, wywołującego chorobę zwaną mączniakiem prawdziwym dębu. Z kolei celem badań prowadzonych w przyjętym układzie chronosekwencji drzewostanów było opisanie różnorodności zbiorowisk GEM dębów na jednorodnym obszarze, jakim jest Płyta Krotoszyńska, oraz porównanie zbiorowisk tworzących się w różnych etapach rozwoju drzewostanu. Ostatnia część badań miała na celu poznanie jak kształtują się zbiorowiska GEM w zamierających, dojrzałych dąbrowach w odniesieniu do stanu zdrowotnego pojedynczych drzew i całych drzewostanów. Dla większej przejrzystości dyskusji wyniki każdej z części przedyskutowane zostały w odrębnych podrozdziałach (5.1, 5.2 i 5.3), a na zakończenie przedstawione zostało podsumowanie uzyskanych wyników w formie dyskusji ogólnej (5.4)

5.1. Dynamika zbiorowisk grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej

Jak dotąd badania zbiorowisk GEM siewek/sadzonek różnych gatunków drzew hodowanych w szkółkach, skupiały się na opisanu różnorodności gatunkowej po pierwszym lub drugim roku wzrostu roślin w szkółce leśnej (Menkis i wsp. 2005; Iwański i wsp. 2006, Rudawska i wsp. 2006, Trocha i wsp. 2006, Leski i wsp. 2008, 2010; Soutworth i wsp. 2009, Menkis i Vasaitis 2011; Pietras i wsp. 2013). Nową problematyką podjętą w niniejszej rozprawie było zbadanie, na przykładzie siewek dębu, jak kształtuje się zbiorowisko GEM w szkółce leśnej od wysiewu nasion (żołądzi) do końca pierwszego sezonu wegetacyjnego.

Zmiany zbiorowiska GEM siewek dębu w pierwszym sezonie wzrostu w warunkach szkółki leśnej zachodziły bardzo dynamicznie. Najwcześniej obserwowanym symbiontem mikoryzowym kolonizującym korzenie siewek dębów był grzyb *S. verrucosum*, którego pierwsze mikoryzy pojawiły się już po 50 dniach od wysiewu żołądzi. Grzyby z rodzaju

Scleroderma uważane są za symbionty nawiązujące symbiozę mikoryzową zarówno z drzewami liściastymi, jak i iglastymi (Jeffris 1999). Jednak badania przeprowadzone w Pracowni Badania Mikoryz Instytutu Dendrologii PAN, na siewkach różnych gatunków drzew w szkółkach leśnych, pokazują zdecydowanie większe preferencje *Scleroderma* spp. do kolonizacji gatunków liściastych (Iwański i wsp. 2006; Rudawska i wsp 2006; Trocha i wsp. 2006; Leski i wsp. 2008, 2010; Pietras i wsp 2013). Intrygującą kwestią wynikającą z tych badań jest pytanie, dlaczego właśnie grzyb *S. verrucosum* był pierwszym symbiontem na badanych siewkach dębu? *Scleroderma* spp. uważane są za grzyby o charakterze pionierskim, występujące szczególnie często na terenach zdegradowanych (Duñabeitia i wsp. 2004). Nie można więc wykluczyć, że silnie przekształcone środowisko glebowe szkółki leśnej sprzyja w większym stopniu rozwojowi mikoryz grzyba *Scleroderma* niż innych gatunków GEM, współwystępujących w szkółce leśnej. Pojawienie się mikoryz *S. verrucosum* na korzeniach dębów na tak wczesnym etapie wzrostu siewek w szkółce leśnej może być też związane z większą konkurencyjnością względem innych taksonów GEM, wynikającą z pewnych saprobiotycznych właściwości tego grzyba (Jeffris 1999). W badaniach *in situ*, opisujących zbiorowiska GEM półrocznych siewek dębu szypułkowego rosnącego w odnowionym lesie liściastym, spośród zidentyfikowanych 41 taksonów, najczęstszym był inny grzyb z rodzaju *Scleroderma* - *S. citrinum* (Newton 1991, Newton i Pigott 1991), którego obfitość występowania sięgała 61% całkowitej puli mikoryz. Inną możliwą przyczyną szybkiej kolonizacji badanych siewek dębu przez *S. verrucosum* może być duża obfitość inokulum tego grzyba w podłożu szkółkowym. Może ona wynikać z ogromnej ilości zarodników produkowanych jesienią przez kuliste lub bulwiaste owocniki tego grzyba. Zarodniki te przelegują zapewne w podłożu szkółkowym i wiosną po wykiełkowaniu stanowią pierwotne inokulum grzybowe dla rozwijających się siewek (Jeffris 1999). Natomiast mało prawdopodobne wydaje się, że źródłem inokulum grzybowego w szkółce leśnej jest wspólna sieć mikoryzowa, która może łączyć siewki i dojrzałe drzewa rosnące obok siebie. Robertson (1954) i Newton (1992) sugerowali, że inokulacja siewek rosnących w pobliżu dojrzałych drzew zachodzi głównie przez wspólną sieć grzybni ekstramatrykalnej. Wyższe bogactwo gatunkowe GEM na sadzonkach rosnących blisko dojrzałych drzew w stosunku do sadzonek rosnących na otwartej przestrzeni, opisane było przez Kranabetter i Wylie (1998), Durall i wsp. (1999) oraz Cline i wsp. (2005). Jednak w przypadku szkółki leśnej Miranowo odległość dojrzałych drzew od siewek rosnących na kwaterze, na której założono doświadczenie była znaczna i raczej wyklucza kolonizację sadzonek przez sieć grzybni ekstramartykalnej. Ostatnie badania przeprowadzane na sadzonkach daglezi zielonej rosnących w różnych

odległościach od dojrzałych drzew sugerują, że główną drogą inokulacji sadzonek są jednak zarodniki rozprzestrzeniające się przez wiatr, natomiast kolonizacja korzeni przez sieć grzybni ekstramatrykalnej ma mniejsze znaczenie (Taste i wsp. 2009). Stąd najbardziej przekonujący wydaje się argument, że pierwotna kolonizacja korzeni drobnych dębów w szkółce leśnej Miranowo odbywa się za pośrednictwem grzybni rozwijającej się z zarodników *S. verrucosum*. Zarodniki takie stanowią element glebowego banku odpornych zarodników (z ang. „resistant soil propagule bank”), zachowujących żywotność nieraz przez wiele sezonów wegetacyjnych (Milleret i wsp. 1994, Brunset i wsp. 2009, Nguyen i wsp. 2012).

W szkółce leśnej Miranowo, w trakcie miesiąca od pojawienia się na siewkach pierwszych mikoryz tworzonych przez *S. verrucosum* odnotowano występowanie 3 kolejnych taksonów GEM o charakterze pionierskim (*H. sacchariolens*, *L. tortilis*, *I. curvipes*), których zarodniki podobnie jak zarodniki *S. verrucosum* mogły łatwo się rozprzestrzeniać na otwartych przestrzeniach kwater szkółek leśnych. Na danym etapie wiedzy trudno wyjaśnić, dlaczego mikoryzy tych grzybów pojawiły się po mikoryzach *S. verrucosum*, choć wydaje się, że decydującym czynnikiem jest mniejsza liczba produkowanych przez te grzyby zarodników, a tym samym mniejsza liczba potencjalnych propagul w podłożu szkółkowym. Ważne znaczenie może mieć także typ eksploracyjny grzybni wytwarzanej przez grzyby z rodzaju *Scleroderma*. Wykazano, że grzybnia *Scleroderma verrucosum*, odznaczająca się tzw. długodystansowym typem eksploracyjnym, rośnie w shomogenizowanej glebie mineralnej dużo szybciej niż inne gatunki GEM o typach eksploracyjnych średnim i gładkim (Thompson i wsp. 1994)

Wraz z pojawieniem się nowych gatunków zaobserwowano zmiany w strukturze ilościowej badanego zbiorowiska. W okresie od 30 czerwca do 20 lipca dominował grzyb *I. curvipes*. Od początku sierpnia tego gatunku nie znajdowano, natomiast w dużej obfitości występowały grzyby *H. sacchariolens* oraz *L. tortilis*. W przeciągu 10 dni (od 10 – 20 VII) wzrostu siewek w szkółce leśnej udział procentowy grzyba *I. curvipes* malał z 60,98 % do 6,85%, natomiast obfitość występowania *H. sacchariolens* i *L. tortilis* wzrosła odpowiednio od 30,49 do 74,04% oraz od 0 do 42,25% (Patrz Rycina 7B, Tabela 5). Przyczyny tak gwałtownych zmian ilościowych zachodzących w pierwszym roku wzrostu siewek nie są znane i nie były dotąd badane, a ich pełne wyjaśnienie nie mieści się w zakresie tej pracy. Pełniejszą interpretację zmian, jakie zachodzą w zbiorowisku GEM w pierwszym sezonie wegetacyjnym wzrostu siewek w szkółkach leśnych mogłyby umożliwić badania nad sezonową aktywnością enzymatyczną poszczególnych gatunków GEM kolonizujących korzenie siewek, jak również analiza aktywności hormonalnej, głównie związanej z syntezą

auksyny (IAA) u grzybów zidentyfikowanych jako najwcześniejsi „kolonizatorzy” siewek w szkółkach leśnych. Niewyjaśnione pozostaje również czy opisana dynamika zbiorowisk GEM charakterystyczna jest tylko dla szkółki leśnej Miranowo, czy może być rozpatrywana jako ogólny wzorzec dla kolonizacji siewek dębu w szkółkach leśnych. Dlatego też badania dotyczące dynamiki zbiorowisk GEM w szkółkach leśnych powinny być kontynuowane dla lepszego poznania tego procesu w kontekście fizjologii nawiązywania symbiozy mikoryzowej, ekologii GEM oraz praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników w szkółkarstwie leśnym.

W trakcie pierwszego roku wzrostu siewek ich korzenie skolonizowane były przez większość obecnych gatunków GEM, które nawiązywały symbiozę mikoryzową z sadzonkami innych drzew liściastych (*L. tortilis*, *S. verrucosum*, *Tomentella* spp.), jak również taksonów wspólnych dla gatunków iglastych i liściastych (*C. geophilum*, *Tuber* sp., *H. sacchariolens*) (Patrz wyniki 4.1.2.). Stosunkowo duża liczba gatunków GEM zidentyfikowanych na siewkach dębu w trakcie pierwszego roku wzrostu w szkółce (9 taksonów), w odniesieniu do całkowitego bogactwa GEM szkółki leśnej Miranowo (14 taksonów), świadczy o znacznym potencjale nawiązywania mikoryz przez siewki dębu w pierwszym sezonie wzrostu w warunkach szkółki leśnej. Wbrew powszechnie panującej opinii, że na skutek intensywnej hodowli siewek w szkółkach leśnych może następować znaczne zubożenie kompozycji gatunkowej GEM (O'Neill i Mitchell 2000; Menkis i Vasaitis 2011), badania ostatnich lat, głównie oparte o analizy molekularne, pokazały, że sadzonki produkowane w szkółkach leśnych, także w Polsce, charakteryzują się stosunkowo wysokim zróżnicowaniem i bogactwem gatunkowym zbiorowisk GEM (Karnaghan i wsp. 2003; Menkis i wsp. 2005; Rudawska i Leski 2009; Leski i wsp. 2010; Menkis i Vasaitis 2011; Pietras i wsp. 2013). Dla poznania jak kształtuje się bogactwo gatunkowe GEM dębów w szkółce leśnej na tle innych gatunków drzew produkowanych w tej szkółce zbadano jedno i dwuletnie sadzonki drzew ektomikoryzowych hodowanych w szkółce Miranowo. Łącznie przebadano 115 siewek/sadzonek reprezentujących 7 gatunków drzew tworzących ektomikoryzy, co pozwoliło na wyróżnienie 14 taksonów GEM, spośród których 9 taksonów zidentyfikowanych było na siewkach dębów w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce. Opisane bogactwo gatunkowe GEM kolonizujących korzenie drobne dębów w szkółce leśnej potwierdza, że zbiorowiska GEM tworzone na siewkach dębów są bogate i zróżnicowane, szczególnie w porównaniu z gatunkami iglastymi. W szkółce leśnej Miranowo całkowite bogactwo gatunkowe GEM zidentyfikowane na jednorocznych siewkach sosny zwyczajnej, świerka pospolitego i modrzewia europejskiego wynosiło odpowiednio 2, 3 oraz 2 taksony.

Bogactwo gatunkowe GEM stwierdzone w szkółkach leśnych na gatunkach iglastych (Iwański i wsp. 2007; Rudawska i wsp. 2007; Leski i wsp. 2008) było z reguły niższe niż w przypadku gatunków liściastych (Leski i wsp. 2010; Pietras i wsp. 2013). Obecny stan wiedzy nie pozwala wyjaśnić z czego wynika większe niż u gatunków iglastych bogactwo GEM obserwowane na dębach rosnących w szkółkach leśnych i zagadnienie to wymagałoby dalszych badań.

Jedną z prób znalezienia odpowiedzi na to pytanie były analizy zawartości cukrów niestrukturalnych (glukozy i skrobi) w korzeniach siewek dębów, w powiązaniu z występowaniem poszczególnych gatunków GEM. Glukoza jest podstawowym monocukrem przekazywanym przez korzenie do partnera grzybowego (Nehls i wsp. 2010), natomiast skrobia należy do polisacharydów (zbudowanych wyłącznie z merów glukozy połączonych wiązaniami α -glikozydowymi) i stanowi podstawowy związek zapasowy u roślin. W symbiozie ektomikoryzowej zarówno glukoza jak i skrobia mogą być wykorzystywane jako źródła węgla dostępne dla mykobionta kolonizującego system korzeniowy rośliny (Salzer i Hager 1991). Według klasycznej teorii węglowodanowej Björkmana (1970) nawiązanie symbiozy mikoryzowej następuje po osiągnięciu pewnej wartości progowej stężenia węglowodanów (cukrów niestrukturalnych) w korzeniach. W swej teorii Björkman zakładał, że partner grzybowy jest w pełni uzależniony od cukrów oferowanych przez partnera roślinnego. W przypadku badań przeprowadzonych w szkółce leśnej Miranowo najwyższy poziom glukozy w korzeniach odnotowany był w momencie zawiązywania pierwszych mikoryz oraz w czasie rekolonizacji korzeni drobnych przez GEM po początkowej fazie występowania symptomów chorobowych mączniaka prawdziwego dębu (patrz Rycina 7). W odniesieniu do ogólnego wzorca kolonizacji korzeni siewek dębu przez GEM w omawianym doświadczeniu, wynik ten potwierdza założenia teorii Björkmana (1970). Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych zależności pomiędzy obfitością występowania poszczególnych taksonów GEM, a całkowitą zawartością cukrów niestrukturalnych w korzeniach. Wynik ten pokazuje, że zidentyfikowane w trakcie prowadzenia doświadczenia GEM mają podobne zapotrzebowanie energetyczne względem związków węgla otrzymywanych przez partnera roślinnego.

W trakcie prowadzenia badań nad dynamiką zbiorowisk grzybów mikoryzowych dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu siewek w szkółce leśnej, nastąpiła niezaplanowana infekcja siewek przez patogenicznego grzyba *Erysiphe alphitoides*, która wniosła nowe, interesujące spostrzeżenia na temat interakcji pomiędzy grzybami mikoryzowymi, patogenicznymi i partnerem roślinnym. Infekcja ta spowodowała zmiany zawartości cukrów

niestrukturalnych w korzeniach. W okresie bezpośrednio po pierwszych symptomach choroby, obserwowano wzrost zawartości, zarówno glukozy (4,35 mg/g, statystycznie istotny), jak i skrobi (1,99 mg/g, statystycznie nieistotny) w korzeniach (Rycina 7C). Wpływ uszkodzeń części nadziemnej (defoliacja) na krótkotrwały wzrost ilości cukrów niestrukturalnych w korzeniach obserwowany był także w innych badaniach (Holland i wsp. 1996). Także Kullberg i Walander (2003), opisali mechanizm wycofywania i magazynowania związków węgla w korzeniach siewek dębu szypułkowego poddawanych defoliacji. Nie wykluczone, że podobnie działo się w przypadku badanych siewek, których aparat asymilacyjny został zainfekowany przez grzyba powodującego mączniaka prawdziwego dębu. Wycofanie cukrów z liści do korzeni mogło stanowić reakcję obronną rośliny, służącą osłabieniu patogena i ograniczeniu rozwoju infekcji.

Proces chorobowy siewek dębu wpłynął również na masowe zamieranie mikoryz (udział mikoryz martwych wzrósł z poziomu zerowego do 89,16%, Patrz Rycina 7A). Co ciekawe nastąpiło to w okresie poprzedzającym najintensywniej obserwowane symptomy chorobowe oraz przed stwierdzeniem najwyższej zawartości glukozy w korzeniach. Mechanizmy masowego zamierania mikoryz pod wpływem infekcji organizmów patogenicznych nie są jak dotąd poznane i wymagają dodatkowych badań prowadzonych w kontrolowanym układzie doświadczalnym. Niewątpliwie takie badania pozwoliłyby na lepsze poznanie interakcji pomiędzy grzybami mikoryzowymi, patogenicznymi i partnerem roślinnym.

5.2. Zróżnicowanie grzybów ektomikoryzowych wchodzących w symbiozę mikoryzową z dębami w układzie chronosekwencji drzewostanów

W drzewostanach dębu szypułkowego i dębu bezszypułkowego badanych w układzie chronosekwencji na obszarze Płyty Krotoszyńskiej przebadane zastały łącznie próby reprezentujące 120 drzew (87 dębu szypułkowego oraz 33 dębu bezszypułkowego). Analiza ANOSIM nie wykazała różnic pomiędzy zbiorowiskami GEM obu analizowanych dębów. Podobnie brak różnic pomiędzy zbiorowiskami GEM dębu szypułkowego i bezszypułkowego wykazano w badaniach prowadzonych w szkółkach leśnych (Leski i wsp. 2010). Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie oraz te przedstawione przez Leskiego i wsp. (2010) potwierdzają pogląd, że blisko spokrewnione gatunki drzew (należące do jednego rodzaju) charakteryzują się podobnymi zbiorowiskami GEM (Walker i wsp. 2005; Ishida i wsp. 2007). Jednakże w literaturze spotkać można kilka prac opisujących różnice w kompozycji gatunkowej GEM blisko spokrewnionych dębów. Różnice te wynikać mogą z uwarunkowań

ekologicznych (tolerancja na suszę) (Cavender-Bares i wsp. 2009), genetycznych lub fizjologicznych (sezonowość liści) (Morris i wsp. 2008). Podobna struktura GEM dębu szypułkowego i dębu bezszypułkowego dowodzi, że różnice genetyczne, fizjologiczne i ekologiczne pomiędzy tymi gatunkami drzew nie są znaczące dla kształtowania się zbiorowisk GEM.

W badaniach przeprowadzonych na obszarze Płyty Krotoszyńskiej kolonizacja korzeni drobnych dębów niemal zawsze dochodziła do 100%. Podobne obserwacje poczyniono dla *Q. liaotungensis*, gdzie udział korzeni drobnych skolonizowanych przez GEM wahał się w granicach 85% (dla 5-letnich drzew) do 90% (dla drzew 50-letnich). Zgoła inne wyniki uzyskał Gebhardt i wsp. (2007) w badaniach *Q. rubra*. Szczególnie odbiegają tu drzewa 5-letnie, gdzie kolonizacja systemu korzeniowego wynosiła zaledwie 15%. W przypadku dębu czerwonego na niższą obfitość występowania ektomikoryz wpływać może jednocześnie występująca kolonizacja korzeni przez grzyby arbuskularne (Dieckie i wsp. 2001). Występowanie zarówno ektomikoryz jak i mikoryz arbuskularnych charakterystyczne jest dla północnoamerykańskich gatunków dębów (Dieckie i wsp. 2001), ale również spotykane jest u innych gatunków drzew, takich jak topole (Karliński i wsp. 2010). W przypadku dębu szypułkowego i dębu bezszypułkowego wysoka kolonizacja systemów korzeniowych jest normą, o czym świadczą wyniki badań opisanych w Części I niniejszej rozprawy, jak również badania przeprowadzone na początkowym etapie wzrostu siewki w szkółkach leśnych (Leski i wsp. 2010).

W badaniach dąbrów krotoszyńskich zidentyfikowano łącznie 75 taksonów GEM. Całkowite bogactwo gatunkowe zbiorowisk GEM dębów obserwowane w różnych stadiach rozwojowych drzewostanów Płyty Krotoszyńskiej mieści się w zakresie notowanym dla innych gatunków dębów (Tabela 17) (Gebhardt i wsp. 2007, Wang i wsp. 2012). Dane literaturowe opisujące zjawisko chronosekwencji u innych gatunków drzew pokazują, że wraz z rosnącym wiekiem drzewostanu bogactwo gatunkowe zbiorowisk GEM ulega jedynie nieznacznym zmianom, natomiast istotnie zmienia się kompozycja gatunkowa zbiorowisk GEM (Jonsson i wsp. 1999a; Byrd i wsp., 2000). W przeciwieństwie do wcześniejszych doniesień literaturowych, w przypadku dąbrów rosnących na obszarze Płyty Krotoszyńskiej, całkowite bogactwo gatunkowe różniło się pomiędzy analizowanymi fazami rozwojowymi. W najmłodszej fazie rozwojowej było najniższe i wynosiło 15 taksonów. Pośrednie wartości przybierało w fazie tyczkowiny (19 taksonów), natomiast najwyższe było w fazie młodnika i drzewostanu dojrzałego (odpowiednio 31 i 32 taksonów). Niższa wartość bogactwa gatunkowego w uprawach może wynikać z zaistniałego zaburzenia środowiska, jakim jest

zręb zupełny (Jones i wsp. 2003), zastosowany dla odnowienia lasu w przypadku wszystkich analizowanych upraw. Podobne zależności, opisujące ograniczenie bogactwa gatunkowego pod wpływem wcześniej zaistniałego zaburzenia (również zrębu zupełnego) stwierdził Iwański (2007) dla sosny zwyczajnej. Spadek bogactwa gatunkowego zbiorowisk GEM po silnym zaburzeniu środowiska nie jest jednak regułą. Grogan i wsp. (2000) stwierdzili, że naturalne odnawiające się po pożarze siewki *Pinus muricata* skolonizowane były przez 30 gatunków GEM, chociaż skład gatunkowy zbiorowiska GEM był zupełnie inny, niż w sąsiadujących dojrzałych drzewostanach (Gardes i Bruns 1996; Taylor i Bruns 1999). W przypadku wyżej przedstawionych badań powodem różnic ilościowych w zbiorowisku GEM może być drastyczna zmiana warunków edaficznych, która niewątpliwie nastąpiła po pożarze.

W niniejszej rozprawie stwierdzono, że w stosunku do uprawy, w fazie rozwojowej młodnika następuje dwukrotne zwiększenie liczby gatunków GEM. Przejście z fazy uprawy w fazę młodnika znane jest jako moment zwierania się koron drzew rosnących obok siebie. W tym czasie drastycznie zmieniają się warunki mikroklimatyczne wewnątrz drzewostanu, wzrasta wilgotność gleby, zmniejsza się jej temperatura, rozpoczyna się też proces akumulacji materii organicznej w postaci ściółki nagromadzonej na dnie lasu (Linder i wsp. 1997; Kozłowski 2002; Claus i George 2005). Wzrost ilości materii organicznej uważany jest za ważny czynnik stymulujący zwiększanie się bogactwa gatunkowego GEM. Nieznana jest natomiast przyczyna niższego (o 1/3 w stosunku do bogactwa gatunkowego GEM drzewostanów dojrzałych) całkowitego bogactwa gatunkowego odnotowana w fazie tyczkowiny. Jak dotąd zmniejszenie różnorodności GEM dębów w średnim wieku nie było odnotowane. Warto podkreślić, że spadek bogactwa gatunkowego w fazie tyczkowiny nie mógł być skutkiem różnej liczby analizowanych wierzchołków mikoryzowych, gdyż wartość tego parametru nie różniła się pomiędzy analizowanymi fazami rozwojowymi. Możliwym wytłumaczeniem mniejszej liczby znalezionych taksonów w fazie tyczkowiny mogą być zmiany w bilansie energetycznym drzewa. Genet i wsp. (2009) obserwowali największe stężenie cukrów niestrukturalnych w drewnie 50-cio letnich drzew *Q. petraea* w porównaniu z drzewostanami w innym wieku, badanymi w układzie chronosekwencji. W wieku ok. 50 lat następuje wzmożony przyrost drzew najpierw na wysokość, później na grubość, co ujawnia się najwyższą, w trakcie całego wzrostu drzewa, akumulacją biomasy (Genet i wsp. 2009). Może się to łączyć ze zmniejszeniem ilości asymilatów przekazywanych do korzeni, co skutkować może ograniczeniem występowania pewnych taksonów GEM bardziej wymagających względem źródła węgla. Jednak na tym etapie badań jest to tylko

jedna z hipotez próbujących tłumaczyć zmiany jakie zachodzą w zbiorowiskach GEM na różnych etapach rozwoju drzewostanu.

Zbiorowisko GEM każdej z badanych w układzie chronosekwencji faz rozwojowych charakteryzowało się typową strukturą, w której 1-2 gatunki dominują w zbiorowisku, kolonizując 50 i więcej procent korzeni drobnych, część gatunków występuje z udziałem nieprzekraczającym 5-8%, a pozostałe gatunki spotykane są sporadycznie, z niewielką obfitością, sięgająca 1%. W młodnikach dominującymi grzybami były taksony zaliczane do kompleksu *Hymenoscyphus ericae*, w drzewostanach starszych natomiast dominował grzyb *C. geophilum*. Dominacja różnych taksonów w poszczególnych stadiach rozwojowych rzutowała na wyniki analizy ANOSIM. Na wykresie NMDS, który wizualizuje wyniki ANOSIM, różnice pomiędzy zbiorowiskami GEM widoczne są tylko pomiędzy fazą uprawy a pozostałymi stadiami rozwojowymi (Tabela 10, Rycina 8). Zastosowana metoda porównawcza (ANOSIM z wykorzystaniem współczynnika Bray – Curtisa, NMDS) bierze pod uwagę nie tylko relacje jakościowe (bogactwo gatunkowe), ale również ilościowe (liczbę mikoryz danego taksonu w ogólnej puli mikoryz). Dlatego też czynnikiem, który ujedynolcał zbiorowiska GEM dębów w fazach rozwojowych starszych od młodników był wysoki udział mikoryzy z kompleksu *C. geophilum* w ogólnej liczbie mikoryz (od 7,11 do 55,21%). Z drugiej strony 50 spośród 75 wydzielonych taksonów (66%) znajdujących było w jednej fazie rozwojowej, lub nawet w pojedynczych próbach. Niemożliwym jest więc rozstrzygnięcie, czy były to taksony, które preferowały fazę rozwojową, w której były znajdowane, czy też ze względu na małą obfitość występowania, nie zostały one znalezione w pozostałych fazach. Wyniki badań zmian sukcesyjnych zbiorowisk GEM zachodzących u różnych gatunków dębów nie pozwalają wysunąć jednoznacznych wniosków odnoszących się do wpływu chronosekwencji. Badania *Q. rubra* przeprowadzone w Niemczech (Gebhardt i wsp. 2007) jednoznacznie dowodzą, że w drzewostanach dębu czerwonego w wieku od 5 do 46 lat zmieniał się skład gatunkowy i udział poszczególnych gatunków GEM. Wraz z wiekiem drzew wzrastało całkowite bogactwo gatunkowe GEM: z 5 gatunków w wieku 5 lat, do 27 gatunków w wieku 46 lat. Zauważyć też można grupy grzybów występujące wyłącznie na powierzchniach w jednym wieku, co potwierdza teorię zmian sukcesyjnych zachodzących w drzewostanach dębowych w różnym wieku. Całkowicie inne wyniki podawane są dla *Q. liaotungensis*, rosnącego w Chinach (Wang i wsp. 2012). W przypadku tych badań analizowany był jeden drzewostan różnowiekowy, w którym obok siebie występowały drzewa reprezentujące 3 różne fazy rozwojowe: sadzonki (5 lat), drzewa młode (15 lat) oraz drzewa dojrzałe (50 lat). Podobnie jak w dąbrowach krotoszyńskich

najobficiej występującym taksonem stwierdzonym na *Q. liaotungensis* był *C. geophilum*. Autorzy nie wykazali istotnych różnic w strukturze jakościowej i ilościowej GEM pomiędzy drzewami w różnym wieku. Spośród 66 zidentyfikowanych taksonów, 57 (86,4%) występowało we wszystkich badanych klasach wieku. W ten sposób Wang i wsp. (2012) kwestionują występowanie zmian sukcesyjnych zachodzących w układzie chronosekwencji, twierdząc, że wpływ wieku partnera roślinnego na zbiorowisko GEM jest marginalny. Należy jednak zauważyć, że zbliżony skład gatunkowy zbiorowisk GEM *Q. liaotungensis*, u dębów w różnym wieku mógł wynikać z faktu, że badane drzewa, reprezentujące badane 3 fazy rozwojowe rosły obok siebie na jednej powierzchni. W takim układzie pewne jest, że do kolonizacji najmłodszych drzew dochodziło za pośrednictwem tzw. wspólnej sieci mikoryzowej (CMN = common mycorrhizal network) i stąd zapewne korzenie siewek kolonizowane były przez sieć grzybni ekstramatrykalnej rozprzestrzeniającej się również pomiędzy dojrzałymi drzewami. Dowiedziono bowiem, że w przypadku wspólnego występowania drzew w różnym wieku, grzybnia ekstramatrykalna rozprzestrzeniająca się od korzeni drzew dojrzałych jest źródłem kolonizacji siewek rosnących w pobliżu (Kranabetter i Wylie 1998; Durall i wsp. 1999; Cline i wsp. 2005; Taste i wsp. 2009). Ponadto Wang i wsp. (2012) nie ustosunkowali się w swojej pracy do zjawiska autokorelacji pomiędzy badanymi próbkami, której wystąpienie jest bardzo prawdopodobne przy zastosowanym układzie doświadczalnym.

W badaniach dąbrów krotoszyńskich analiza ANOSIM pokazała iż wraz z wiekiem drzewostanu kompozycja gatunkowa zbiorowisk GEM ulega istotnym zmianom. Wykres NMDS pokazuje, że najbardziej widoczne są różnice pomiędzy uprawami, a pozostałymi fazami rozwojowymi. Rycina 8 przedstawia dwie grupy punktów, które reprezentują uprawy oraz pozostałe fazy drzew. Ten wyraźny podział wskazuje, iż zasadnicza zmiana struktury i kompozycji gatunkowej zbiorowisk GEM następuje po fazie rozwojowej uprawy, w momencie zwierania się koron drzew. Do tego momentu najważniejszym komponentem zbiorowiska jest grupa grzybów, często identyfikowana w szkółkach leśnych na dębach (Leski i wsp. 2010) oraz blisko spokrewnionym buku (Pietras i wsp. 2012). W grupie tej wyszczególnić można taksony takie jak: *Hebeloma sacchariolens*, *Laccaria tortilis*, *Tuber* sp., *Rhizoscyphus* sp., *Naucoria salicis*, *Telephora terrestris*, *Scleroderma verrucosum*, *Hydnotrya tulasnei*. Większość z ww. taksonów rozprzestrzenia się przez łatwo rozsiewające się zarodniki, co ułatwione jest na otwartych przestrzeniach upraw. Analogiczna sytuacja ma miejsce na kwaterach szkółek leśnych. Dowodzi to, że na korzeniach sadzonek wysadzonych na uprawach utrzymują się grzyby mikoryzowe, które w naturalny sposób skolonizowały

korzenie w czasie wzrostu sadzonek w szkółkach leśnych. Począwszy od fazy młodnika do grupy taksonów GEM „wyniesionych” ze szkółki leśnej (*H. sacchariolenis*, *L. tortilis*, *Tuber* sp., *N. salicis*, *S. verrucosum*, *H. tulasnei*.) oraz tych o charakterze kosmopolitycznym (*Cenococcum*, kompleks *Rhizoscyphus ericae*), dołączają stopniowo gatunki z rodziny *Russulaceae*, *Thelephoraceae*, *Cortinariaceae*, *Boletaceae* (młodnik, tyczkowina, drzewostan dojrzały) oraz *Amanitaceae* (drzewostan dojrzały). Wyjątkiem są tu taksony takie jak: *Tomentella botryoides*, *Russula velenovskyi* zidentyfikowane również w uprawach, oraz *Amanita muscaria*, takson odnotowany w młodniku. Jednak wszystkie ww. taksony występowały z reguły nielicznie, co nie pozwala jednoznacznie przypisać ich do którejś z faz rozwojowych. Analizując bogactwo gatunkowe rodzin grzybów można zauważyć zwiększającą się z wiekiem drzew liczbę gatunków *Russulaceae*, *Thelephoraceae*, *Cortinariaceae*, *Boletaceae* oraz *Amanitaceae* (Tabela 7). Występowanie przedstawicieli ww. rodzin jest wyraźnie związane z dojrzałymi drzewostanami (Visser 1995; Taylor i Bruns 1999; Peter i wsp. 2001a). Kryterium to należy jednak rozpatrywać z dużą dozą ostrożności, bowiem zdarza się, że grzyby późnego stadium sukcesji występują także w młodszych drzewostanach (w rozprawie opisanych, jako uprawy i młodniki). Brak klarownego powiązania większości gatunków GEM z określoną grupą wiekową zarysowuje się też w przytaczanych już pracach Gebhardta i wsp. (2007) oraz Wanga i wsp. (2012). Dowodzi to, że zbiorowiska GEM dębów wraz z wiekiem ulegają istotnym zmianom jakościowym, ale niemożliwe jest określenie, czy dochodzi w nich do typowego zjawiska chronosekwencji.

W układzie chronosekwencji drzewostanów dębowych rosnących na obszarze Płyty Krotoszyńskiej widoczne jest wyraźne zwiększanie się wraz z wiekiem ilości taksonów z rodzaju *Russula*. Grzyby te występowały również w 130 letnich zamierających drzewostanach badanych w Części III niniejszej rozprawy. W najmłodszej fazie rozwojowej (uprawy) zidentyfikowany został tylko jeden takson, *Russula graveolens*. Mniejsza zdolność do kolonizacji młodych drzew przez grzyby z rodziny *Russulaceae* wynika z niskiej przeżywalności zarodników produkowanych przez przedstawicieli tej rodziny (Miller i wsp. 1994) oraz ograniczonej zdolności do kolonizacji korzeni młodych siewek poprzez zarodniki (Fox 1983). Kielkowanie zarodników *Russulaceae* zachodzi natychmiast po ich uwolnieniu i dodatkowo wymaga obecności wydzielin korzeniowych starszych drzew (Hutchison 1999), których brak jest na uprawach a warunki edaficzne zbliżone są do warunków szkółkowych. Występowanie tylko jednego taksonu *Russula* w fazie rozwojowej uprawy potwierdza wnioski wysunięte w pierwszej części niniejszej rozprawy, że korzenie siewek (sadzonek) rosnących z dala od dojrzałych drzew kolonizowane są głównie przez zarodniki. Preferencje

grzybów z rodziny *Russulaceae*, w tym z rodzaju *Russula* do liczniejszego występowania w starszych drzewostanach obserwowano w badaniach opisujących zbiorowiska GEM *Pinus banksiana* w różnym wieku po pożarze (Visser 1995), *Picea sitchensis* w różnym wieku po sztucznych nasadzeniach (Palfner i wsp. 2005) oraz w badaniach chronosekwencji drzewostanów *Pinus sylvestris* (Iwański 2007). Częste występowanie taksonów z rodzaju *Russula* w dojrzałych drzewostanach wskazywać może na dużą konkurencyjność tych grzybów w porównaniu z innymi (Horton i Bruns 2001), jak również preferencję rodziny *Russulaceae* do występowania w glebie z wysokim udziałem materii organicznej (Deacon i Fleming 1992; Agerer 2001). Całkowite zasoby węgla w glebie zwiększają się wraz z wiekiem drzewostanów, o czym mogą świadczyć wyniki prezentowane dla ponad 100 letnich lasów *Q. alinea* (Luan i wsp. 2011). Wzrastająca z wiekiem drzewostanu akumulacja organicznych związków węgla może tłumaczyć zwiększające się bogactwo gatunkowe grzybów z rodzaju *Russula* w badaniach chronosekwencji drzewostanu.

5.3. Zbiorowiska grzybów mikoryzowych w zamierających dąbrowach na Płycie Krotoszyńskiej

W literaturze opisującej fizjologiczne aspekty funkcjonowania mikoryz znaleźć można umowny podział GEM na gatunki o mniejszych i większych wymaganiach względem węglowodanów przekazywanych do mikoryz przez partnera roślinnego (Rosling i wsp. 2004, Bever i wsp. 2009). Dlatego też można się spodziewać, że wraz z ograniczeniem przekazywania związków węgla z koron do korzeni drzew, wywołanym sztuczną defoliacją (Cullings i wsp. 2001), żerowaniem owadów foliofagicznych (Brown i wsp. 2001, Gehring i Whitham 2002), zanieczyszczeniami powietrza (Peter i wsp. 2008), czy „obrączkowaniem” drzew (Druebert i wsp. 2009), skład gatunkowy zbiorowiska GEM powinien się zmieniać w kierunku dominacji taksonów o mniejszych wymaganiach w stosunku do węglowodanów pochodzących od partnera roślinnego. Hipoteza postawiona w odniesieniu do części badań prowadzonych w zamierających drzewostanach Płyty Krotoszyńskiej zakładała, że czynnikiem determinującym zmiany w zbiorowisku GEM będzie stopień redukcji aparatu asymilacyjnego. Analizowane powierzchnie badawcze charakteryzowały się podobnymi cechami drzewostanu (szczególnie wiekiem, zadrzewieniem, składem gatunkowym w miejscu pobierania prób, pokrywą, warunkami edaficznymi (Patrz Materiał i Metody), natomiast różniły się stanem zdrowotnym. Różnice w zdrowotności były widoczne zarówno na poziomie pojedynczych drzew, jak również na poziomie analizowanych powierzchni badawczych. W związku z tym zmiany zachodzące w zbiorowisku GEM pod wpływem

redukcji aparatu asymilacyjnego należy rozpatrywać w dwóch aspektach: na poziomie indywidualnych drzew, oraz na poziomie badanych drzewostanów.

Biorąc pod uwagę indywidualne drzewa, zauważyć można jedynie nieistotną statystycznie tendencję do zmniejszania średniego bogactwa gatunkowego wraz ze wzrostem stopnia defoliacji. Podobną zależność ujawnili Pestaña i Santolamazza-Carbone (2011) w badaniach nad zmianami w zbiorowisku GEM pięcioletnich drzew *P. pinaster*, dla których zredukowano powierzchnię ulistnienia o 25 i 75%. W przypadku przytoczonych wyżej badań zależność między bogactwem gatunkowym i współczynnikiem różnorodności biologicznej, a stopniem defoliacji była również widoczna, choć nieistotna statystycznie. Wraz ze wzrostem defoliacji zmniejszeniu ulegała ilość morfotypów wytwarzających znaczne ilości grzybni, takich jak: *Suillus* i *Tomentellopsis*. W zamierających dąbrowach można zauważyć, że taksony wytwarzające obfitą grzybnię ekstramatrykalna (*Cortinarius* spp., *P. involutus*, *Elaphomyces* sp. *Tomentella* spp.) oraz te uważane za bardziej energochłonne względem cukrów przekazywanych przez partnera roślinnego (grzyby z rodzaju *Russula*) nie były odnotowywane na korzeniach drzew o defoliacji powyżej 80%. Utrzymywały się natomiast taksony takie jak *Xerocomus subtomentosus* czy *L. quietus*, które wykazują pewne zdolności saprotroficzne, przejawiające się zdolnością do czerpania związków węgla z materii organicznej (Hutchinson 1991). Co więcej, udział *L. quietus* wzrastał wraz ze stopniem defoliacji, osiągając ponad 50% obfitości w najwyższych klasach defoliacji. *L. quietus* jest partnerem mikoryzowym specyficznym dla rodzaju *Quercus*. Mikoryzy tego taksonu znajdowane są często w lasach dębowych Europy (Courty i wsp. 2007). Jak dotychczas wysoki udział mikoryz *L. quietus* w całkowitej puli mikoryz wiązany był z wysoką zawartością materii organicznej w glebie (Suz 2013). Wyższa obfitość występowania mikoryz tworzonych przez *L. quietus* w drzewostanie bardziej dotkniętym zamieraniem może być efektem realizacji przez ten takson tak zwanego „Planu B” (Talbot i wsp. 2008). Plan ten zakłada, że niektóre grzyby mikoryzowe mogą brać udział w dekompozycji m.in. złożonych, organicznych form węgla znajdujących się w podłożu i w ten sposób uzupełniają swoje zapotrzebowanie na przyswajalne formy węgla. Aktywność pewnych enzymów (glukouronidazy, cellobiohydrolazy, β – glukozydazy, laktazy), wykazana dla mikoryz tworzonych przez *L. quietus* wskazuje jednoznacznie, że grzyb ten jest zdolny pozyskiwać związki węgla nie tylko od partnera roślinnego, ale również z martwej materii organicznej poprzez rozkład ligniny i depolimeryzację celulozy i hemicelulozy (Courty i wsp. 2007). Wyższy udział grzyba *L. quietus* na korzeniach drzew o częściowo zredukowanym aparacie asymilacyjnym można tłumaczyć tym, że występowanie mikoryz *L. quietus* nie jest zależne

całkowicie od węglowodanów przekazywanych z koron do korzeni. W przypadku ograniczenia dopływu asymilatów, grzyb ten czerpie związki węgla z materii organicznej. Z drugiej strony niewystarczająca ilość cukrów w korzeniach powoduje zubożenie składu gatunkowego GEM, co stwarza możliwość kolonizacji korzeni drobnych o bardzo dużym ubytku aparatu asymilacyjnego i dominacji grzyba *L. quietus* w zbiorowisku. **Zwiększająca się wraz ze stopniem defoliacji obfitość występowania *L. quietus* jest jedną z bardziej interesujących obserwacji wynikająca z przeprowadzonych badań.** Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie, pokazujące zwiększający się wraz ze stopniem defoliacji udział grzyba *L. quietus* w puli mikoryz jak również dane na temat aktywności enzymatycznej tego grzyba (Courty i wsp. 2007) pokazują, że nie każdy partner grzybowy jest w pełni uzależniony od związków węgla przekazywanych przez partnera roślinnego. Wiele gatunków grzybów, w tym również *L. quietus* jest w stanie aktywnie pozyskiwać związki węgla z materii organicznej, co częściowo uniezależnia obfitość występowania *L. quietus* od ilości węglowodanów w korzeniach, na których zawiązuje mikoryzy.

Jakościowe i ilościowe różnice pomiędzy zbiorowiskami GEM widoczne były na poziomie analizowanych powierzchni badawczych. Drzewostany w najlepszej kondycji cechowały się wysokim całkowitym i średnim bogactwem gatunkowym, w przeciwieństwie do drzewostanu najbardziej dotkniętego zjawiskiem zamierania, gdzie wskaźniki te były najniższe. Drzewa rosnące na jednej powierzchni badawczej połączone są siecią grzybni ekstrapatrykalnej, która pośredniczy w wymianie asymilatów oraz wody (Treseder 2004, Southworth i wsp. 2005) pomiędzy drzewami będącymi w różnym stanie zdrowotnym. Możliwość wspomagania drzew o znacznej defoliacji przez drzewa o pełnym ulistnieniu przedstawiona została przez Taylor'a i wsp. (2013). W eksperymencie opisującym wpływ zgryzania przez zwierzynę na zbiorowiska GEM brzozy, nie wykazano różnic w zbiorowiskach GEM pomiędzy poszczególnymi wariantami defoliacji. Świadczy to o tym, że drzewa o różnym stopniu defoliacji rosnące obok siebie (na jednej powierzchni badawczej) wspomagają się poprzez wspólną sieć mikoryzową, co pozwala utrzymać większą liczbę symbiontów mikoryzowych osobnikom ze znacznym ubytkiem aparatu asymilacyjnego. Dowodem na istotny wpływ wspólnej sieci mikoryzowej na kształtowanie się zbiorowisk GEM może być też utrzymywanie się mikoryz na korzeniach martwych drzew, (co odnotowane było w prezentowanych badaniach) oraz na korzeniach pniaków pozostawionych po wycięciu drzew (Mosca i wsp. 2007a). Obserwacje Hagerman'a i wsp. (1999) pokazują, że dzięki istnieniu wspólnej sieci grzybni ekstrapatrykalnej mikoryzy mogą utrzymywać się na korzeniach martwych drzew nawet do 3 lat od ich zamarcia. Dowodzi to istotnej roli jaką

pełni wspólna sieć mikoryzowa w kształtowaniu się zbiorowisk GEM na różnych etapach zamierania lasów. Dla dokładniejszego wyjaśnienia tego zjawiska konieczne są jednak dalsze badania.

Analiza ANOSIM przeprowadzona w oparciu o stopień defoliacji drzew ujawnia różnice w strukturze zbiorowisk GEM pomiędzy dwiema grupami drzew: o defoliacji od 20 do 70% oraz powyżej 70%. Może to sugerować, że zmniejszanie różnorodności zbiorowiska GEM pojedynczych drzew następuje przy redukcji aparatu asymilacyjnego powyżej 70%. Wy tłumaczeniem dla tego zjawiska mogą być wyniki badań Renuad i Mauffette (1991) którzy stwierdzili, że ponad 70 %-owy poziom defoliacji powoduje redukcje ilości węglowodanów w korzeniach, co skutkuje ograniczeniem ilości GEM mogących utrzymać się na korzeniach i/lub zmianami zbiorowiska GEM w kierunku dominacji taksonów o małych wymaganiach względem źródła węgla. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie są zbieżne z badaniami Monteneccchio i wsp. (2004), którzy analizowali morfotypy mikoryzowe zamierających drzewostanów *Q. ilex* w północnych Włoszech. W badaniach tych wyróżniono 3 klasy defoliacji (<30%, 30 – 70%, > 70%). Podobnie jak w niniejszej rozprawie różnicowanie zbiorowiska GEM następowało również przy 70% - owym stopniu defoliacji (Rycina 11A). Na podstawie przedstawionych przykładów przypuszczać można, że w przypadku drzew o stopniu defoliacji powyżej 70% wspomniane wyżej wspomaganie drzew osłabionych przez wspólną sieć mikoryzową ma już mniejsze znaczenie. W badaniach Mosca i wsp. (2007b) nad zjawiskiem zamierania dębu szypułkowego we Włoszech, wyodrębnione zostały dwie klasy zamierania: pierwsza z widocznymi łagodnymi symptomami zamierania oraz druga, w której symptomy zamierania były wyraźniejsze (większy stopień uszkodzenia pnia, prześwietlenia koron i przebarwień liści, obecność owocników *Armillaria* spp.). Chociaż Mosca i wsp. (2007 b) nie określili w swoich badaniach procentowego stopnia defoliacji, uzyskane przez nich wyniki są zbliżone do prezentowanych w niniejszej rozprawie, o czym świadczą dwie grupy punktów reprezentujących przyjęte klasy zamierania na diagramie (Rycina 11B). Brak różnic w zbiorowiskach GEM pomiędzy wyliczonymi klasami witalności może wynikać z faktu, że jest to wskaźnik syntetyczny, na który wpływa więcej niż jedna cecha drzewa.

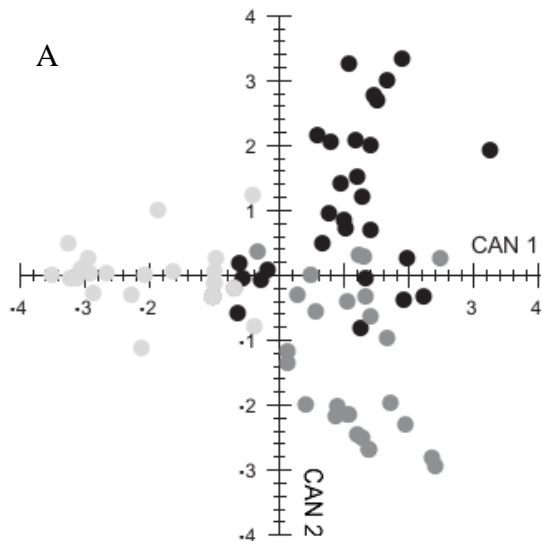


Figure 2. Canonical discriminant analysis of the 17 morphotypes identified by an asterisk in Tab. 2 and Mahalanobis squared distances ($P < 0.0001$). Black, grey and white dots indicate class 1, 2 and 3, respectively.

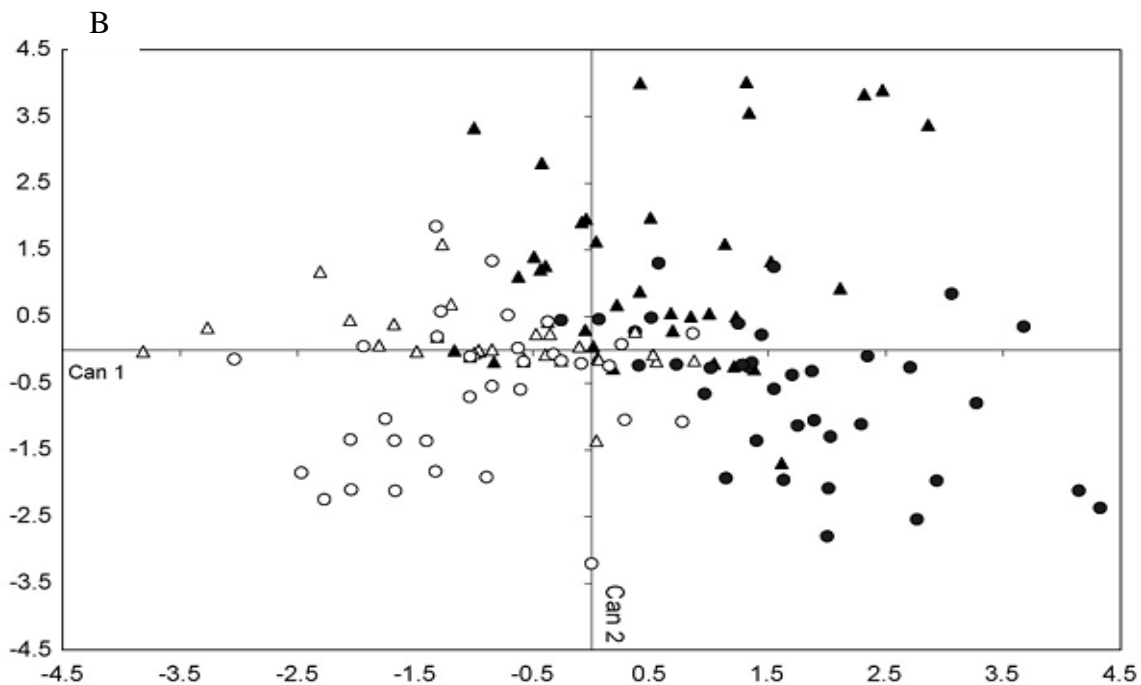


Fig. 3. Distribution of the samples along canonical variables 1 and 2 (a) and relative abundance of the anatomotypes which are statistically discriminating among treatments (see Table 6) in January 2006 (b). Black triangle: untreated trees of decline class 0 (0 NT); white triangle: competition-free trees of decline class 0 (0 T); black circle: untreated trees of decline class 1 (1 NT); white circle: competition-free trees of decline class 1 (1 T).

Rycina 11. Przedruk z prac: A- Montenechchio i wsp (2004) oraz B - Mosca i wsp. (2007a) prezentujące różnice w zbiorowiskach mikoryzowych dębów w różnym stopniu defoliacji (A) oraz w różnym stopniu uszkodzeń (B)

Wartości średniego bogactwa gatunkowego oraz współczynników różnorodności i dominacji gatunkowej zbiorowiska GEM w zamierających dąbrowach różniły się pomiędzy analizowanymi drzewostanami. Wartość współczynnika różnorodności gatunkowej zmniejszała się wraz ze zmniejszającą się zdrowotnością drzewostanów. Podobny wynik, otrzymała Mosca i wsp. (2007a) w badaniach zamierających drzewostanów dębowych we Włoszech oraz Peter i wsp. (2001b) w badaniach świerczyn w Czechach. Zmiany ilościowe i

jakościowe zachodzące w zbiorowiskach GEM, których wyrazem są odnotowane różnice pomiędzy współczynnikami ekologicznymi analizowanych drzewostanów, jak również pojedynczych drzew, dowodzą jednoznacznie, że struktura zbiorowisk GEM jest determinowana przez kondycję partnera roślinnego. Inaczej mówiąc zmiany w zbiorowisku GEM są skutkiem, a nie przyczyną pogarszającego się stanu zdrowotnego drzew/drzewostanów.

5.4. Dyskusja ogólna

5.4.1. Bogactwo gatunkowe zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych u badanych dębów

Prezentowane badania pozwoliły na zidentyfikowanie 97 taksonów GEM, które wchodziły w związek mikoryzowy z dębami. Jak dotąd przedstawiane w literaturze bogactwo gatunkowe GEM u dębów, szacowane w oparciu o obserwacje występowania owocników, wynosiło od 38 do 100 taksonów (Garbaye 1986; Łuszczynski 1998; Kovasc i wsp. 2000, Trocha i wsp. 2012, Pestova i wsp. 2013). Lista prawdopodobnych symbiontów dębów prezentowana przez Trappe'ego (1962) w oparciu o występowanie owocników zawierała 124 gatunki GEM. Wyniki niniejszej rozprawy w dużej mierze pokrywają się z wynikami obserwacji owocników, szczególnie w przypadku gatunków grzybów pospolicie występujących w lasach dębowych. **Niniejsza praca dodała natomiast do listy symbiontów mikoryzowych dębów kilkanaście nowych taksonów, głównie z rodziny *Thelephoraceae*, których występowanie jak dotąd nie łączone było z dębami.** Badania przeprowadzone w oparciu o identyfikację morfologiczną i/lub molekularną mikoryz na różnych gatunkach dębów ukazują podobne do uzyskanych w niniejszej rozprawie wyniki na temat zróżnicowania gatunkowego GEM. Całkowite bogactwo gatunkowe GEM, opisane dla różnych gatunków dębów wynosiło od 11 do 140 taksonów (Tabela 17). Prace przytoczone w Tabeli 17 pokazują, że wraz ze wzrostem zaawansowania metody badawczej, zwiększa się liczba symbiontów mikoryzowych, obserwowanych na dębach. Bogactwo gatunkowe GEM przedstawione w tej rozprawie jest porównywalne z innymi badaniami opierającymi się na analogicznej metodzie, tj. izolacji DNA z pojedynczego wierzchołka mikoryzowego, a następnie amplifikacji i sekwencjonowaniu regionu ITS. Zupełnie nowe światło na zbiorowiska grzybów mikoryzowych rzucają badania oparte o „454” pirosekwencjonowanie. Ta metoda pozwala na identyfikację molekularną grzybów z prób środowiskowych (gleby) oraz korzeniowych bez konieczności klonowania DNA. Najnowsze badania przeprowadzone na 6 gatunkach dębów północnoamerykańskich z wykorzystaniem metody

pirosekwencjonowania dowodzą, iż bogactwo gatunkowe GEM może być kilkakrotnie wyższe niż stwierdzano wcześniej, opierając się na klasycznej metodzie identyfikacji molekularnej, wykorzystującej amplifikację DNA pochodzącego z jednego wierzchołka mikoryzowego (Jumpponen i Jones 2009, 2010a). W czasie prowadzenia badań zbiorowisk GEM Płyty Krotoszyńskiej, pojawiła się możliwość weryfikacji uzyskanych wyników przy użyciu metody „454” pirosekwencjonowania. Analizy takie zostały przeprowadzone we wrześniu 2012 roku w Laboratorium kierowanym przez prof. Urmasa Kõljälga na Uniwersytecie w Tartu, dla zamierających dąbrów badanych w Części III prezentowanej rozprawy i miały na celu potwierdzenie zależności pomiędzy stopniem uszkodzenia drzewostanów, a zmianami w zbiorowisku GEM. Niestety ze względu na długi czas oczekiwania na wyniki pirosekwencjonowania, które są wykonywane jako usługa zewnętrzna (Bachman Culture Genomics UK), dane te nie mogły zostać uwzględnione w niniejszej rozprawie. Niezwykle ważnym walorem badań opartych na „454” pirosekwencjonowania jest fakt, że pozwalają one na identyfikację ok. 99% taksonów grzybów, należących do linii genetycznych znanych obecnie na świecie (Tedersoo, informacja ustna). Poprzez wykorzystanie wysoce specyficznych starterów możliwa jest więc również identyfikacja szeregu taksonów grzybów z innych grup troficznych (patogenicznych i saprobiotycznych). Szczególnie ciekawe mogą być relacje ilościowe pomiędzy bogactwem GEM, a organizmami patogenicznymi porażającymi korzenie dębów, w tym lęgniowcami z rodzaju *Phytium* i *Phytophthora*, które odgrywają istotną rolę z procesie zamierania dębów. Znalezienie powiązań między grupami grzybów o innym sposobie pozyskiwania związków węgla może odegrać kluczową rolę w zrozumieniu procesu zamierania lasów.

Wartości średniego bogactwa gatunkowego wynosiły w prezentowanych badaniach od 1 do 4,5 taksonu w eksperymencie szkółkowym (Tabela 17); 4,3 - 5,2 w badaniach chronosekwencyjnych (Tabela 8) oraz 3,27 - 6,20 w zamierających drzewostanach dębowych (Tabela 11). Wartość tego współczynnika pozwala w sposób wiarygodny porównywać wyniki uzyskane w różnych badaniach. Niestety w większości prac skupiających się na badaniach GEM u dębów, współczynnik ten nie jest podawany (Tabela 17). Dodatkowo należy zwrócić uwagę na fakt, iż ze względu na zastosowanie różnorodnego sposobu pobierania prób i odmiennych układów doświadczalnych w różnych badaniach, porównywanie wyników jest znacznie utrudnione. Dla porównywania wyników szczególne znaczenie może mieć przede wszystkim wielkość próby, która determinuje ilość korzeni drobnych w próbce, a tym samym może wpływać na określane bogactwo gatunkowe. Badania zbiorowiska GEM *Q. ilex* przeprowadzone na pożarzystku określają wartość średniego bogactwa gatunkowego w

przedziale od 5,2 do 7,2 (de Román i de Miguel 2005). Inne badania, porównujące zbiorowiska GEM zimozielonego gatunku (*Q. wizilezeni*) z gatunkiem zrzucającym liście na zimę (*Q. douglasii*), podają podobne do prezentowanych w Tabeli 17 wartości średniego bogactwa gatunkowego (6,5 gat./próbę) (Moser i wsp. 2007).

Tabela 17. Zestawienie wyników opisujących zbiorowiska grzybów mikoryzowych dębów uzyskanych w oparciu o metody molekularne

Gatunek dębu	Referencje	Bogactwo gatunkowe		Ilość pobrań	Całkowita ilość prób	Materiał	Metoda
		Całkowite	Średnie				
<i>Q. garryana</i>	Valentine i wsp. 2004	39	b.d.	2	179	S, D	PCR-RFLP
<i>Q. garryana</i>	Walker i wsp. 2005, 2008	75	3,21	2	164	S	PCR-sekw.
<i>Q. rubra</i>	Gebhardt i wsp. 2007	51	b.d.	6	160	S M T	PCR-sekw
<i>Q. robur</i>	Mosca i wsp. 2007	64	b.d.	13	13 x 16	D	PCR-sekw
<i>Q. wizilezeni</i>	Moser o wsp.2007	140	6,50	1	128	D	PCR-sekw
<i>Q. douglasii</i>							
<i>Q. petraea</i>	Country i wsp. 2008	75	b.d.	2	180	D	PCR-sekw
<i>Q. crassifolia</i>	Morris i wsp 2009	140	b.d.	1	64	T	PCR-sekw
<i>Q. garryana</i>	Southworth w wsp 2009	22	b.d.	1	40	S	PCR-sekw.
<i>Q. garryana</i>	Frank i wsp 2009	11	b.d.	?	100	S	PCR-sekw.
<i>Q. garryana</i>	Moser i wsp. 2009	33	b.d.	1	24	M	PCR-sekw.
<i>Quercus</i> spp.	Jumponen i wsp. 2010	150*	b.d.	3	192	D	“454”
<i>Q. macrocarpa</i>	Jumponen i Jones 2010a	1232*	b.d.	1	12	D	“454”
<i>Q. macrocarpa</i>	Jumponen i Jones 2010b	689*	b.d.	1	12	D	“454”
<i>Q. rubra</i>	Karpati i wsp. 2011	39	3,25	1	15	S	PCR-sekw.
<i>Q. robur</i>		22	5,82				
<i>Q. petraea</i>	Leski i wsp. 2010	20	5,36	1	25	S	PCR-sekw.
<i>Q. liaotungensis</i>	Wang i wsp. 2012	66	5,4	2	2 x 20	S,M,D	PCRsekw.
<i>Q. robur</i>		16	b.d.		27		
<i>Q. rubra</i>	Trocha i wsp. 2012	10	b.d.	3	27	M	PCR-sekw
Wyniki uzyskane w doktoracie							
<i>Q. robur</i>	Część I, doświadczenie szkółkowe	10	4,50	11	33	S	PCR-sekw.
<i>Q. robur</i>	Część II, badania chronosekwencji	75	4,20-5,50	1	120	S, M, T, D	PCR-sekw.
<i>Q. robur</i>	Część III, badania zamierających dąbrów	39	3,27-6,20	9	45	D	PCR-sekw.

* bogactwo gatunkowe podawane w jako ilość OTUs („operational taxonomic units”)

Badania przeprowadzone w układzie chronosekwencji na *Q. liaotungensis* (Wang i wsp. 2012) wykazały nieco niższą wartość średniego bogactwa gatunkowego (5,6). Niższe wartości wykazują również wyniki badań przeprowadzonych na 2 letnich sadzonkach dwóch północnoamerykańskich dębów (*Q. rubra* i *Q. prinus*), dla których wykazano ok. 3 gat./próbę (Walker i wsp. 2005; 2008). Natomiast dla dwuletnich sadzonek dębu szypułkowego i bezszypułkowego w warunkach szkółki leśnej średnie bogactwo gatunkowe wynosiło odpowiednio 5,82 i 5,36 (Leski i wsp. 2010). W kontekście zaprezentowanych danych literaturowych można stwierdzić, że zbiorowiska GEM dąbrów Płyty Krotoszyńskiej z wartościami średniego bogactwa gatunkowego dochodzącymi do 6,2, charakteryzują się dużą

różnorodnością GEM. Potwierdzają to także wartości współczynników ekologicznych. Wartość współczynnika różnorodności biologicznej Shannon'a była wysoka i mieściła się w przedziale od 0,94 do 1,08. Współczynnik dominacji gatunkowej Simpson'a był niski i wynosił od 0,45 do 0,54. Wyjątek stanowił tu drzewostan o największym stopniu uszkodzeń, gdzie wartości ww. współczynników odbiegały od pozostałych powierzchni badawczych i wynosiły odpowiednio 0,75 i 0,59.

W ostatnim czasie wykorzystanie współczynników Shannon'a oraz Simpson'a w badaniach zbiorowisk GEM bywa kwestionowane, co potwierdzają Tedersoo i Bahram (2013, informacja słowna). Uważa się, że w badaniach ekologicznych oba współczynniki mogą być zastosowane tylko i wyłącznie w przypadku prób, które reprezentują jednego, szeroko rozumianego osobnika. W przypadku metodyki przyjętej w rozprawie za „osobnika” można uznać pojedyncze drzewo, spod którego pobierane były próby lub całą siewkę/sadzonkę, co w opinii autora przesądza, że zastosowanie ww. współczynników było prawidłowe.

5.4.2. Skuteczność wykorzystania metod molekularnych

Spośród wydzielonych 160 morfotypów, 19 pozostało niezidentyfikowanych, ale ze względu na unikalne cechy morfologiczne zostały one zakwalifikowane jako oddzielne taksony. Początkowo niski poziom identyfikacji GEM wymusił szukanie nowego podejścia metodologicznego, czego wynikiem było wykorzystanie specjalistycznych zestawów do izolacji DNA (patrz Materiał i Metody) oraz zastosowanie szerszej gamy starterów (Tabela 3). Warto dodać, że większość (12 z 19) z nieoznaczonych morfotypów została znaleziona w najstarszych analizowanych drzewostanach (130 – 140 letnie zamierające dąbrowy w Części III oraz ok. 120 letnie dojrzałe drzewostany w Części II). Natomiast stu procentowy poziom izolacji i amplifikacji DNA był charakterystyczny dla analiz siewek pochodzących ze szkółki leśnej oraz sadzonek pozyskanych w najmłodszej fazie rozwojowej (uprawy). Przyczyną niskiego stopnia identyfikacji w najstarszych analizowanych drzewostanach może być wzrastająca wraz z wiekiem ilość garbników, tanin i polifenoli w korzeniach. Niekorzystne działanie tych związków na proces amplifikacji DNA opisywane było przez Gerbhardt i wsp. (2007). Dodatkowo większość z nieoznaczonych morfotypów występowała w bardzo niskiej obfitości (niższej niż 0,01%), co w praktyce oznaczało bardzo małą ilość materiału (wierzchołków mikoryzowych) do analiz molekularnych. Najlepszym przykładem mogą być tu nieoznaczone morfotypy NM *Boletaceae* i NM *Thelephoraceae* 4, dla których znaleziono jedynie po 1 wierzchołku mikoryzowym.

Istotnym problemem przy stosowaniu badaniach zbiorowisk GEM metod molekularnych jest brak sekwencji referencyjnych w bazach danych. Przykładem mogą być tu przedstawiciele rodziny *Thelephoraceae*. Grzyby z rodzaju *Tomentella*, *Tomentelopsis* oraz *Pseudotomentella* identyfikowane były w każdej z trzech części badań. Ta grupa grzybów reprezentowana była przez największą liczbę taksonów (17). Spośród nich prawie blisko połowę stanowią taksony, dla których identyfikacja do poziomu gatunku była niemożliwa. Trudności w pełnej identyfikacji taksonów z rodziny *Thelephoraceae* występowały także w innych badaniach opartych na metodach molekularnej identyfikacji mikoryz u różnych gatunków dębów (Walker i wsp. 2005, 2008; Mosca i wsp. 2007a; Gebhardt i wsp. 2007; Morris i wsp. 2008; Southworth i wsp. 2009; Karpati i wsp. 2011; Wang i wsp. 2012).

Wykorzystanie 97 %-owego poziomu identyczności zastosowanego w analizach filogenetycznych pozwoliło na rozróżnienie taksonów należących do rodziny *Thelephoraceae*. Współczesne badania wskazują, że linia genetyczna zawierająca grzyby z rodziny *Thelephoraceae* (z ang. thelephoroid fungi) charakteryzuje się bardzo wysokim bogactwem gatunkowym i stanowi istotny komponent środowiska glebowego ekosystemów leśnych półkuli północnej (Tedersoo i wsp. 2010). Trudności w interpretacji wyników molekularnych nasycały także taksony z grupy *Hymenoscyphus ericae* agregate oraz przedstawiciele rzędu *Pezizales*. Jednak ze względu na ograniczoną liczbę wiarygodnych sekwencji w bazach danych (uzyskanych z dobrze oznaczonych owocników), analizy filogenetyczne tych grup zostały pominięte w tej rozprawie.

5.4.3. Różnorodność GEM związanych z dąbrowami Płyty Krotoszyńskiej.

Zbiorowiska GEM opisane w każdej z trzech części niniejszej rozprawy charakteryzowały się typową strukturą obfitości występowania, w której 1-2 gatunki dominują w zbiorowisku, kolonizując większość korzeni drobnych partnera roślinnego, natomiast pozostałe gatunki GEM spotykane są sporadycznie, w niewielkiej obfitości, często nie przekraczającej 1%. Szeroka gama symbiontów mikoryzowych utrzymująca się w zbiorowisku w niskiej obfitości występowania opisana została w literaturze jako tzw. redundancja=nadmiarowość zbiorowiska GEM (ang. redundancy) (Allen i wsp. 1995, Rineau i Courty 2011). Przyjmuje się, że nadmiarowość ta zabezpiecza partnera roślinnego przed zmieniającymi się warunkami środowiska (Diaz i Cabido 2001, Elmqvist i wsp. 2003) oraz zapewnia skuteczne pozyskiwanie związków mineralnych niezbędnych dla prawidłowego wzrostu i rozwoju rośliny (Rineau i Courty 2011). Nadmiarowość jest również opisywana jako cecha zbiorowiska GEM, rozumianego jako całość i odgrywa kluczową rolę w

funkcjonowaniu całych ekosystemów (Courty i wsp. 2010). Zmieniające się warunki środowiska mogą indukować zmiany w ilościowej strukturze zbiorowiska GEM. W przypadku gatunków plastycznych ich dominacja może utrzymywać się pomimo zachodzących zmian. Taksony GEM mniej plastyczne względem zmieniających się warunków mogą ustępować, a ich miejsce mogą zajmować symbionty, którym sprzyjają warunki zaistniałe po zmianie. Przeobrażenia w strukturze zbiorowiska GEM mają różny charakter i wynikać mogą m.in. z sezonowości (zmieniających się pór roku), zmian klimatu, chemizmu gleby (Parrent i wsp. 2006, Courty i wsp. 2010, Rineau i Garbaye 2009). Dodatkowo funkcjonowanie symbiozy mikoryzowej uzależnione jest od fenologii i genotypu partnera roślinnego (Courty i wsp. 2007, 2011, Karliński i wsp. 2010). W niniejszej rozprawie nadmiarowość zbiorowiska GEM ujawniała się w wynikach każdej z prezentowanej części. Najbardziej widoczne zmiany w zbiorowisku GEM widoczne były w badaniach prowadzonych w szkółce leśnej, gdzie obfitość występowania poszczególnych taksonów zmieniała się bardzo dynamicznie, co skutkowało tym, że w krótkim czasie taksony wykazujące cechy nadmiarowości (niska obfitość występowania), były zdolne zdominować zbiorowisko GEM poprzez kolonizację nowo powstałych korzeni. Uwarunkowania zmian zachodzących w zbiorowisku GEM w szkółkach leśnych pozostają nieznane. Dynamika tych zmian indukowana mogła być przez partnera roślinnego (np. poprzez akumulację węglowodanów w korzeniach), partnera grzybowego (sezonowa aktywność enzymatyczna) lub też przez warunki pogodowe (temperatura i wilgotność gleby). Mnogość czynników mogących wpływać na zbiorowisko GEM wymusza konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań przeprowadzonych w układzie kontrolowanym, co pozwoli na pełniejsze opisanie funkcjonalnej roli, jaką pełnią poszczególne taksony w zbiorowisku GEM szkółki leśnej.

Spośród 97 taksonów GEM, zidentyfikowanych w niniejszej rozprawie, najczęstszym i najobficiej występującym był workowiec *C. geophilum*. W świetle ostatnich badań takson ten należy uznać *de facto* jako grupę blisko spokrewnionych gatunków (Bahram i wsp. 2011), których rozróżnienie nie jest możliwe przy użyciu standardowego porównania sekwencji ITS rDNA. Z tej właśnie przyczyny w całej rozprawie takson ten został potraktowany jako kompleks blisko spokrewnionych taksonów i traktowany jako kompleks *C. geophilum* (ang. *C. geophilum* aggregate). Kompleks *C. geophilum* charakteryzuje się międzykontynentalnym zasięgiem (Trappe 1962, LoBuglio i wsp. 1996, Tedersoo i wsp. 2010) i możliwością kolonizowania korzeni wielu gatunków drzew. Wcześniejsze badania wiążą obfite występowanie *C. geophilum* z wysoką odpornością i przeżywalnością mikoryz tego gatunku

w warunkach suszy (Pigott 1982, Coleman i wsp. 1989) lub innych warunkach stresowych (Panaccione i wsp. 2001). Dane literaturowe wskazują, że *C. geophilum* jest często dominującym komponentem w zbiorowiskach GEM różnych gatunków dębów (np. Valentine i wsp. 2004; Moser i wsp. 2008; Wang i wsp. 2012). Tak też było w badaniach przeprowadzonych w dąbrowach Płyty Krotoszyńskiej, gdzie kompleks *C. geophilum* bardzo często kolonizował ponad 50% korzeni drobnych. Wyjątek stanowiły najmłodsze stadia rozwojowe upraw (w Części II) oraz szkółka leśna (Część I), gdzie udział mikoryz z kompleksu *C. geophilum* nie przekraczał 2,5%. Niski udział mikoryz *C. geophilum* obserwowany był także w badaniach sadzonek dębu szypułkowego oraz bezszypułkowego (Leski i wsp. 2010) oraz buka zwyczajnego (Pietras i wsp. 2012), rosnących w warunkach szkółki leśnej. W badanych szkółkach powszechnie stosowane są systemy nawadniające, co zapobiega nawet krótkotrwałym okresom suszy. Stosowanie regularnego podlewania sadzonek w szkółkach może skutkować powstaniem optymalnych warunków kolonizacji innym gatunkom GEM, a tym samym ograniczeniem występowania mikoryz *C. geophilum*. Jednak niski udział mikoryz *C. geophilum* obserwowany był również w uprawach, gdzie warunki wilgotnościowe zbliżone były do tych jakie panowały w innych fazach rozwojowych drzewostanów dębowych. Dowodzi to, że obfitość występowania *C. geophilum* jest obok warunków wilgotnościowych regulowana innym, dotąd nierozpoznanym czynnikiem. Najnowsze badania na temat obfitości występowania mikoryz *C. geophilum* na korzeniach dębów wykazały, że obok wilgotności równie ważnym czynnikiem powodującym zwiększenie udziału *C. geophilum* jest temperatura (Herzog i wsp. 2012). Valentine i wsp (2004) przypuszczali, że obfite występowanie mikoryz *C. geophilum* może być efektem tworzenia rozbudowanej sieci grzybni ekstramatrykalnej przez tego grzyba. W szkółkach i uprawach może być ona niszczone przez zabiegi pielęgnacyjne, związane z przygotowaniem i pielęgnacją gleby, co może być jedną z przyczyn mało licznego występowania mikoryz *C. geophilum* na tych powierzchniach.

Liczną grupę zidentyfikowanych w tej pracy taksonów stanowiły grzyby z rodziny *Thelephoraceae*, w skład której zaliczane są 3 linie filogenetyczne: *Tomentella*, *Tomentellopsis* oraz *Pseudotomentella*. Łącznie zidentyfikowano 17 taksonów z tej rodziny (14 na podstawie analiz molekularnych, 3 na podstawie oceny morfologicznej). Przeprowadzona analiza filogenetyczna nie do końca pozwoliła rozróżnić zidentyfikowane taksony i tym samym nie rozwiązała wszystkich wątpliwości związanych z przynależnością taksonomiczną zidentyfikowanych taksonów. Niejasności dotyczą głównie kładów *T. punicea* oraz *T. sublilacina*/*T. albiomarginata*. W przyszłości konieczne jest przeprowadzenie analiz

filogenetycznych dla dłuższego fragmentu DNA, łączącego region ITS oraz LSU, co umożliwiając opracowane niedawno startery specyficzne dla rodzaju *Toментella* (Tedersoo i wsp. 2011). Ciekawą obserwacją jest umiejscowienie sekwencji *T. italica* w kladzie *Toментelopsis/Pseudotoментella*. Wynik ten wskazuje na konieczność przekwalifikowania taksonu *T. italica* do rodzaju *Pseudotoментella* (Ryc. 10), co potwierdzają również inne, niezależnie prowadzone badania (Tedersoo, informacja ustna). **Ważnym wynikiem tej części pracy jest stwierdzenie mikoryz *T. italica* na korzeniach dębów** (Ryc 10). Jest to pierwsze doniesienie o statusie mikoryzowym tego gatunku grzyba, którego owocniki można znaleźć na rozkładającym się drewnie drzew liściastych, i który jak dotąd podawany był jako grzyb saprobiotyczny. W prezentowanych badaniach udział poszczególnych taksonów z rodzaju *Toментella* w ogólnej liczbie mikoryz był bardzo niski. Podobne wyniki uzyskał Kõljalg (2000) w mieszanych lasach sosnowo – świerkowych w Szwecji, gdzie obfitość występowania 5 gatunków z rodziny *Thelephoraceae* wahała się w przedziale 0,2 – 4%. Dla grzybów z rodziny *Thelephoraceae* charakterystyczne jest tworzenie rozległej sieci sznurów grzybniovych oraz dużej ilości grzybni ekstramatrykalnej, co pozwala na przerastanie znacznej objętości gleby oraz tworzenie owocników resupinatowych (rozpostartych) na powierzchni różnych substratów, głównie martwego drewna. Być może rzadkie występowanie mikoryz tworzonych przez tą grupę grzybów może wynikać z preferencji jej przedstawicieli do saprobiotycznego sposobu odżywiania..

W publikacjach opisujących zbiorowiska GEM różnych gatunków dębów grzyby z rodziny *Thelephoraceae* reprezentowane są licznie (do kilkunastu gatunków), jednak zawsze większość taksonów zidentyfikowana jest tylko do poziomu rodzaju lub rodziny. Świadczy to o bardzo niskim stopniu poznania grupy grzybów przynależnych do rodziny *Thelephoraceae*. **W niniejszych badaniach zidentyfikowano 8 taksonów uważanych za rzadkie (*T. ellisii*, *T. stuposa*, *T. lapida*, *T. botryoides* oraz *T. punicea*), a nawet nie notowane dotychczas w Polsce (*T. castanea*, *T. lilacinogrisea*, *T. italica*)** (Wojewoda 2003). Słaby stopień poznania grzybów z rodziny *Thelephoraceae* w Polsce wynika z braku zainteresowania środowiska naukowego tą grupą grzybów oraz trudnościami w oznaczaniu owocników przy wykorzystaniu metod morfologicznych. Metody molekularne oraz badania mikoryz przyczyniają się do znacznego poszerzenia naszej wiedzy na temat niektórych grup grzybów.

W prezentowanych badaniach licznie występowały grzyby należące do rodziny *Russulaceae*. Spośród nich zidentyfikowano dziewięć taksonów należących do rodzaju *Russula* oraz trzy należące do rodzaju *Lactarius*. Najczęściej występującym gatunkiem był *L. quietus* (Rycina 1), odnajdywany w większości faz rozwojowych (z wyjątkiem upraw) oraz w

zamierających dąbrowach. Szczegóły dotyczące występowania *L. quietus* zawarte są w części dyskusji opisującej zależności między zbiorowiskiem GEM, a stanem zdrowotnym drzewostanów (5.3). *L. quietus* należy do najpospolitszych gatunków grzybów podstawkowych towarzyszących dębom. Jego owocniki występują gromadnie w lasach dębowych oraz lasach mieszanych z udziałem dębów (Trappe 1962; Urban 1998; Kivtsov i wsp. 2003). Znalazło to także swoje odzwierciedlenie w niniejszych badaniach, w których ponadto wykazano, że obfitość występowania mikoryz *L. quietus* zwiększała się wraz z wiekiem drzewostanów, co zapewne związane jest z akumulacją w glebie materii organicznej. Rosnąca wraz z wiekiem obfitość występowanie mikoryz *L. quietus* nie została natomiast stwierdzona w badaniach chronosekwencji, przeprowadzonych na dębie czerwonym (*Q. rubra*) w przedziale wieku od 5 do 46 lat w Niemczech, na terenach rekultywowanych po wydobywaniu węgla brunatnego (Gebhardt i wsp. 2007), gdzie grzyb ten występował tylko na korzeniach najstarszych drzew z bardzo niskim udziałem (0,9%). Odmienne od prezentowanych w niniejszej rozprawie wyniki dotyczące obfitości występowania *L. quietus* mogą mieć różne przyczyny, z których do najbardziej prawdopodobnych należy zaliczyć niski poziom związków organicznych, charakterystyczny dla powierzchni rekultywowanych po odkrywkowym sposobie wydobywania surowców mineralnych.

Najczęstszymi gatunkami odnotowanymi w dąbrowach krotoszyńskich reprezentującymi rodzaj *Russula* były *R. ochroleuca* oraz *R. fragilis*. Oba gatunki charakteryzowały się bardzo niską obfitością występowania, były jednak identyfikowane w większości stadiów rozwojowych prócz upraw. Wysoka frekwencja i niski udział występowania grzybów z rodzaju *Russula* w dąbrowach Płyty Krotoszyńskiej pozostaje w sprzeczności z przytaczanymi wyżej badaniami chronosekwencji dębu czerwonego (Gebhardt i wsp. 2007), gdzie gatunki z rodzaju *Russula* występowały ze znacznym, prawie 10% udziałem tylko w drzewostanie 33 – letnim. Autorzy sugerują preferencje *R. fragilis* do obfitszego występowania w glebach z dobrze wykształconym poziomem organicznym, co charakterystyczne jest dla drzewostanów dojrzałych. Pośrednio tłumaczyłoby to nieobecność tego taksonu na uprawach analizowanych na obszarze Płyty Krotoszyńskiej, gdzie po przeprowadzeniu mechanicznych zabiegów przygotowania gleby (wyoranie bruzd) sadzonki dębów sadzone są bezpośrednio do gleby mineralnej.

W prezentowanych badaniach rodzaj *Cortinarius* reprezentowany był przez 3 taksony: *C. sertipes*, *C. anomalus* oraz jeden takson nieopisany do gatunku *Cortinarius* sp. Grzyby z linii filogenetycznej „cortinarius” występują na całym świecie (Tedersoo i wsp. 2010), jednak za główny region ich występowania uważa się lasy borealne półkuli północnej. Poszczególne

gatunki z rodzaju *Cortinarius* wydają się mieć odmienne preferencje względem partnera roślinnego i warunków siedliskowych. *C. sertipes* spotykany był na korzeniach *Salix repens* zarówno na siedliskach kwaśnych jak i zasadowych. *Cortinarius anomalus* opisywany był jako symbiont mikoryzowy buka (Kjoller R., niepublikowane dane, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ889941.2>) W prezentowanych badaniach wszystkie zidentyfikowane taksony *Cortinarius* występowały sporadycznie, z reguły w bardzo niskiej obfitości.

6. Podsumowanie i weryfikacja hipotez badawczych

Badania przeprowadzone zostały w 15 drzewostanach dębu szypułkowego i bezszypułkowego oraz w szkółce leśnej. W niniejszej rozprawie przebadano łącznie 460 prób korzeniowych (295 siewek/sadzonek w Części I; 120 prób glebowych w Części II oraz 45 prób glebowych w Części III). Analiza 165 jednorocznych siewek dębu (badanych w części I) oraz 103 260 wierzchołków mikoryzowych (badanych w części II i III pracy) pozwoliła na wyodrębnienie 160 morfotypów. Spośród nich 140 zostało poddanych analizie molekularnej, co pozwoliło na identyfikację 97 taksonów GEM. Najczęściej identyfikowanymi GEM byli przedstawiciele rodziny *Thelephoraceae* (17 taksonów). Najczęściej i najobficiej występował grzyb, zakwalifikowany do kompleksu *C. geophilum*.

Przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację trzech gatunków (*Tomentella castanea*, *T. liliacingrisea*, *T. italica*), które nie były dotąd notowane w Polsce. Dodatkowo wykazano występowanie grzybów rzadko odnotowywanych w Polsce, głównie z rodzaju *Tomentella*, ale również takich jak *Byssocorticium atrovirens*, *Tuber puberulum* czy *Russula graveolens*.

Na podstawie przeprowadzonych badań można w sposób następujący zweryfikować postawione w rozprawie hipotezy badawcze:

HIPOTEZA I: Struktura jakościowa i ilościowa zbiorowisk GEM siewek dębów będzie zmieniała się wraz ze wzrostem i rozwojem roślin.

Hipoteza ta została zweryfikowana pozytywnie. Wyniki pracy dowodzą (Część I), że kompozycja gatunkowa zbiorowisk GEM sadzonek dębu szypułkowego, ulega znacznym zmianom w trakcie pierwszego roku wzrostu w szkółce leśnej. Kolonizacja systemów korzeniowych następuje w bardzo krótkim czasie po wysadzeniu żołądki, a zmiany w strukturze zbiorowiska GEM dotyczą zarówno relacji ilościowych, jak i jakościowych. Bardzo istotną rolę w kształtowaniu się zbiorowiska odgrywa infekcja sadzonek przez patogenicznego grzyba *E. alphitoides*, w wyniku której następuje modyfikacja gospodarki energetycznej całej rośliny.

HIPOTEZA II: Struktura zbiorowisk GEM dębów będzie zmieniała się wraz z wiekiem drzewostanu

Zgodnie z założoną hipotezą wykazano, że kompozycja gatunkowa i w mniejszym stopniu bogactwo gatunkowe zbiorowisk GEM, ulega znacznym zmianom wraz z wiekiem

drzewostanów (75 % taksonów identyfikowanych było w jednej fazie rozwojowej). Powierzchnie badawcze upraw, gdzie wszystkie zidentyfikowano taksony GEM identyfikowane były w szkółkach leśnych, najbardziej różniły się od starszych drzewostanów. Wstępowanie gatunków „szkółkowych” w najmłodszej badanej fazie rozwojowej może wynikać z podobnych warunków edaficznych w szkółce i na uprawie, bądź też grzyby te zostały przeniesione na uprawy wprost ze szkółek, wraz z sadzonkami. W starszych drzewostanach występowanie niektórych gatunków GEM, szczególnie tych o charakterze kosmopolitycznym, wydaje się z kolei niezależne od wieku drzewostanów. Najlepszym przykładem może być tu najpowszechniej występujący takson z kompleksu *C. geophilum*

HIPOTEZA III: Zróznicowanie zbiorowisk GEM zamierających drzewostanów dębowych będzie związane ze zdrowotnością poszczególnych drzew.

Wyniki tej części (III) pracy dowodzą, że zależność pomiędzy stanem zdrowotnym drzew a zbiorowiskiem GEM jest najbardziej widoczna na poziomie drzewostanu. Wpływać na to może sieć grzybni ekstramatrykalnej łącząca drzewa. Pomimo, że analizowane drzewa rosły w znacznych odległościach od siebie wpływ wspólnej sieci mikoryzowej był bardzo wyraźny. Wraz ze spadającą zdrowotnością drzewostanów zmniejsza się bogactwo gatunkowe GEM, ale również zmieniają się relacje ilościowe poszczególnych gatunków grzybów. Najlepszym przykładem może być grzyb *L. quietus*, którego obfitość wzrastała wraz ze stopniem defoliacji i stopniem uszkodzeń poszczególnych drzew.

7. Wnioski

1. Siewki dębu szypułkowego w pierwszym roku wzrostu w szkółce leśnej kolonizowane są przez stosunkowo wysoką (9) liczbę taksonów GEM, a zmiany w zbiorowisku GEM siewek dębów zachodzą bardzo dynamicznie.
2. Na zbiorowiska GEM siewek dębu istotny wpływ ma infekcja roślin przez patogenicznego grzyba *E. alphitoides*.
3. Wraz z wiekiem drzewostanów dębowych bogactwo gatunkowe GEM ulega jedynie nieznacznym zmianom ilościowym i jakościowym.
4. Kompozycja gatunkowa GEM drzewostanów dębowych zmienia się w momencie przejścia z fazy uprawy do fazy młodnika. W późniejszych fazach rozwojowych następuje stabilizacja zbiorowiska, a zmiany w strukturze ilościowej GEM są niewielkie.
5. Wraz z wiekiem drzewostanów następuje zmiana kompozycji gatunkowej zbiorowisk GEM, która wyraża się przede wszystkim:
 - a) spadkiem udziału procentowego, frekwencji występowania i liczby taksonów GEM należących do *Ascomycota*.
 - b) wzrostem liczby gatunków należących do *Basidiomycota*, w szczególności z rodziny *Russulaceae*, *Boletaceae* i *Amanitaceae*.
6. Wpływ zdrowotności drzew na kształtowanie się zbiorowisk GEM jest najbardziej widoczny na poziomie drzewostanów i objawia się zmniejszeniem bogactwa gatunkowego oraz zmianami relacji ilościowych pomiędzy taksonami GEM.
7. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że na wyniki badań zbiorowisk GEM przeprowadzonych w zamierających drzewostanach wpływała wspólna sieć mikoryzowa, która łączy drzewa. Wpływ ten powinien być uwzględniany w badaniach zbiorowisk GEM przeprowadzanych *in – situ*.
8. Przedstawione badania pokazują, że struktura zbiorowisk GEM jest determinowana przez kondycję partnera roślinnego. Inaczej mówiąc zmiany w zbiorowisku GEM są skutkiem, a nie przyczyną pogarszającego się stanu zdrowotnego drzew/drzewostanów.

8. Bibliografia:

1. Agerer R. 1987-2008. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Munich
2. Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11:107–114
3. Allen E.B., Allen M.F, Helm D.T., Trappe J.M., Molina R., Rincon E. 1995. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170: 47-62
4. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
5. Bahram M., Pölme S., Kõljalg U., Tedersoo L. 2011. A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbor dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 313–320
6. Beckjord P.R., Melhuish J.H., McIntosh M.S. 1985. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on growth and formation of ectomycorrhizae of *Quercus alba* and *Q. rubra* seedlings by *Pisolithus tinctorius* and *Scleroderma aurateum*. *Can. J. Bot.* 63: 1677-1680
7. Berch S.M., Massicotte H.B., Tackaberry L.E. 2005. Re-publication of a translation of ‘The vegetative organs of *Monotropa hypopitys* L.’ published by F. Kamienski in 1882, with an update on *Monotropa* mycorrhizas. *Mycorrhiza* 15: 323-332
8. Bever J.D., Richardson S.C., Lawrence B.M., Holmes J., Watson M. 2009. Preferential allocation of beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mycelium. *Ecol. Let.* 12: 13-21
9. Björkman E. 1970. Forest tree mycorrhiza — The conditions for its formation and the significance for tree growth and afforestation *Plant and Soil* 30: 589-610
10. Bonet J.A., Fischer C.R., Colinas C. 2004. The relationship between forest age and aspect on the production of sporocarps of ectomycorrhizal fungi in *Pinus sylvestris* forests of the central Pyrenees. *For Ecol Man* 203: 157-175
11. Boullard B. 1968. Les Mycorrhizes. Monographie. Masson et Cie Editeurs, Paris:135
12. ss.
13. Brown J.H., Whitham T.G., Ernest S.K.M., Gehring C.A. 2001. Complex species interactions and the dynamics of ecological system: long-term experiments. *Science* 293: 643-650
14. Brundrett M.C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320:37–77

15. Bruns T.D., Shefferson R.P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Can. J. Bot.* 82: 1122 – 1132
16. Bruns T.D., Peay K.G., Boynton P.J., Grubisha L.C., Hynson N.A., Nguyen N.H., Rosenstock N.P. 2009. Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment. *New Phytol.* 181: 463-470
17. Byrd K.B., Parker V.T., Vogler D.R., Cullings K.W. 2000. The influence of clear-cutting on ectomycorrhizal fungus diversity in a lodgepole pine (*Pinus contorta*) stand, Yellowstone National Park, Wyoming, and Gallatin National Forest, Montana. *Can J Bot* 78: 149-156
18. Causin R., Montecocchio L., Mutto Accordi S. 1996. Probability of ectomycorrhizal infection in a declining stand of common oak. *Ann. Sci. For.* 53: 743-752
19. Cavender-Bares J., Izzo A., Robinson R., Lovelock C.E. 2009. Changes in ectomycorrhizal community structure on two containerized oak hosts across an experimental hydrologic gradient. *Mycorrhiza* 19:133–142
20. Clause A., George E. 2005. Effect of stand age on fine-root biomass and biomass distribution in three European forest chronosequences. *Can J For Res* 35: 1617-1625
21. Cline E.T., Ammirati J.F., Edmonds R.L. 2005. Does proximity to mature trees influence ectomycorrhizal fungus communities of Douglas-fir seedlings? *New Phytol.* 166: 993–1009
22. Cázares E., Trappe J.M., Jumpponen A. 2005. Mycorrhiza-plant colonization patterns on a subalpine glacier forefront as a model system of primary succession. *Mycorrhiza* 15: 405-416
23. Coleman M.D., Bladsoe C.S., Lopushinsky W. 1989. Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Can. J. Bot.* 67:29-390
24. Courty P.E., Labbe J., Kohler A., Marçais B., Bastien C., Churin J.L., Garbaye J., Le Tacon F. 2011. Effect of poplar genotypes on mycorrhizal infection and secreted enzyme activities in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots. *J Exp Bot* 62:249–260
25. Courty P.E., Buè M., Dedhiou A.G., Frey-Klett P., Le Tacon F., Rineau F., Turpault M.-P., Uroz S., Garbaye J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biol. Biochem.* 42: 679-698
26. Courty P.E., Franc A., Pierrat J.C., Garbaye J. 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizon of a temperate forest. *App. Environ. Biol.* 74: 5792-5801

27. Courty P.E., Breda N., Garbaye J. 2007. Relation between oak tree phenology and the secretion of organic matter degrading enzymes by *Lactarius quietus* ectomycorrhizas before and during bud break. *Soil Biol. Biochem.* 39: 1655-1663
28. Cullings KW. 1996. Single phylogenetic origin of ericoid mycorrhizae within the Ericaceae. *Can. J. Bot.* 62: 1896 – 1909
29. Cullings K., Vogler D.R., Parker V.T., Makhija S. 2001. Defoliation effects on the ectomycorrhizal community of a mixed *Pinus contorta/Picea engelmannii* stand in Yellowstone Park. *Oecologia* 127:533–539
30. de Román M., de Miguel AM. 2005. Post-fire, seasonal and annual dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* L. forest over a 3-year period. *Mycorrhiza* 15: 471–482
31. Deacon J.W., Fleming L.V. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. W: Allen MF (wyd.) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman & Hall. New York, 249-300
32. Deacon J.W., Donaldson S.J., Last F.T. 1983. Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch. *Plant Soil* 71: 257-262
33. Diaz S., Cabido M. 2001. Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends Ecol. Evol.* 16:646–655
34. Dieckie I.A., Koide R.T., A.C. 2001. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of *Quercus rubra* seedlings. *New Phytol.* 151:257-264
35. Dighton J., Mason P.A. 1985. *Mycorrhizal dynamics during forest tree development*. W: Moore D (wyd.) *Developmental biology of higher fungi*. Cambridge University Press. Cambridge. 117-139
36. Dighton J., Poskitt J.M., Howard D.M. 1986. Changes in occurrence of basidiomycete fruit bodies during forest stand development: with specific reference to mycorrhizal species. *Trans Br Mycol Soc* 87: 163-171
37. Dominik T. 1951. Badanie mykotrofizmu roślinności wydym nadmorskich i śródlądowych. *Acta Soc. Bot. Pol.* 21: 125-164
38. Dominik T. 1961. Key to mycorrhizae. *Zeszyty Nauk. WSR Szczecin* 5: 63-104
39. Dominik T. 1969. Key to ectotropic mycorrhizae. *Folia Forest. Pol.* 15: 309-328
40. Dominik T., Wojciechowska H. 1963. Investigations on the mycotrophy of two Pine forest communities in the Wielkopolski National Park: *Dicrano-Pinetum* and *Periclyme-no-Quercetum*. *Prace IBL* 253: 55-74
41. Druebert C., Lang C., Valtanen K., Polle A. 2009. Beech carbon productivity as driver of ectomycorrhizal abundance and diversity. *Plant Cell Env.* 32: 992-1003

42. Duñabeitia M.K., Hormilla S., Garcia-Plazaola J.I., Txarterina K., Arteche U., Becerril J.M. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14:11–18
43. Durall D.M., Gamiet S., Simard S.W., Kudrna L., Sakakibara S.M. 2006. Effects of clearcut logging and tree species composition on the diversity and community composition of epigeous fruit bodies formed by ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* 84: 966–980
44. Durall D.M., Jones M.D., Wright E.F., Kroeger P., Coates K.D. 1999. Species richness of ectomycorrhizal fungi in cutblocks of different sizes in the Interior Cedar-Hemlock forests of northwestern British Columbia: sporocarps and ectomycorrhizae. *Can. J. For. Res.* 29: 1322–1332
45. Egli S., Ayer F., Peter M., Eilmann B., Rigling A. 2010. Is forest mushroom productivity driven by tree growth? Results from a thinning experiment. *Ann. For. Sci.* 67:509
46. Elmqvist T., Folke C., Nystrom M., Peterson M., Bengtsson J., Walker B., Norberg J. 2003. Response diversity, ecosystem change, and resilience. *Front Ecol Environ* 1:488–494
47. Falniowski A. 2003. *Metody numeryczne w taksonomii*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. Kraków.
48. Fellner R., Peskova V. 1995. Effect of industrial pollutants on ectomycorrhizal relationship in temperate forests. *Can. J. Bot.* 73:1310-1315
49. Fox F.M. 1983. Role of basidiospores as inocula of mycorrhizal fungi of birch. *Plant Soil* 71: 269-273
50. Frank A.B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. Detsche Bot. Ges.* 3: 128-145.
51. Frank A.B. 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15: 267-275
52. Frank J.L., Anglin S., Carrington E.M., Taylor D.S., Viratos B., Southworth D. 2009. Rodent dispersal of fungal spores promotes seedling establishment away from mycorrhizal networks on *Quercus garryana*. *Botany* 87:821–829
53. Frankland J.C. 1998. Fungal succession – unravelling the unpredictable. *Mycol Res* 102: 1-15

54. Garbaye J., Churin J.L. 1997. Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. *For. Ecol. Manag.* 98: 221–228
55. Garbaye J., Meney J., Wilhelm M.E. 1986. Les mycorrhizes des jeunes chenes dans les pepinieres et les regenerations naturelles du Nord-Est de la France. *Acta Oecol.*
56. Gardes M., Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizas and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
57. Gardes M., Bruns T.D. 1996 Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can J Bot* 74: 1572-1583
58. Gebhardt S., Neuberg K., Wöllecke J., Münzenberger B., Hüllt R.F. 2007. Ectomycorrhiza communities of red oak (*Quercus rubra* L.) of different age in the Lusatian lignite mining district, East Germany. *Mycorrhiza* 17:279–290
59. Gehring A., Whitham T.G. 2002. Mycorrhiza-herbivore interactions: Population and community consequences. W: van der Heijden M.G.A., Sanders I.R. (wyd.) *Mycorrhizal Ecology, Ecological studies* 157:295-320
60. Genet H., Brèda N., Dufrene E. 2009. Age-related variation in carbon allocation et tree and stand scales in beech (*Fagus sylvatica* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. *Tree Physiol.* 30: 177-192
61. Giertych M.J., Suszka J. 2011. Consequences of cutting off distal ends of cotyledons of *Quercus robur* acorns before sowing. *Ann. For. Sci.* 68:433-442
62. Grogan R., Baar J., Bruns T.D. 2000. Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *J Ecol* 88: 1051-1062
63. Hagerman S.M., Jones M.D., Bradfield G.E., Sakakibara S.M. 1999. Ectomycorrhizal colonization on *Picea engelmannii* x *Picea glauca* seedlings planted across cut blocks of different size. *Can. J. For. Res.* 29: 1856-1870
64. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont Electron* 4:9
65. Haissig, B.E., R.E. Dickson. 1979. Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiol. Plant.* 47:151–157
66. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
67. Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* 94:166-172

68. Helm D.J., Allen E.B., Trappe J.M. 1996. Mycorrhizal chronosequence near Exit Glacier, Alaska. *Can J Bot* 74: 1496-1506
69. Herzog C., Petere M., Pritsch K. Günthardt-Goerg M.S., Egli S. 2012. Drought and warming affects abundance and exoenzyme profiles of *Cenococcum geophilum* associated with *Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*. *Plant Biol.* 15: 230-237
70. Hewitt H.G., Ayres P.G. 1976 Effect of infection by *Microspheera alpitoides* (Powdery mildew) on carbohydrate levels and translocation in seedlings of *Quercus robur*. *New Phytol.* 77: 379-390
71. Hintikka V. 1988. On the macromycete flora in oligotrophic pine forests of different ages in South Finland. *Acta Bot Fennica* 136: 89-94
72. Holland E.A., Cheng W., Crossley D.A. 1996. Herbivore-induced changes in plant carbon allocation : assessment of belowground C fluxes using carbon C-14. *Oecologia* 107: 87-94
73. Horton T.R, Bruns T.D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Mol Ecol* 10: 1855-1871
74. Horton T.R, Molina R., Hood K. 2005. Douglas-fir ectomycorrhizae in 40- and 400-year-old stands: mycobiont availability to late successional western hemlock. *Mycorrhiza* 15: 393-403
75. Högberg M.N., Högberg P. 2002. Extramatricial ectomycorrhizal mycelium contributes one – third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in forest soil. *New Phytol.* 150: 601 – 610
76. Hutchison L.J. 1999. *Lactarius*. W: Cairney JWG, Chambers SM (wyd.) *Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 269-285
77. Ishida T.A., Nara K., Hogetsu T. 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer–broadleaf forests. *New Phytol.* 174: 330-344
78. Iwański M. 2007. Struktura zbiorowisk grzybów ektomikoryzowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w różnych stadiach wiekowych. *Rozprawa doktorska*, Kórnik
79. Iwański M., Rudawska M., Leski T. 2006. Mycorrhizal associations of nursery grown Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in Poland. *Ann. For. Sci.* 63: 715-723
80. Jeffris P. 1999. *Scleroderma*. W: Cairney JWG, Chambers SM (wyd.) *Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 187-197

81. Jones M.D., Durall D.M., Cairney J.W.G. 2003. Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytol* 157:399–422
82. Jonsson L., Dahlberg A., Nilsson M.-C., Zackrisson O., Kåren O. 1999. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Mol Ecol* 8: 205-215
83. Jumpponen A., Jones KL. 2009. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytol.* 184: 438–448
84. Jumpponen A., Jones KL. 2010a. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytol.* 186: 496-513
85. Jumpponen A., Jones KL., Mattox JD., Yaege C. 2010b. Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Mol. Ecol.* 19: 41-51
86. Jumpponen A., Trappe J.M., Cázares E. 2002. Occurrence of ectomycorrhizal fungi on a receding glacier forefront. *Mycorrhiza* 12: 43-49
87. Jumpponen A., Egerton-Warburton L.M. 2005. Mycorrhizal functioning in successional environments: a community assembly model incorporating host plant, environmental, and biotic filters. W: Dighton J, White JF, Oudemans P (wyd.) *The Fungal Community, its organization and role in the ecosystem.* Taylor&Francis 139-168
88. Kabrick J.M., Dey D.C., Jensen R.G., Wallendorf M. 2005. The role of environmental factors in oak decline and mortality in the Ozark Highlands. *For. Ecol. Manag.* 255: 1409-1417
89. Kamiński F.M. 1882. Les organes végétatifs du *Monotropa hypopithys* L. *Mem. Soc. Nat. Sci. Nat. Math Cherbourg* 24:5–40
90. Karliński L., Rudawska M., Kieliszewska-Rokicka B., Leski T. 2010. Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza* 20: 315-324
91. Karpati A.S., Handel S.N., Dighton J., Horton T.R. 2011. *Quercus rubra*-associated ectomycorrhizal fungal communities of disturbed urban sites and mature forests. *Mycorrhiza*
92. Kelly A.P. 1950. Mycotrophy in plants. *Chronica Bot.*: 223 ss

93. Kernaghan G., Sigler L., Khasa D. 2003. Mycorrhizal and root endophytic fungi of containerized *Picea glauca* seedlings assessed by rDNA sequence analysis. *Microb Ecol* 45:128–136
94. Kullberg Y., Walander N.T. 2003. Effect of stimulated winter browsing and drought on growth of *Quercus robur* L. seedlings during establishment. *For. Ecol. Manag.* 173: 125-133
95. Kovacs G., Pausch M., Urban A. 2000 Diversity of ectomycorrhizal morphotypes and oak decline. *Phyton* 40:109–116
96. Kozłowski T.T. 2002. Physiological ecology of natural regeneration of harvested and disturbed forest stands: implications for forest management. *For Ecol Man* 158: 195-221
97. Kõljalg U., Dahlberg A., Taylor AFS., Larsson E., Hallenberg E. 2000. Diversity and abundance of resupinate theleporoid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests. *Mol. Ecol.* 9: 1985–1996
98. Kranabetter J.M., Friesen J., Gamiet S., Kroeger P. 2005. Ectomycorrhizal mushroom distribution by stand age in western hemlock – lodgepole pine forests of northwestern British Columbia. *Can J For Res* 35: 1527-1539
99. Kranabetter J.M., Wylie T. 1998. Ectomycorrhizal community structure across forest openings on naturally regenerated western hemlock seedlings. *Can. J. Bot.* 76: 189–196
100. Krivtsov V., Watling R., Walker S.J.J., Knott D., Palfreyman J.W., Staines H.J. 2003. Analysis of fungal fruiting patterns at the Dawyck Botanic Garden – *Ecol.Mod.* 170: 393–406
101. Laganá A., Angiolini C., Loppi S., Salerni E., Perini C., Barluzzi C., De Dominicis V. 2002. Periodicity, fluctuations and successions of macrofungi in fir forests (*Abies alba* Miller) in Tuscany, Italy. *For Ecol Man* 169: 187-202
102. Last F.T., Mason P.A., Wilson J., Deacon JW. 1983. Fine roots and sheathing mycorrhizas: their formation, function and dynamics. *Plant Soil* 71: 9-21
103. Leski T., Pietras M., Rudawska M. 2010. Ectomycorrhizal fungal communities of pedunculate and sessile oak seedlings from bare-root forest nurseries. *Mycorrhiza*
104. Leski T., Rudawska M., Aučina A. 2008. The ectomycorrhizal status of European larch (*Larix decidua* Mill.) seedlings from bare - root forest nurseries. *Forest Ecol. Management* 256 (12): 2136-2144
105. Linder P., Elfving B., Zackrisson O. 1997. Stand structure and successional trends in virginboreal forest reserves in Sweden. *For Ecol Man* 98: 17-33

106. LoBuglio K.F., Barbee M.L., Taylor J.W. 1996. Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and other mycorrhizal fungi among *Ascomycetes*. *Mol. Phyl. Evol.* 6: 287-294
107. Luan J., Liu S., Zhu X., Wang J. 2011. Soil carbon stocks and fluxes in a warm-temperate oak chronosequence in China. *Plant Soil* 347: 243-253
108. Łuszczynski J. 1998. Macromycetes of the *Potentillo albae-Quercetum* in the Świętokrzyskie Mts. - monitoring studies. *Acta Mycol.* 33: 231-245
109. Manion P.D. 1991. *Tree Disease Concepts*, 2nd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, p. 402.
110. Mason P.A., Wilson J., Last F.T., Walker C. 1983. The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant Soil* 1: 247-256
111. Menkis A., Vasaitis R. 2011. Fungal in roots of nursery grown *Pinus sylvestris* ectomycorrhizal colonization, genetic and spatial distribution. *Microb Ecol* 61:52–63.
112. Menkis A., Vasiliauskas R., Taylor A.F.S., Stenlid J., Finlay R. 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morpho-typing, direct sequencing, and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16:33–41
113. Meyer F.H. 1984. Mycologisches Beobachtungen zum Baumstraben. *Allg. Comm. Inst. For. Fenniae* 69: 4-48
114. Miller S.L., Torres P., McClean T.M. 1994. Persistence of basidiospores and sclerotia of ectomycorrhizal fungi and *Morchella* in soil. *Mycologia* 86: 89-95
115. Molina R., Massicotte H., Trappe J.M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. W: Allen MF (wyd.) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungus process*. Chapman and Hall, New York. 357-423
116. Montecchio L., Causin R., Rossi S., Accardi S.M. 2004. Changes in ectomycorrhizal diversity in a declining *Quercus ilex* coastal forest. *Phytopathol. Mediterr.* 43: 26–34
117. Morris M.H., Smith M.E., Rizzo D.M., Rejmánek M., Bledose C.S. 2008. Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytol* 178:167–176
118. Mosca E., Montecchio L., Sella L., Garbaye J. 2007a. Short-term effect of removing tree competition on the ectomycorrhizal status of a declining pedunculate oak forest (*Quercus robur* L.). *Forest Ecol. Manag.* 244:129–140

119. Mosca E., Montecchio L., Scattolin L., Garbaye J. 2007b. Enzymatic activities of three ectomycorrhizal types of *Quercus robur* L. in relation to tree decline and thinning. *Soil Biol Biochem* 39:2897–2904
120. Moser M.H., Smith M.E., Rizzo D.M., Rejmanek M., Bladsoe S.C. 2007. Contrasting ectomycorrhizal fungal communities in the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytol.* 178: 167-176
121. Mullis K.B., Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology* 155: 335-50.
122. Murat E. 2002. Szczegółowa hodowla lasu. Oficyna wydawnicza – Wyd Świat. Warszawa
123. Nara K., Nakaya H., Wu B., Zhou Z., Hogetsu T. 2003a. Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytol* 159: 743-756.
124. Nara K., Nakaya H., Hogetsu T. 2003b. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytol* 158: 193-206.
125. Nehls U., Ghringer F., Wittulsky S., Dietz S. 2010. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol.* 12: 292–301
126. Newton A.C. 1991. Mineral nutrition and mycorrhizal infection of seedlings oaks and birch. III. Epidemiological aspect of ectomycorrhizal infection and the relationship to seedling growth. *New Phytol.* 117: 53-60.
127. Newton A.C. 1992. Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2: 75–79.
128. Newton A.C., Pigott C.D. 1991. Mineral nutrition and mycorrhizal infection of seedlings oaks and birch. II. The effect of fertilization on growth, nutrient uptake and ectomycorrhizal infection. *New Phytol.* 117: 45-52
129. Nguyen N.H., Hynso N.A. Bruns T.D. 2012. Stayin’ alive: survival of mycorrhizal fungal propagules from 6-yr-old forest soil. *Fungal Ecol.* 5: 741-746
130. Nilsson H., Abarenkov K., Veldre V., Nylinder S., De Wit P., Brosche S., Ryberg M., Kristianson E. 2009. An open source chimera checker for the fungal ITS region. *Mol Ecol Res* 10:1076–1081
131. O'Neill J.J.M., Mitchell D.T. 2000. Effects of benomyl and captan on growth and mycorrhizal colonization of Sitka-spruce (*Picea sitchensis*) and ash (*Fraxinus excelsior*) in Irish nursery soil. *For Pathol* 30:165–174
132. Ogaya R., Penuelas J. 2005. Decreased mushroom production in a holm oak forest in response to an experimental drought. *Forestry* 78: 279-283

133. Oleksyn J., Żytkowiak R., Koralewski P. 2000 Genetic and environmental control of seasonal carbohydrate dynamics in trees of diverse *Pinus sylvestris* populations. *Tree Physiol.* 20: 837-847
134. Pachlewski R., Gałalska J. 1953. Badania mykotrofizmu dębów na terenie Polski z uwzględnieniem warunków bioekologicznych. *Acta Soc. Bot. Polon.* 22: 561-576.
135. Palfner G., Casanova-Katny M.A., Read D.J. 2005. The mycorrhizal community in a forest chronosequence of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] in Northern England. *15: 571–579*
136. Panaccione D.G., Sheets N.L., Miller S.P., Cumming J.R. 2001. Diversity of *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine and non-serpentine soils. *Mycologia* 93: 645-652
137. Parrent J.L., Morris W.F., Vilgalys R. 2006. CO₂-enrichment and nutrient availability alter ectomycorrhizal fungal communities. *Ecologia* 87: 2278-2287
138. Pestaña M., Santolamazza-Carbone S. 2011. Defoliation negatively affects plant growth and the ectomycorrhizal community of *Pinus pinaster* in Spain. *Oecologia* 165: 723-733
139. Pešková V., Landa J., Modlinger R. 2013. Long term observation of mycorrhizal status and above-ground fungi fruiting body production in oak forest. *Dendrobiology* 69: 99-110
140. Peter M., Ayer F., Cudlín P., Egli S. 2008. Belowground ectomycorrhizal communities in three Norway spruce stands with different degrees of decline in the Czech Republic. *Mycorrhiza* 15:157–169
141. Peter M., Ayer F., Egli S. 2001a Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytol* 149: 311-325
142. Peter M., Ayer F., Egli S., Honegger R. 2001b. Above- and below-ground community structure of ectomycorrhizal fungi in three Norway spruce (*Picea abies*) stands in Switzerland. *Can J Bot* 79: 1134-1151
143. Pietras M. 2012. Wykorzystanie metod molekularnych w badaniach nad różnorodnością biologiczną grzybów mikoryzowych. W: Nowe trendy w badaniach przyrodniczych 2 (Kuczera ed.), Tom 1, Wydawnictwo Craetivetime, Kraków, 113-121
144. Pietras M., Rudawska M., Leski T., Karliński L. 2013. Diversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on nursery grown European beech seedlings. *Annals of Forests Sciences* 70: 115-121

145. Pigott C.D. 1982. Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr. in dry soils. *New Phytol.* 92:513-517
146. Pirozynski K.A., Malloch D.W. 1975. The origin of land plants; a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153 – 164
147. Polityka ekologiczna państwa 1991.
148. Polityka leśna państwa 1997
149. Raggazi A. 1999. II deperimento dei querceti Italiani: considerazioni su un fenomeno in evoluzione. *Ann. Accad. Italiana Dci. Forest.* 48: 3-23
150. Renaud J.P., Mauffette Y. 1991. The relationships of crown dieback with carbohydrate content and growth of sugar maple (*Acer saccharum*). *Can J For Res* 21:1111–1118
151. Richard F., Millot S., Gardes M., Selosse M-A. 2005. Diversity and specific of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytol.* 166: 1011-1023
152. Rineau F., Courty Pierre-E. 2011. Secreted enzymatic activities of ectomycorrhizal fungi as a case study of functional diversity and functional redundancy. *Ann. For. Sci.* 68: 69-80
153. Rineau F., Garbaye J. 2009. Effects of liming on ectomycorrhizal community structure in relation to soil horizons and tree hosts. *Fungal Ecol.* 2:103–109
154. Robertson N.F. 1954. Studies on the mycorrhiza of *Pinus sylvestris*: I. The pattern of development of mycorrhizal roots and its significance for experimental studies. *New Phytol.* 53: 253–283
155. Rocznik statystyczny: Leśnictwo 2010, GUS
156. Rosling A., Landahl B.D., Finley R.D. 2004. Carbon allocation to ectomycorrhizal roots and mycelium colonising different mineral substrates. *New Phytol.* 162: 785-802
157. Rudawska M. 2006. Mikoryza. W: Bugała W. (red): Dęby, *Q robur L., Q. petraea* (Matt.) Liebl., Nasze drzewa leśne. Bogucki wyd. Naukowe, Poznań s: 264-303
158. Rudawska M., Leski T. 2009. Znaczenie wiedzy o zbiorowiskach grzybów mikoryzowych w szkółkach leśnych dla rozwoju mikoryzacji sterowanej. *Sylwan* 153: 16-26
159. Rudawska M., Leski T., Trocha L.K., Gornowicz R. 2006. Ectomycorrhizal status of Norway spruce seedlings from bare-root forest nurseries. *Forest Ecol. Management:* 236: 375-384

160. Salzer P., Hager A. 1993. Effect of auxins and ectomycorrhizal elicitors on wall-bound proteins and enzymes of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Trees* 8: 49 -55
161. Selosse M-A., Le Tacon F. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol. Evol.* 13: 15-50
162. Sierota Z. 2011. Gdy las choruje. CILP. Warszawa 2011
163. Smith S.E, Read D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd edn. Academic Press San Diego, CA, USA.
164. Smith M.E., Douhan G.W., Rizzo D.M. 2007. Ectomycorrhizal community
165. Smith J.E, Molina R., Huso M.M.P., Luoma D.L., McKay D., Castellano M.A., Lebel T., Valachovic Y. 2002. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, U.S.A. *Can J Bot* 80:186–204
166. Southworth D., Carrington EM., Frank JL., Gould P., Harrington CA., Devine WD. 2009. Mycorrhizas on nursery and field seedlings of *Quercus garryana*. *Mycorrhiza* 19:149-158
167. Southworth D., He X.-H., Swenson W., Bledsoe C. S., Horwath W. R. 2005. Application of network theory to potential mycorrhizal networks. *Mycorrhiza* 15: 589-595
168. Suz L.M., Bidartondo M. 2013. Mycorrhizas in Europe's oaks: belowground indicators and their environmental drivers. *Mat. Konf. VII Międzynarodowej Konferencji Mikorysowej ICOM 7. Dehli, Indie*
169. Talbot J. M., Allison S. D., Treseder K. K. 2008. Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Funct. Ecol.* 22: 955-963
170. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
171. Taylor A., Whiteside L., Mitchell R., Hesling E., Hester A. 2013. Impact of above-ground grazing on ectomycorrhizal communities associated with birch trees are minimized by mycelial network linking grazed and ungrazed trees. *Mat. Konf. VII Międzynarodowej Konferencji Mikorysowej ICOM 7. Dehli, Indie*
172. Taylor D.L, Bruns T.D. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol Ecol* 8: 1837-1850

173. Tedersoo L., Bahram M., Jairus T., Bechem E., Chinoya S., Mpumba R., Leal M., Randrianjohany E., Razafimandimbison S., Sadam A., Naadel T., Kõljalg U. 2011. Spatial structure and the effects of host and soil environments on communities of ectomycorrhizal fungi in wooded savannas and rain forests of Continental Africa and Madagascar. *Mol. Ecol.* 20: 3071-3080
174. Tedersoo L., May T.W., Smith M.E. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217-263
175. Tedersoo L., Jairus T., Horton B.M., Abarenkov K., Suvi T., Saar I., Kõljalg U. 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytol.* 180: 479-490
176. Termorschuizen A.J. 1991. Succession of mycorrhizal fungi in stands of *Pinus sylvestris* in Netherlands. *J. Veg. Sci.* 2: 555-564
177. Teste F.P., Simard S.W., Durall D.M. 2009. Role of mycorrhizal networks and tree proximity in ectomycorrhizal colonization of planted seedlings. *Fungal Ecol.* 2: 21-30
178. Thomson B.D.; Grove T.S.; Malajczuk N.; Hardy G.E.S. 1994. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytol.* 126: 517-524
179. Tomas F.M., Blank R., Hartmann G. 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as a cause of oak decline in Central Europe. *For Path.* 32: 277-307
180. Trampler T., Kliczkowska A., Dmyterko E., Sierpińska A., Matuszkiewicz W. 1990. Regionalizacja przyrodniczo leśna na podstawach ekologiczno – fizjograficznych. PWRiL. Warszawa
181. Trappe J.M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28: 538-606.
182. Treseder K.K., Masiello C.A., Lansing, J.L., Allen F. 2004. Species-specific measurements of ectomycorrhizal turnover under N-fertilization: combining isotopic and genetic approaches. *Oecologia* 138: 419-425
183. Trocha L.K., Kałucka I., Stasińska M., Nowak W., Dabert M., Leski T., Rudawska M., Oleksyn J. 2012. Ectomycorrhizal fungal communities of native and non-native *Pinus* and *Quercus* species in a common garden of 35-year-old trees. *Mycorrhiza* 22: 121-134

184. Trocha L.K., Rudawska M., Leski T., Dabert M. 2006. Genetic diversity of naturally established ectomycorrhizal fungi on Norway spruce seedlings under nursery conditions. *Microbial Ecology*: 52, 418-425
185. Urban A., Weiß M., Bauer R. 2003. Ectomycorrhizae involving sebacinoïd mycobionts. *Mycol Res* 107: 3–14
186. Ustawa o lasach 1991. (Dz.U.05 Nr 45 poz. 435)
187. Wang B., Qui Y.-L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299 – 363
188. Wang Q., He XH., Guo L-D. 2012. Ectomycorrhizal fungus communities of *Quercus liaotungensis* Koidz of different ages in a northern China temperate forest. *Mycorrhiza* 22:461–470
189. Walker J.F., Miller O.K., Horton J.L. 2005. Hyperdiversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in mixed forests in the southern Appalachian Mountains. *Mol Ecol* 14:829–838
190. Walker J.F., Miller O.K., Horton J.L. 2008. Seasonal dynamics of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in southern Appalachian Mountains. *Mycorrhiza* 18:123–132.
191. White T.J, Bruns T.D., Lee S., Taylor. J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press: London, pp. 315-322
192. Wojewoda W. 2003. Checklist of Polish larger basidiomycetes. Wydawnictwo Instytutu Botaniki W. Szafera, Kraków, 647-650
193. Woodall C.W., Grambsch P.L., Thomas W., Moser K. 2008. Survival analysis for a large – scale forest health issue: Missouri oak decline. *Env. Mon. Asses.* 108: 295 - 307
194. Woś A. 1999. *Klimat Polski*, PWN Warszawa.
195. Valentine L.L., Fiedler T.L., Hart A.N., Petersen C.A., Berninghausen H.K., Southworth D. 2004. Diversity of ectomycorrhizas associated with *Quercus garryana* in southern Oregon. *Can. J. Bot.*: 123-135
196. Visser S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol* 129:389–401
197. Voiry H. 1991. Classification morfologique des ectomycorrhizes du chene et du herte dans le nord – est de la France. *Eur. J. For Pathol.* 11(5-6): 284 – 299.

Fotografie mikoryz zidentyfikowanych w badaniach

Objaśnienia:

S	szkółka leśna
U	uprawy
M	młodnik
T	tyczkowiny
D	drzewostany dojrzałe
Z	zamierające drzewostany

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Eurotiates*
RODZINA: *Elaphomycetaceae*
RODZAJ: *Elaphomyces*



Elaphomyces sp.

Z

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Helotiales*
RODZAJ: *Cadophora*



Cadophora sp.

U

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Helotiales*
RODZINA: *Helotiaceae*
RODZAJ: *Meliniomycetes*



M. variabilis

M

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Helotiales*



UN. Helotiales 1

U

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Helotiales*
RODZINA: *Helotiaceae*
RODZAJ: *Rhizoscyphus*



R. ericae

U

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Helotiales*



UN. Helotiales 2

D

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Hysteriales*
Incertae sedis
RODZAJ: *Cenococcum*



C. geophilum S U M T D Z

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*
RODZINA: *Pyronemataceae*
RODZAJ: *Trichopea*



T. woolhopeia M

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*
RODZINA: *Discinaceae*
RODZAJ: *Hydnotrya*



H. tulasnei U

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*
RODZINA: *Tuberaceae*
RODZAJ: *Tuber*



T. puberulum Z

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*
RODZINA: *Pyronemataceae*
RODZAJ: *Genea*



G. hispidula M

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*
RODZINA: *Tuberaceae*
RODZAJ: *Tuber*



Tuber sp.1 S U M T D Z

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*
RODZINA: *Tuberaceae*
RODZAJ: *Tuber*



Tuber sp.2

M

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*

UN. *Pezizales*



UN. *Pezizales* 3

D

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*

UN. *Pezizales*



UN. *Pezizales* 1

M

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*

UN. *Pezizales*



UN. *Pezizales* 4

Z

TYP: *Ascomycota*
RZĄD: *Pezizales*

UN. *Pezizales*



UN. *Pezizales* 2

T

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Amanitaceae*
RODZAJ: *Amanita*



A. citrina

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Amanitaceae*
RODZAJ: *Amanita*

A. fulva

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Cortinariaceae*
RODZAJ: *Cortinarius*



C. anomalus

M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Amanitaceae*
RODZAJ: *Amanita*



A. muscaria

M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Cortinariaceae*
RODZAJ: *Cortinarius*



C. sertipes

M

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Amanitaceae*
RODZAJ: *Amanita*



A. rubescens

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Cortinariaceae*
RODZAJ: *Cortinarius*



Cortinarius sp.

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Hydnangiaceae*
RODZAJ: *Laccaria*



L. amethystina T D Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Inocybaceae*
RODZAJ: *Inocybe*



I. curvipes S

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Hydnangiaceae*
RODZAJ: *Laccaria*



L. laccata M D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Inocybaceae*
RODZAJ: *Inocybe*



I. cincinnata M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Hydnangiaceae*
RODZAJ: *Laccaria*



L. tortilis S U

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Strophariaceae*
RODZAJ: *Hebeloma*



H. sacchariolens S U

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Strophariaceae*
RODZAJ: *Hebeloma*



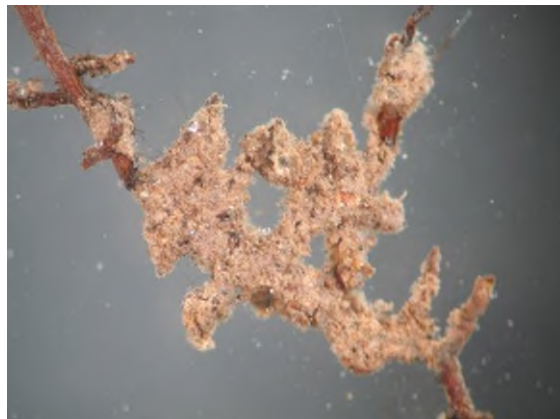
NM *Hebeloma* sp. 1 M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Strophariaceae*
RODZAJ: *Naucoria*



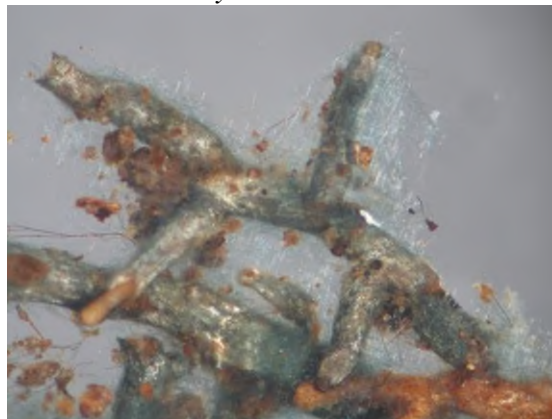
N. salicis U

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Strophariaceae*
RODZAJ: *Hebeloma*



NM *Hebeloma* sp. 2 Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Atheliales*
RODZINA: *Atheliaceae*
RODZAJ: *Byssocorticium*



B. atrovirens D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Agaricales*
RODZINA: *Strophariaceae*
RODZAJ: *Hebeloma*



H. veputipes M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Boletaceae*
RODZAJ: *Boletus*



B. edulis M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Boletaceae*
RODZAJ: *Xerocomus*



X. badius

M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Boletaceae*
RODZAJ: *Xerocomus*



X. subtomentosus

T D Z

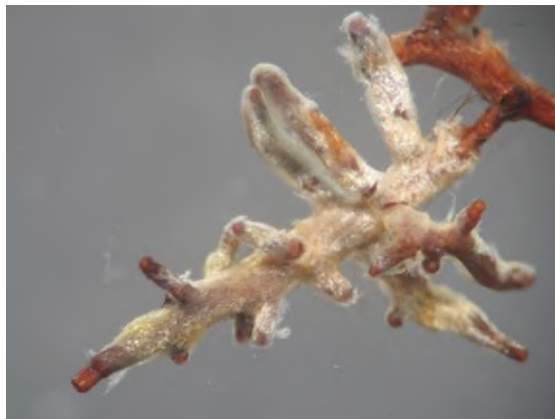
TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Boletaceae*
RODZAJ: *Xerocomus*



X. pruinatus

D Z

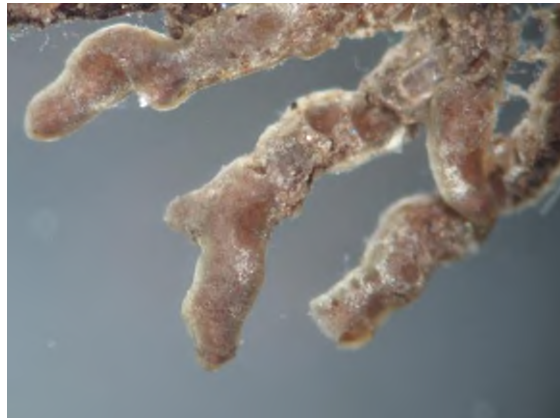
TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Boletaceae*



NM *Boletaceae*

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Boletaceae*
RODZAJ: *Xerocomus*



Xerocomus sp.

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Paxillaceae*
RODZAJ: *Melanogaster*



M. ambiguus

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Paxillaceae*
RODZAJ: *Paxillus*



P. involutus

T Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Sclerodermataceae*
RODZAJ: *Scleroderma*



S. verrucosum

S U Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Sclerodermataceae*
RODZAJ: *Scleroderma*



S. areolatum

M

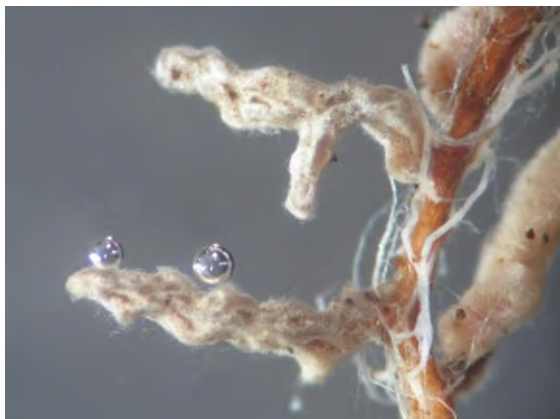
TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Cantharellales*
RODZINA: *Hydnaceae*
RODZAJ: *Hydnum*



H. rufescens

U

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Boletales*
RODZINA: *Sclerodermataceae*
RODZAJ: *Scleroderma*



S. citrinum

M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Pseudotomentella*



P. tristis

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Thelephora*



P. terrestris

U

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. italica

U

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. botryoides

U M

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. lapida

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. castanea

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. liliosingrisea

M

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. punicea

Z

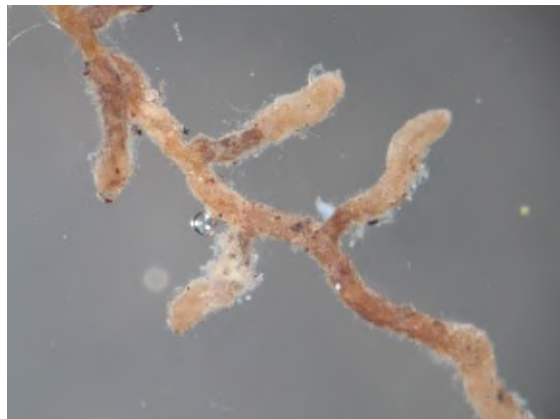
TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



Tomentella sp.3

M T

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



Tomentella sp.1

S

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. sublilacina

T Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



Tomentella sp.2

M D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentella*



T. stuposa

T Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*
RODZAJ: *Tomentellopsis*



T. submolis

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*



NM *Thelephoraceae* 3

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*



NM *Thelephoraceae* 1

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Lactarius*



L. camphoratus

M T D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Thelephorales*
RODZINA: *Thelephoraceae*



NM *Thelephoraceae* 2

D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Lactarius*



L. quietus

M T D Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Lactarius*



L. tabidus

M T D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



R. emetica

M

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



R. atropurpurea

D Z

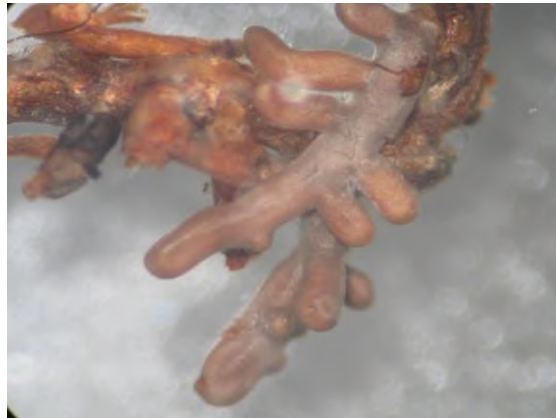
TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



R. fragilis

M T D Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



R. betularum

T D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



R. graveolens

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



R. ochroleuca

M T D

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russulas*



R. velenovskyi

U

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



Russula sp.1

M

TYP: *Zygomycota*

RODZAJ: *Mortierella*



Mortierella sp.

Z

TYP: *Basidiomycota*
RZĄD: *Russulales*
RODZINA: *Russulaceae*
RODZAJ: *Russula*



Russula sp.2

D Z



Un. Fungus

Z

Morfotypy nierozpoznane

