

INSTYTUT BADAWCZY LEŚNICTWA

Zakład Ochrony Lasu

„Zintegrowana ochrona szkólek przed nowymi, inwazyjnymi patogenami w warunkach ograniczonego wyboru fungicydów”

Sprawozdanie końcowe w temacie BLP 367

Okres realizacji: 21 luty 2011 - 31 marzec 2014

Kierownik projektu: dr hab. Tomasz Oszako

Współautorzy: dr hab. Dorota Hilszczańska, dr hab. Justyna Nowakowska, dr inż. Katarzyna Sikora, mgr inż. Hanna Szmidla, mgr inż. Miłosz Tkaczyk, mgr inż. Piotr Zajączkowski, prof. dr hab. Tadeusz Malewski (MiIZ PAN), dr inż. Adam Okorski (UWM), dr inż. Agnieszka Pszczółkowska (UWM), mgr inż. Jacek Olchowik (SGGW)

Wykonawcy: dr inż. Ireneusz Olejarski, dr inż. Józef Wójcik, dr Katarzyna Kubiak, mgr Teresa Stocka, mgr inż. Ewa Aniśko, mgr Małgorzata Borys, mgr inż. Zuzanna Cieśla, mgr inż. Halina Drózdź, mgr Paulina Drózdź, mgr inż. Sławomir Lipiński, Grażyna Kowalska, Hanna Przepiórkowska, Rafał Mitlejner, Andrzej Siwek, Grażyna Misiewicz, Jolanta Bieniek, Małgorzata Lissy, Danuta Smyklińska, Wanda Wiśniewska

Kierownik Zakładu

Dyrektor Instytutu

Sękocin Stary 2014

SPIS TREŚCI

1.	Wstęp i cel projektu	3
2.	Przegląd metod ochrony szkółek przed patogenami	6
2.1.	Metody biologiczne	6
2.2.	Metody chemiczne	22
3.	Działania z zakresu profilaktyki w ramach integrowanej ochrony roślin	34
3.1.	Ocena zagrożenia fitopatologicznego szkółek leśnych na podstawie badań ankietowych	34
3.2.	Wpływ płodozmianu na zdrowotność roślin – badania laboratoryjne	49
3.3.	Wpływ stymulatorów wzrostu oraz nawozów fosforynowych na odporność roślin na choroby grzybowe	59
3.3.1.	Rozwój sadzonek	59
3.3.2.	Analiza struktury mykoryz	95
3.3.3.	Analizy chemiczne gleb	115
4.	Identyfikacja oraz ocena szkód powodowanych przez wybrane patogeny	127
4.1.	Opracowanie starterów do reakcji PCR i molekularna analiza gleby pod kątem występowania najważniejszych rodzajów patogenów glebowych	127
4.2.	Ocena występowania patogenów z rodzaju <i>Phytophthora</i> i <i>Pythium</i> w szkółkach leśnych - analizy laboratoryjne	136
4.3.	Testy patogeniczności izolowanych organizmów wobec podstawowych gatunków lasotwórczych drzew	142
5.	Podsumowanie	156
6.	Bibliografia	160
	Załączniki	178
	Wytyczne postępowania ochronnego w szkółkach	192

ROZDZIAŁ 1. WSTĘP I CEL PROJEKTU

Integrowana ochrona roślin (ang. Integrated Pest Management, IPM) łączy różne metody ograniczania szkodliwych organizmów (bakterii, grzybów, lęgniowców, nicieni, owadów, zwierząt łownych, chwastów itp.) w celu utrzymania liczebności ich populacji na możliwie niskim poziomie. Wykorzystuje ona wszelkie dostępne metody ochrony roślin, preferując metody niechemiczne, w tym biologiczne, które w minimalny sposób oddziałują na zdrowie ludzi, zwierząt i środowisko.

Jedną z metod działania w ochronie biologicznej jest stworzenie optymalnych warunków dla rozwoju roślin i ochrona pożytecznych organizmów, naturalnie występujących w danym ekosystemie poprzez wprowadzanie wrogów naturalnych danych patogenów na uprawy np. w postaci biopreparatów. Zastosowanie stymulatorów wzrostu (nawozów na bazie fosforu, azotu lub potasu) podnoszących naturalną odporność roślin przeciw patogenom oraz poprawiającym parametry biometryczne sadzonek wpisuje się w zasady ochrony roślin promowane przez IPM. Kolejna z metod niechemicznych polega na wykorzystaniu odpowiednich zabiegów agrotechnicznych, takich jak właściwy dobór płodozmianu oraz hodowla gatunków lub odmian odpornych na patogeny.

Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin w IPM jest ograniczone do niezbędnego minimum i musi być poprzedzone procesem decyzyjnym, który pozwala na trafne i skuteczne dobranie rodzaju, dawki i terminu stosowania preparatu. Zgodnie z zasadami integrowanej ochrony roślin aktywna ochrona roślin przed chorobami może być podejmowana jedynie wtedy, gdy już występująca lub przewidywana choroba powoduje straty przekraczające próg ekonomiczny. Zagrożenie chorobowe powinno być zatem starannie monitorowane, a metody temu służące stale udoskonalane. Zastosowanie technik biologii molekularnej (analiz DNA) daje możliwość skutecznego zidentyfikowania patogena już na wczesnym etapie produkcji materiału szkółkarskiego, a także w drzewostanach.

Obowiązek stosowania zasad integrowanej ochrony roślin przez wszystkich profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin począwszy od dnia 1 stycznia 2014 r. wynika z postanowień art. 14 dyrektywy 2009/128/WE oraz rozporządzenia nr 1107/2009/WE. Jej idea polega na komplementarnym stosowaniu wielu (lub wszystkich) możliwych metod ochrony roślin. W związku z powyższym, w Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi opracowano projekt krajowego planu działania na rzecz ograniczania ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślin na lata 2013–2017. Z Dyrektywy

2009/128/WE z dnia 21.10.2009 Komisji Europejskiej oraz dokumentów z nią związanych wynika respektowanie „Dobrej praktyki ochrony roślin”, opracowanej przez EPPO, Europejską i Śródziemnomorską Organizację Ochrony Roślin. Według postanowień EPPO do najważniejszych zasad ochrony roślin należy przede wszystkim stosowanie metod profilaktycznych, hodowlanych, mechanicznych, biologicznych w pierwszej kolejności przy ograniczeniu do minimum stosowania chemicznych środków ochrony roślin. EPPO kładzie duży nacisk na bezpieczne i racjonalne stosowanie chemicznych środków ochrony roślin. Wydane w 1999 roku Zarządzenie 11A Dyrektora Generalnego Lasów Państwowych wskazuje na stosowanie metod nieinwazyjnych w przypadku prowadzenia metod ochronnych w PGL LP. Powyższe ograniczenia skłaniają do poszukiwania nowych, nieinwazyjnych technologii profilaktycznych lub ochronnych opartych na metodach biologicznych.

Obecnie, do ważniejszych chorób występujących w szkółkach leśnych należy zaliczyć zgorzele siewek oraz zgorzele korzeni pojawiające się na siewkach kilka tygodni po skielkowaniu. W niechronionych szkółkach leśnych, zgorzel siewek może spowodować straty sięgające nawet 80% całego materiału sadzeniowego (Mańka 1993). W 2013 roku zagrożenie od chorób zgorzelowych zanotowano na łącznej powierzchni 164,15 ha, co stanowiło spadek o 16% w stosunku do poprzedniego stanu wegetacyjnego. Choroby zgorzelowe wywoływane są przez kompleks patogenów grzybowych z rodzaju *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladium*, *Fusarium* i *Rhizoctonia*, występujące najczęściej w stadium konidialnym (Mittal i Wang 1993, Sutherland i in. 2002), a także lęgniowce: *Pythium* i *Phytophthora*, przenoszone przez zoospory, oospory oraz chlamydospory, zarówno w glebie, jak i z materiałem nasiennym (Lilja 1994). Ponieważ patogeny te należą do różnych grup systematycznych, ich reakcja na środki ochrony roślin jest wysoce zróżnicowana. W takiej sytuacji konieczne jest wykonanie kilku zabiegów ochronnych z zastosowaniem wielu preparatów chemicznych.

Wieloletnie użytkowanie wielkoobszarowych szkółek spowodowało znaczny spadek żyzności gleb oraz ich biologiczną degradację. Prace nad działaniami zmierzającymi do poprawy tej sytuacji, poprzez wykorzystanie metod biologicznych i technicznych do rewitalizacji gleb w szkółkach leśnych, prowadzone były w IBL wielokrotnie (Duda 1999, Duda i Łukaszewicz 2002, Dobrowolski i in. 2001). W doświadczeniach badano wpływ m.in. wermikompostu (in. biohumusu) oraz preparatu Antifung 20 SL (zawierającego 20% wyciąg biohumusu) na wzrost naturalnej odporności roślin na patogeniczne grzyby powodujące zgorzele siewek (Duda 1999). Wykazano, iż dodatek nawozów na bazie biohumusu wpłynął pozytywnie na zwiększenie wydajności siewu. Ponadto stosowanie zabiegów ochronnych

preparatem Antifung w momencie największego zagrożenia chorobowego ze strony grzybów, pozwoliło na uaktywnienie wielu gatunków antagonistycznych wobec patogenów. Pozytywnym rezultatem stosowania naturalnych nawozów na bazie biohumusu było zmniejszenie wypadów siewek oraz skrócenie czasu trwania i osłabienie intensywności chorób grzybowych w badanych szkółkach leśnych. Korzystne oddziaływanie nawozów naturalnych na zdrowotność siewek i sadzonek stwierdzono dopiero po kilku latach stosowania, jednakże zbyt długie dostarczanie składników odżywczych (szczególnie azotu i fosforu) może powodować obniżenie kondycji zdrowotnej mykoryz (Dobrowolski i in. 2001). Zastosowanie metod biologicznych, obejmujących płodozmian wraz z ugorze zielonym i czarnym, ma na celu ograniczenie występowania patogenów oraz odbudowę zbiorowisk korzystnych mikroorganizmów glebowych (Łukaszewicz i Duda 2002a, b). Zaobserwowano pozytywny wpływ stosowania niektórych roślin w ugorze zielonym na parametry biometryczne siewek sosny, stopień mykoryzacji korzeni oraz zwiększenie różnorodności zbiorowisk mikroorganizmów glebowych. Rola płodozmianów z zastosowaniem ugoru zielonego jak i czarnego, jako środka fitosanitarnego, stanowiącego alternatywę dla metod chemicznych została podkreślona również przez Gorzelaka i Łukaszewicza (1993).

Celem projektu było opracowanie metody podniesienia naturalnej odporności roślin na patogeny, jako elementu profilaktyki w integrowanej ochronie szkółek leśnych. Ponadto podjęto próbę udoskonalenia metod identyfikacji patogenów z wykorzystaniem analizy DNA w badaniach genetycznych.

ROZDZIAŁ 2. PRZEGLĄD METOD OCHRONY SZKÓŁEK PRZED PATOGENAMI

Zaprezentowane w rozdziale wyniki prac badawczych dotyczących wykorzystania czynników biologicznej ochrony w ograniczaniu występowania patogenów w szkółkach leśnych, drzewostanach oraz naturalnych ekosystemach wskazują na duży potencjał możliwości stosowania metod biologicznych w leśnictwie (Hill i in. 2007, Lefort i in. 2013, Reglinski i Dick 2005). Niniejszy rozdział zestawia również preparaty dopuszczone obecnie do stosowania w leśnictwie, pokazuje mechanizmy ich działania oraz obecną i potencjalną skuteczność wobec różnych grup patogenicznych organizmów, wraz z jednoczesną analizą możliwości występowania odporności grzybów na fungicydy (organizmy występujące w Polsce oraz blisko z nimi spokrewnione) (Głowacka i in. 2013).

Rozdział 2.1. Metody biologiczne

Zgodnie z zasadami integrowanej ochrony roślin promowane jest wykorzystywanie w leśnictwie alternatywnych metod ochrony roślin, do których zaliczana jest biologiczna ochrona.

Sformułowane przez Bakera i Cooka (1974) podstawy biologicznej ochrony roślin określiły jej zasady jako zwalczanie organizmów patogenicznych za pomocą innych organizmów żywych. Obecnie, pojęcie biologicznej ochrony roślin jest bardziej złożone i jest definiowane jako wykorzystanie biopestycydów czyli środków ochrony roślin zawierających czynnik (lub czynniki) pochodzenia biotycznego (Biological Control Agents-BCA), dla ograniczenia występowania patogenicznych organizmów za pośrednictwem jednego lub kilku mechanizmów działania. Wpływają one bezpośrednio lub pośrednio na patogeny lub na patogeny i rośliny. Biotyczne czynniki mikrobiologiczne to żywe organizmy: bakterie, grzyby i wirusy antagonistyczne w stosunku do patogenów lub indukujące mechanizmy obronne roślin (Cook 1993, Schouten i in. 2008). Mechanizm działania mikrobiologicznych BCA opiera się na wykorzystaniu ich zdolności konkurencyjnych (szybki wzrost, intensywne zarodnikowanie, duże zdolności adaptacyjne), które pozwalają na kolonizację niszy ekologicznej i ograniczenie liczebności populacji organizmów patogenicznych, zarówno w glebie jak i na roślinie. BCA, poza konkurencją o przestrzeń życiową, współzawodniczą z patogenami o składniki odżywcze, które znajdują się w glebie.

Bezpośrednie oddziaływanie BCA na patogeniczne mikroorganizmy polega na syntetyzowaniu enzymów litycznych oraz antybiotyków hamujących ich wzrost i rozwój,

a także na nawiązywaniu z patogenem bezpośredniego kontaktu pasożytniczego (nadpasożytnictwo) (Whipps, 2001). W relacjach z roślinami BCA indukują odporność poprzez aktywowanie mechanizmu SAR (Systemic Acquired Resistance) lub poprzez indukcję systemicznej odporności ISR (Induced Systemic Resistance). W tym pierwszym przypadku (SAR) wyzwalaczami reakcji odpornościowej roślin, w której pośredniczy kwas salicylowy, są zarówno czynniki biotyczne i abiotyczne (Salas-Marina i in. 2011). Indukcję systemicznej odporności ISR aktywują saprotroficzne grzyby i bakterie, cząsteczką sygnałową jest etylen, a kluczową rolę odgrywa kwas jasmonowy (JA) (Pieterse i in. 2001).

Skutkiem aktywacji odpowiedzi obronnej roślin jest akumulacja białek PR (Pathogenesis Related Proteins), fitoaleksyn (FA), chitynaz, glukanaz i peroksydaz oraz synteza związków fenolowych (Khan i in. 2004).

Najczęściej wykorzystywane w biologicznej ochronie grzyby należą do rodzajów: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Candida* i *Coniothyrium* (Fravel 2005). Grzybowe BCA tworzą wtórne metabolity o właściwościach antybiotycznych (Vinale i in. 2008), syntetyzują enzymy: chitynazy, celulazy, glukanazy i proteazy pozwalające na nawiązanie relacji mykopasożytniczej (Harman i in. 2004), oraz indukują w roślinach mechanizm SAR i ISR (Salas-Marina i in. 2011).

Bakterie zaliczane do czynników biologicznej ochrony należą do grupy PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), które poza antagonistycznymi oddziaływaniami na patogen wywierają korzystny wpływ na rośliny. Bakterie PGPR udostępniają roślinom trudnodostępne formy składników mineralnych oraz poprawiają strukturę gleby, produkują analogi roślinnych regulatorów wzrostu, a także wiążą toksyczne metale ciężkie (Gutierrez-Manero i in. 2001). Bakterie PGPR to przede wszystkim przedstawiciele rodzajów: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derris*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Zoogloea* (Singh i in. 2011). Bakterie z grupy PGPR wykazują silne właściwości konkurencyjne w stosunku do patogenów, produkują bowiem siderofory, syntetyzują antybiotyki oraz indukują odporność typu ISR (Figueiredo i in. 2010). Czynnikiem biologicznej ochrony są także bakterie mykofagiczne, które za pomocą aktywnych mechanizmów pasożytują na strzępkach grzybów (de Boer i in. 2005, Fritsche i in. 2006).

Niezwykle ważną grupę BCA stanowią promieniowce, które syntetyzują około 70-80% wszystkich znanych wtórnych metabolitów produkowanych przez mikroorganizmy

(Berdy 2005, Golińska i Dahm 2013). Największym potencjałem do zwalczania chorób roślin charakteryzują się przedstawiciele przynależący do rodzajów *Streptomyces* i *Micromonospora* (Lehr i in. 2008, El-Tarabily i in. 2010). *Actinomycetes* oddziałują na patogen poprzez produkcję antybiotyków, zewnątrzkomórkowych polisacharydów indukujących odpowiedź obronną roślin (*exopolysaccharides* - EPS), enzymów hydrolizujących ścianę komórkową grzybów: β -1,3-, β -1,4-, β -1,6-glukanaz, sideroforów i fitohormonów (Gohar i in. 2006, Khamna i in. 2009, Ma i Berkowitz 2007, Valois i in. 1996).

Grzyby mykoryzowe, jako czynniki biologicznej ochrony, pełnią istotną rolę w ochronie ekosystemów leśnych. Szacuje się, że około 5000-6000 gatunków grzybów może być zaangażowanych w ektomykorozy (Molina i in. 1992). Korzystny dla roślin efekt oddziaływania grzybów mykoryzowych polega na zwiększeniu zdolności systemu korzeniowego do absorpcji składników mineralnych i wody (Read i Perez-Moreno 2003), dlatego zaszczepianie grzybami mykoryzowymi sadzonek ze szkółek kontenerowych przed przenoszeniem do środowiska znacznie poprawia ich przeżywalność (Domenech i in. 2004). Istnieją doniesienia wskazujące, że grzyby mykoryzowe mogą zwiększać odporność roślin na infekcje wywołane przez patogeny glebowe (Azcón-Aguilar i Barea 1996; Graham 2001). Niektóre grzyby ektomykoryzowe produkują siderofory wiążące żelazo w glebie (Renshaw i in. 2002), zaś inne syntetyzują antybiotyki (Tsantrizos i in. 1991). Podstawowym mechanizmem oddziaływania tych grzybów na patogen jest konkurencja oraz tworzenie fizycznej bariery uniemożliwiającej infekcję (Graham 2001). Najważniejsze grzyby mykoryzowe wykorzystywane w biologicznej ochronie należą do rodzaju *Glomus*, są to gatunki: *Gigaspora margarita*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Sclerocystis dussi* (Kavatagi i Lakshman 2012, Kowalski i Wojnowski 2009, Ozgonen i in. 2009).

Kolejną grupą czynników biologicznej ochrony są związki chemiczne pochodzenia organicznego i nieorganicznego, które mogą być aplikowane do gleby oraz bezpośrednio na rośliny i nasiona w celu ograniczenia chorób wywołanych przez patogeny. Do grupy związków pochodzenia organicznego zalicza się ekstrakty roślinne, olejki eteryczne, glukozynolany i chitozan oraz syntetyczne związki: kwas salicylowy, ester S-metylowy kwasu benzo[1,2,3]tiadiazolo-7-karbotiowego (ASM), benzotiadiazol (BTH) i kwas β -aminomasłowy (BABA) (Alabouvette i in. 2006, Muthukumar i in. 2010, Oostendorp i in. 2001). Związki te działają hamująco na wzrost patogenów oraz podobnie jak mikroorganizmy antagonistyczne aktywują mechanizmy obronne roślin (Alabouvette i in. 2006).

Biologiczna ochrona w szkółkarstwie leśnym

Literatura dotycząca biologicznych metod ochrony roślin obejmuje opis wielu przykładów korzystnego zastosowania BCA w przypadku upraw rolniczych i ogrodniczych, zaś przykłady wykorzystania czynników biologicznej ochrony w ograniczaniu chorób występujących w szkółkach leśnych są nieliczne. Autorzy prac badawczych podają, że biologiczne ograniczanie chorób drzew jest bardzo trudne, co wynika ze specyfiki produkcji (Reglinski i Dick 2005, Hill i in. 2007). W Nowej Zelandii (gdzie szkółkarstwo kontenerowe dostarcza rocznie około 50 mln sadzonek), ważnym wsparciem produkcji jest wykorzystanie czynników biologicznej ochrony, co ma zapewnić ochronę przed chorobami oraz korzystnie wpływać na wzrost roślin (Hohmann i in. 2011). BCA w szkółkach leśnych można stosować na dwa sposoby: poprzez zaprawianie nasion oraz opryski (Hohmann i in. 2011). Na podkreślenie zasługuje fakt, iż zaprawianie nasion jest bardziej ekonomiczne (korzystne finansowo), a jednocześnie bardzo skuteczne w odniesieniu do chorób powodowanych przez grzyby związane ze środowiskiem glebowym (Mousseaux i in. 1998, Bell i in. 2000). Zdaniem Bent i in. (2001) bardzo istotnym elementem technologii produkcji szkółkarskiej jest inokulacja sadzonek drzew bakteriami z grupy PGPR, gdyż poprawia kondycję roślin oraz zwiększa zdolności adaptacyjne roślin po przesadzeniu. Zdaniem Reglinskiego i Dicka (2005) antagonistyczne mikroorganizmy, do których należą przedstawiciele rodzaju *Trichoderma*, mają duży potencjał w ograniczaniu patogenów w leśnictwie. Potwierdzeniem są wyniki badań uzyskane przez Hill i in. (2007), które wykazały, że stosowanie gatunków *Trichoderma* poprawiło stan zdrowotny sadzonek *Pinus radiata* w uprawie kontenerowej. W innych badaniach wykazano korzystny wpływ grzybów z rodzaju *Trichoderma* na różne rośliny drzewiaste (Paderes i in. 2005, Adams i in. 2007, Grodnitskaya i Sorokin 2007), zaś wykorzystany w badaniach Kelley (1976) gatunek *T. harzianum* ograniczał choroby zgorzelowe na sadzonkach *Pinus echinata*. Ten sam gatunek BCA zastosowany w szkółkach kontenerowych zmniejszył śmiertelność sadzonek daglezi na skutek infekcji roślin powodowanej przez *F. oxysporum* (Mousseaux i in. 1998). Kolejne badania wykonane przez Hill i in. (2007), dowiodły, że zarówno zaprawianie nasion, jak i opryski preparatami zawierającymi antagonistyczne szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma* poprawiły kiełkowanie nasion oraz stan zdrowotny sadzonek *P. radiata* w szkółkach kontenerowych.

Zdaniem Bent i in. (2001) optymalizacja stosowania mikroorganizmów w szkółkarstwie leśnym wymaga precyzyjnego poznania mechanizmów wpływu mikroorganizmów PGPR na rośliny oraz określenie warunków środowiskowych

wpływających na zasiedlenie niszy przez konkretne mikroorganizmy. Kelley (1976) wykazał, że przedstawiciel rodzaju *Trichoderma* nie był w stanie powstrzymać zgorzeli sadzonek *Pinus echinata* wywołanej przez *P. cinnamomi* w warunkach, gdy wilgotność gleby utrzymywała się blisko poziomu wysycenia. W innych pracach badawczych nie wykazano efektywnego oddziaływania grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz związków wapnia w ograniczaniu *Phytophthora*, jednakże autorzy podsumowując uzyskane przez siebie wyniki badań składowali, że zwalczanie *Phytophthora* wymaga integracji wszystkich dostępnych metod w tym metody biologicznej (Reglinski i in. 2008). Z pracami Reglińskiego korespondują wyniki uzyskane przez Minchin i in. (2012), którzy nie zaobserwowali korzystnego wpływu komercyjnego biopreparatu zawierającego *Trichoderma atroviride* (pięć izolatów) i *T. harzianum* (jeden izolat) na wzrost roślin. Autorzy wykazali brak negatywnego oddziaływania BCA na kolonizację sadzonek przez grzyby ektomykoryzowe *Pinus radiata* w szkółkach kontenerowych. Inne badania dotyczące łącznego stosowania bakterii *Paenibacillus polymyxa* oraz *P. fluorescens*, wykazały niekorzystny wpływ na wzrost i masę korzeni tworzonych przez *Pinus contorta*, w porównaniu do indywidualnego zastosowania BCA. Stwierdzono jednocześnie, że stopień kolonizacji ryzosfery przez bakterie nie koreluje z korzystnym oddziaływaniem bakterii na wzrost roślin (Bent i in. 2001). W badaniach wykonanych przez Hohmann i in. (2011) wykazano jednak zwiększenie wzrostu sadzonek w stosunku do kontroli na skutek wprowadzenia do hodowli kontenerowej izolatów grzybów z rodzaju *Trichoderma* pochodzących z rdzennych ekosystemów. Korzystny efekt rdzennych populacji mikroorganizmów BCA na stan zdrowotny sadzonek buka i dębu potwierdzają także najnowsze wyniki badania zaprezentowane przez Lefort i in. (2013), którzy wykazali znaczącą redukcję infekcji sadzonek powodowaną przez lęgniowce *P. cambivora* i *P. cinnamoni* w doświadczeniach *in vivo*.

Biologiczna ochrona chorób zgorzelowych powodowanych przez lęgniowce Oomycetes i grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Wiele zespołów badawczych koncentrowało swoje prace na badaniu wpływu mikroorganizmów antagonistycznych na patogeny wywołujące choroby zgorzelowe (*Oomycetes* oraz grzyby z rodzaju *Fusarium*) występujące w uprawach roślin rolniczych, ogrodnich oraz drzew leśnych. W większości dostępnych prac, w testach szalkowych badano aktywność mikroorganizmów antagonistycznych w stosunku do patogenicznych dla roślin grzybów i lęgniowców, które często stanowiły również wstęp do badań wazonowych, a w niektórych przypadkach dla polowych. Przykładem takich badań jest praca, w której Paul

i Sarma (2006), dokonali oceny efektywności szczepu IISR-6 *Pseudomonas fluorescens* o silnych właściwościach antybiotycznych (pyoluteorin, pyrrolnitrin, HCH), w kierunku zwalczania *P. capsici*. Autorzy wykazali silne (sięgające około 70%) zahamowanie wzrostu grzybni, redukcję produkcji sporangiów oraz kiełkowania zarodników. Inny czynnik biologicznej ochrony był przedmiotem badań grupy kierowanej przez Picard (Picard i in. 2000b). W przeprowadzonym teście szalkowym wykazano antagonistyczne działanie szczepu *Pythium oligandrum* (1010) na *P. parasitica*. Autorzy sugerują, że silne powinowactwo *Py. oligandrum* do komórek gospodarza wywołały bodźce chemiczne lub chemotropizm, a uszkodzenie komórek nastąpiło w wyniku syntezy enzymów hydrolitycznych: β -1,3-glukanazy oraz celulazy. Jednocześnie autorzy kontynuując prace badawcze wykazali, że wtórny metabolit syntetyzowany przez *Py. oligandrum* hamował występowanie objawów chorobowych wywołanych przez *P. parasitica* na roślinach pomidora. Zastosowanie oligandryny ograniczało liczbę chorych roślin wykazujących najpilniejsze objawy chorobowe (Picard i in. 2000b). Ta sama grupa badaczy w kolejnych analizach wykazała, że nanoszenie zarodników *Py. oligandrum* redukowało o około 60% występowanie objawów chorobowych na roślinach pomidora (Picard in. 2000a). Zdaniem autorów *Py. oligandrum* oddziałuje bezpośrednio na komórki patogenicznych grzybów, a oligandryna jest elicytorem reakcji obronnej roślin. Według autorów rośliny pomidora posiadają funkcjonalne receptory oligandryny pośredniczące w specyficznym szlaku sygnałowym prowadzącym do wystąpienia reakcji odpornościowej, przejawiającej się syntezą fitoleksyn oraz związków fenolowych (Picard i in. 2000a).

Przeanalizowane przez autorów niniejszej pracy dane literaturowe wskazują, że w biologicznej ochronie przed chorobami zgorzelowymi różnych roślin najczęściej stosowano bakterie i promieniowce o właściwościach antybiotycznych (30 na 47 prac).

Przykładem wykorzystania zjawiska antybiozy jest zastosowanie gatunku *Serratia plymuthica* (A21-4), w zwalczaniu *P. capsici* na roślinach pieprzu (*Capsicum annuum* L.) (Shen i in. 2005). Autorzy prowadząc badania w warunkach *in vitro* zaobserwowali hamowanie rozwoju zoosporangiów i zoospor przez szczep A21-4 syntetyzujący makrocykliczny lakton. Uzyskane w laboratorium wyniki zweryfikowano w doświadczeniach wazonowych i szklarniowych, w których stwierdzono wysoką skuteczność kolonizacji korzeni roślin przez szczep antagonisty. Populacja *S. plymuthica* stabilnie utrzymywała się w ryzosferze oraz na zaszczepianych i nowo wyrosłych korzeniach pieprzu. Miesiąc po przesadzeniu roślin do zainfekowanego przez *P. capsici* podłoża, porażenie na roślinach

kontrolnych sięgało 75%, natomiast rośliny po zastosowaniu biologicznej ochrony porażone były tylko w 12,6% (Shen i in. 2005). Zjawisko antybiozy było także przedmiotem badań Logeshwaran i in. (2011) w których wykazano, że antagonistyczne szczepy *Gluconacetobacter diazotrophicus* (L5 i PAL5), syntetyzujące wtórny metabolit o właściwościach antybiotycznych (pyoluteorin), hamowały wzrost grzybni *F. oxysporum* i *F. solani*. Odnotowano odpowiednio 53,49, 60,0% zahamowanie wzrostu grzybni wyżej wymienionych gatunków w przypadku szczepu PAL5 43,48 oraz 46,66% dla szczepu L5.

Należy jednak podkreślić, że znaczną część prac badawczych realizowanych przez różne zespoły, przeprowadzono jedynie w warunkach laboratoryjnych lub w doświadczeniach wazonowych, w których korzystano ze sterylnej gleby lub sztucznych podłoży (Chen i in. 1996, Gilbert i in. 1990, Jung i Kim 2005, Logeshwaran i in. 2011, Okamoto i in. 1998, Picard i in. 2000a,b, Smith i in. 1993, Timmusk i in. 2009). Nie zawsze efekt ochronny uzyskany w warunkach laboratoryjnych przekłada się na warunki *ex vitro*, czego przykładem są chociażby badania przeprowadzone przez Devaki i in. (1992). Badacze wykazali silny wpływ antagonistyczny szczepu *Trichoderma harzianum* syntetyzującego β -(1,3)-glukanazy na wzrost grzybni *Py. aphanidermatum* i *Py. myriotylum*. W testach szalkowych obserwowano autofluorescencję w rejonie interakcji grzybni BCA z fitopatogenem, co jednoznacznie wskazywało występowanie śmierci komórek. W przypadku doświadczeń wazonowych efektywność antagonisty potwierdzono jedynie w sterylnej glebie, natomiast efekt ochronny w glebie niesterylizowanej był nieznaczny (Devaki i in. 1992).

Różne zespoły badawcze przeprowadziły także szeroko zakrojone i wielowątkowe badania dotyczące wdrażania biologicznej ochrony w zwalczaniu różnych patogenicznych dla wielu roślin mikroorganizmów. Przykładem są wielotorowe prace dotyczące wykorzystania szczepu *Bacillus cereus* (UW85) (syntetyzujący zwittermicin A, kanosamine), do zwalczania gatunków należących do śluzorośli z rodzajów *Phytophthora* i *Pythium*: *Py. torulosum* (Shang i in. 1999), *Py. aphanidermatum* (Chen i in. 1996), *P. cactorum* (Gilbert i in. 1990), *P. parasitica* (Handelsman i in. 1990), *P. megasperma* f. sp. *megasperma* (Handelsman i in. 1990).

Pierwsze prace przeprowadzono w warunkach *in vitro*, w kierunku zwalczania *P. cactorum*, gdzie stwierdzono lizę zoospor pod wpływem antybiotycznych metabolitów szczepu UW85 (Gilbert i in. 1990). Badania kontynuowano z wykorzystaniem szybkiego testu śmiertelności siewek lucerny na *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* (Handelsman i in. 1990) oraz w warunkach kontrolowanych do ochrony tytoniu przed zgorzelą siewek

(*Py. torulosum*), w których wykazano całkowite zahamowanie rozwoju choroby (Shang i in. 1999).

Yuan i Crawford (1995) przeprowadzając testy antagonizmu na płytkach Petriego, wykazali zahamowanie wzrostu wybranych grzybów patogenicznych dla roślin w tym *Py. ultimum*, *Aphanomyces euteiches*, *F. oxysporum* i *R. solani* przez *Streptomyces lydicus* (WYEC108) (Yuan i Crawford 1995). Autorzy zaobserwowali zaburzenie wzrostu i lizę strzępek grzybni, a dzięki zastosowaniu techniki skaningowej mikroskopii elektronowej zniszczenie kielkujących oospor, jak również występowanie uszkodzeń ścian komórkowych grzybni *Py. ultimum*. Dalsze badania grupy badaczy (Yuan i Crawford 1995) obejmowały ochronę nasion grochu przed infekcją przedwzrostową (*Py. ultimum*). W wyniku zaszczepienia nasion szczepem WYEC108 stwierdzono porażenie na poziomie 40%, podczas gdy 100% nasion kontrolnych wykazywało objawy chorobowe. W badaniach stwierdzono także, że populacja *S. lydicus* stabilnie oraz na wysokim poziomie utrzymywała się zarówno w sterylnej, jak i nieodkażanej glebie, co skutkowało wysokim efektem ochronnym w ograniczeniu występowania zgorzeli siewek grochu i (Yuan i Crawford 1995).

W zwalczaniu chorób zgorzelowych wykorzystywano także mikroorganizmy indukujące mechanizmy obronne roślin, wykazujące także zdolności konkurencyjne w stosunku do patogenów. Przykładem takich zastosowań są badania Benhamou i in. (2000), w których oceniano przydatność bakterii *Serratia plymuthica* (szczep R1GC) w zwalczaniu zgorzeli siewek ogórka. Nasiona ogórka moczono w zawieszynie zawierającej komórki bakterii przez 24 godziny. Po pięciu dniach od momentu inokulacji roślin zarodnikami *Py. ultimum* występowało silne porażenie korzeni i więdnienie roślin w obiekcie kontrolnym. Rośliny chronione biologicznie nie były całkowicie wolne od objawów chorobowych, przy czym zmiany chorobowe występowały głównie na korzeniach bocznych (Benhamou i in. 2000). Zdaniem autorów uzyskane przez nich wyniki wskazują, że ograniczenie objawów chorobowych wynika nie tylko z ograniczenia tempa rozwoju patogenu i kolonizacji tkanek lecz także z indukcji barier strukturalnych i biochemicznych w roślinie gospodarzu. Taką koncepcję potwierdzają wyniki badań uzyskane przez van Peer i in. (2001), którzy wykazali zwiększoną akumulację fitoaleksyn występującą w korzeniach goździka traktowanych bakterią *Pseudomonas* na początku ataku wywołanego przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Indukcję mechanizmu obronnego roślin potwierdzono także w badaniach nad zwalczaniem fytoftorazy pieprzu poprzez wykorzystanie antagonistycznego gatunku *Paenibacillus illinoisensis* (KJA-424) (Jung i in. 2005). W doświadczeniu wazonowym

wykazano wysoką skuteczność zaszczepiania korzeni pieprzu szczepem KJA-424 i uzyskano zmniejszenie porażenia roślin gatunkiem *P. capsici* o około 84% w stosunku do wariantu kontrolnego (Jung i in. 2005). Podobnie badania nad wykorzystaniem mykoryzowego gatunku *Glomus mosseae* (BEG 12) w biologicznej ochronie pomidora przed *P. parasitica*, wykonane przez Cordier i in. (1998), wykazały że w mykoryzowanych roślinach aktywowany jest mechanizm ISR, czego konsekwencją jest wzrost stężenia związków fenolowych. W badaniach wykazano redukcję nekrozy korzeni na skutek zaszczepienia roślin grzybem mykoryzowym, przy czym efekt ochronny zależał od skuteczności mykoryzacji roślin (Cordier i in. 1998). Autorzy określili, że mykoryzacja roślin pomidora wywołała nie tylko miejscową reakcję w korzeniach roślin, lecz występowała w nich odporność układowa, a w komórkach objętych mykoryzą powstawała kaloza, co prowadziło do stworzenia bariery utrudniającej infekcję.

Mykoryzowe gatunki *Glomus macrocarpum* i *Glomus fasciculatum* wykorzystano do zwalczania fuzaryjnego wędnięcia pomidora (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (Kapoor 2008). W wazonowym doświadczeniu w mykoryzowanych roślinach pomidora określono ponad 2-krotny wzrost stężenia związków fenolowych, 6-krotny wzrost aktywności enzymu amoniakolizazy fenyloalaninowej (PAL) oraz ponad 18-krotny wzrost zawartości kwasu jasmonowego (JA) (w świeżej masie roślin) w stosunku do roślin kontrolnych. W badaniach uzyskano także wysoką efektywność biologicznej ochrony. Gatunki *G. macrocarpum* i *G. fasciculatum* ograniczyły występowanie objawów chorobowych na roślinach pomidora odpowiednio o 75% i 78%.

Obiecujące wyniki badań uzyskano także w oparciu o wykorzystanie ektomykoryzowego gatunku- lakówka pospolita (*Laccaria lacata*). Chakravarty i Hwang (1991) wykazali, że gatunek ten na tle innych grzybów ektomykoryzowych silnie hamował wzrost grzybni *F. oxysporum* na sadzonkach sosny banksa (*Pinus banksiana* Lamb.). Na skutek mykoryzacji roślin obserwowano w ryzosferze spadek liczby izolowanych kolonii grzybów z rodzaju *Fusarium*, a zastosowane w badaniach *in vitro* filtraty z kultur lakówki pospolitej silnie hamowały kiełkowanie zarodników oraz strzępek *Fusarium oxysporum*. Mykoryzowane sadzonki sosny charakteryzowały się wyższą zawartością związków fenolowych w stosunku do roślin kontrolnych, wskazując na aktywację mechanizmów obronnych (Chakravarty i Hwang 1991). Badania z zastosowaniem gatunku *L. lacata* kontynuowano w ochronie sosny pinia (*Pinus pinea* L.) przed zgorzelami siewek powodowanymi przez *F. oxysporum* i *F. verticillioides* (Machón i in. 2009). W doświadczeniu

założonym w doniczkach wypełnionych autoklawowanym podłożem torfowo-wermikulitowym nie stwierdzono istotnego wpływu gatunku antagonistycznego na przeżywalność roślin związaną z występowaniem zgorzeli przedwzrostowej. Nasilenie objawów zgorzeli powzrostowej uzależnione było od stopnia mykoryzacji sadzonek sosny (Machón i in. 2009). Inny gatunek ektomykoryzowy - krowiak podwinięty (*Paxillus involutus*) wykorzystano do zwalczania zgorzeli korzeni (*F. oxysporum*) sosny czerwonej (*Pinus resinosa* Ait.). Po 14 dniach od przeprowadzenia infekcji stwierdzono ograniczenie śmiertelności sadzonek sosny o 55% oraz redukcję zarodnikowania *F. oxysporum* o około 80% (Machón i in. 2009).

Zaprezentowane w powyższym podrozdziale wyniki badań dotyczących wykorzystania w biologicznej ochronie pojedynczych mikroorganizmów BCA uzyskano w wyniku badań laboratoryjnych oraz doświadczeń wazonowych i szklarniowych. Najczęściej wykorzystywano w nich sztuczne podłoża lub też sterylizowaną glebę. W takich warunkach introdukowane mikroorganizmy konkurowały jedynie z populacjami patogenów, którymi inokulowano rośliny, a uzyskana przez autorów wysoka i średnia efektywność zwalczania patogenów zgorzelowych jest niezwykle trudna do osiągnięcia w badaniach polowych. Powyższe stwierdzenie potwierdzają wyniki uzyskane przez Deberdt i in. (2008), którzy zastosowali szczep PR11 *Trichoderma asperellum* do zwalczania czarnej plamistości liści kakaowca (*P. megakarya*). W badaniach uzyskano statystycznie istotne, przeszło 20% ograniczenie występowania objawów chorobowych w stosunku do obiektu kontrolnego, jednakże znacznie wyższą efektywność uzyskano w przypadku zastosowania ochrony chemicznej, notując około 2% porażenie w latach badań.

Receptą na niską skuteczność preparatów biologicznych obserwowaną w warunkach produkcyjnych jest łączne stosowanie kilku kompatybilnych mikroorganizmów w jednym zabiegu lub w kolejnych zabiegach wykonywanych w różnych fazach rozwojowych roślin. Ze względu na fakt, że najczęściej stosowane w ochronie roślin czynniki biologicznej ochrony posiadają zdolność do syntezy wtórnych metabolitów o charakterze antybiotycznym, to w przypadku łącznego stosowania antagonistycznych mikroorganizmów konieczne jest wykonywanie testów zgodności w warunkach *in vitro*.

Przykładem skutecznego połączenia mikroorganizmów w zwalczaniu *P. parasitica* oraz grzybów z rodzaju *Fusarium* było zastosowanie bakterii o właściwościach antybiotycznych *Paenibacillus* sp. (B2) z gatunkiem mykoryzowym *G. mosseae*. W testach szalkowych potwierdzono, że bakteria nie wykazuje właściwości antagonistycznych wobec

G. mosseae, ale ogranicza wzrost patogenów chorobotwórczych dla roślin (Budi i in. 2000). W warunkach *in vitro* stwierdzono zahamowanie kiełkowania sporangiów, wzrostu strzępek *P. parasitica* oraz wzrostu grzybni *F. oxysporum* i *F. culmorum*. W doświadczeniu *in vivo* wykazano ograniczenie występowania objawów nekrozy na roślinach pomidora zarówno na skutek samodzielnego zastosowania i łącznego zastosowanie mikroorganizmów antagonistycznych. Jednak najsilniejsze zahamowanie występowania objawów chorobowych stwierdzono na skutek łącznego zastosowania mikroorganizmów BCA (63%) (Budi i in. 2000).

W innych badaniach wykazano skuteczność w łącznym stosowaniu gatunku ektomykoryzowego *Paxillus involutus* oraz szczepu bakterii o właściwościach antybiotycznych- *B. subtilis* (Hwang i in. 1995). W doświadczeniu *in vivo* przeprowadzonym w kolbkach Erlenmeyer'a zawierających sterylny wermikulit wykazano, że łączne zastosowanie antagonistów redukuje śmiertelność sadzonek sosny banksa (*P. banksiana*) na skutek infekcji przez *F. moniliforme* do poziomu 16%.

Wysoką skuteczność ochrony biologicznej odnotowano w wyniku wykorzystania dwóch organizmów antagonistycznych do zwalczania zgorzeli siewek ogórka (*P. ultimum*) (Roberts i in. 2005). W dwóch niezależnych eksperymentach badacze wykazali, że najlepsze rezultaty w ograniczeniu choroby uzyskano po zastosowaniu *T. virens* (GL21) oraz w przypadku połączenia *T. virens* (GL3) z *Burkholderia cepacia* (BC-1) (Roberts i in. 2005).

Istnieją także doniesienia o próbach łącznego zastosowania komercyjnych preparatów biologicznych w zwalczaniu chorób zgorzelowych. Ocenę efektywności pięciu komercyjnych preparatów biologicznych zawierających: *B. subtilis* GB03 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* QST 713, *S. lydicus* WYEC 108, *T. atroviride* CHS 861, *G. virens* GL-21 w zwalczaniu *P. ramorum* przeprowadziła grupa Elliott i in. (2009). Skuteczność badano w oparciu o testy antagonizmu oraz w doświadczeniach *in vivo*, w których wykorzystano liście roślin wrażliwych na infekcje (rózanecznik kaukaski, kamelia japońska). W testach szalkowych najskuteczniejszy w ograniczeniu wzrostu grzybni wszystkich szczepów *P. ramorum* okazał się preparat Plant Helper (*Trichoderma atroviride*) (100% zahamowanie wzrostu), jednak w doświadczeniach *in vivo* preparat ten nie był skuteczny. W tym wypadku najbardziej efektywne okazało się zastosowanie, charakteryzującego się średnią skutecznością w testach szalkowych preparatu Serenade (*Bacillus subtilis* QST 713). Zdaniem autorów brak zależności pomiędzy wynikami testów szalkowych oraz badań na liściach wyklucza stosowanie tych pierwszych jako wiarygodnej oceny preparatów biologicznych (Elliott i in. 2009). W testach antagonizmu poszczególnych BCA na siebie

autorzy wykazali, brak wzajemnego antagonizmu pomiędzy *T. atroviride* i *S. lydicus*, co pozwoliło na podjęcie próby wykorzystania dwóch preparatów łącznie. Jednak w wyniku łącznego stosowania mikroorganizmów nie uzyskano korzystniejszego efektu ochronnego w porównaniu do samodzielnego zastosowania BCA (Elliott i in. 2009).

Brak poprawy efektywności biologicznej ochrony w łącznym zastosowaniu antagonistów w porównaniu do mikroorganizmów zastosowanych samodzielnie zanotowano w przypadku zwalczania zgorzeli siewek buraka cukrowego (*Py. ultimum*) (Fukui i in. 1994), zaś badania de Boer i in. (2003) wskazują, że izolaty niekompatybilne w badaniach *in vitro* zastosowane łącznie dawały identyczne wyniki jak szczepy zastosowane samodzielnie (RS56 i RS111) (de Boer i in. 1999).

Nieliczne badania dotyczące łącznego zastosowania preparatów biologicznych przeprowadzono w warunkach polowych. Przykładem są badania Kim i in. (2008), w których do zwalczania *P. capsici* oraz innych gatunków patogennych dla pieprzu: *R. solani*, *F. oxysporum* i *F. solani*, wykorzystano bakterie antagonistyczne *S. plymuthica* (C-1), *Chromobacterium* sp. (C-61), *Lysobacter enzymogenes* C-3. W doświadczeniu wazonowym autorzy zauważyli, że spośród wymienionych bakterii zastosowanych samodzielnie najsilniejsze działanie antagonistyczne na *P. capsici* wykazywał szczep *S. plymuthica* (C-1), jednakże w zwalczaniu kompleksu grzybów BCA stosowane samodzielnie charakteryzowały się średnią efektywnością. Zastosowane szczepy w połączeniu ze sobą dawały wysoki efekt ochronny w zwalczaniu kompleksu patogenów w badaniach wazonowych, a uzyskane wyniki zostały także zweryfikowane w doświadczeniach polowych. Kombinację BCA zastosowano w trzech terminach, uzyskując w dwóch niezależnych doświadczeniach wysoką efektywność biologicznej ochrony (Kim i in. 2008).

Zwalczanie zgorzeli siewek buraka cukrowego (*Pythium*) z wykorzystaniem organizmów antagonistycznych: *Stenotrophomonas maltophilia* (W81) oraz *P. fluorescens* (F113Rif) przeprowadził zespół kierowany przez Dunne w warunkach polowych (Dunne i in. 1998). Autorzy wykazali, że zastosowanie łączne mikroorganizmów antagonistycznych spowodowało obniżenie poziomu infekcji roślin na poziomie identycznym z ochroną chemiczną (Dunne i in. 1998).

W badaniach Ezziyyani i in. (2007) zgorzel pieprzu (*P. capsici*) zwalczano za pomocą kombinacji dwóch zastosowanych łącznie mikroorganizmów antagonistycznych: *T. harzianum* (2413), *S. rochei* (467). Badania wskazały, że najniższe dawki *S. rochei* zastosowane samodzielnie nie spełniały funkcji ochronnych, wysokie powodowały

opóźnienie wstępowania objawów, a najwyższe obniżały śmiertelność roślin. Samodzielne zastosowanie gatunku *T. harzianum* nie poprawiało zdrowotności roślin pieprzu. Łączne zastosowanie mikroorganizmów powodowało obniżenie o 79,8 % objawów fytoftorazy w doświadczeniu wazonowym oraz o 74,8% w doświadczeniu polowym (Ezziyyani i in. 2007). Nieznaczne obniżenie efektywności ochrony biologicznej obserwowane w doświadczeniu polowym (w stosunku do wazonowego) badacze tłumaczyli faktem, że antagonistyczne BCA musiały konkurować z rdzennymi mikroorganizmami w naturalnej glebie, podczas gdy w wazonowym sterylnym podłożu taka konkurencja nie występowała.

Abo-Elyousr i in. (2009) do biologicznego zwalczania zgorzeli siewek bawełny powodowanej *P. debaryanum* i *F. oxysporum* wykorzystywali *T. hamatum* (AUSB-26328), *T. harzianum* (AUSB-26330), *Paecilomyces lilacinus* (AUSB-26336) oraz syntetyczne induktory odporności (RIs): Bion (BTH), kwas salicylowy (SA). W badaniach polowych najkorzystniejsze wyniki w ograniczaniu obu gatunków patogenicznych dla roślin: *P. debaryanum* i *F. oxysporum* uzyskano po zastosowaniu wariantu: *P. lilacinus*, *T. harzianum*, SA i Bion, gdzie odnotowano około 50% zmniejszenie indeksu chorobowego obu badanych patogenów na zainfekowanych roślinach (Abo-Elyousr i in. 2009).

Biologiczna ochrona przed chorobami stan obecny i perspektywy rozwoju

Stosowanie w krajach Unii Europejskiej biologicznych środków ochrony roślin regulowane jest Dyrektywą 91/414/EEC (EU 1991), Dyrektywami: 2001/36/EC (EU 2001) i 2005/25/EC (EU 2005) oraz Regulacją EC No. 1107/2009 (EU 2009). Komisja Europejska bardzo precyzyjnie określa zasady obowiązujące producentów przy rejestracji do użycia preparatów BCA. Poszczególne kraje członkowskie różnią się interpretacją przepisów prawnych, co skutkuje wydłużeniem procesu rejestracji, który jest różny w poszczególnych krajach członkowskich. Obecnie Polska jako jeden z sześciu krajów UE nie posiada szczegółowych uregulowań prawnych dotyczących stosowania i rejestracji środków biologicznej ochrony. Kosztowne procedury rejestracyjne oraz długi czas z nimi związany powoduje, że aktualnie w Europie dostępnych jest 16 biofungicydów (www.rebeca-net.de).

Komercyjne preparaty biologiczne dostępne na rynku zawierają pojedyncze szczepy mikroorganizmów antagonistycznych o bardzo specyficznym mechanizmie oddziaływania na patogeny, które dodatkowo stosowane są najczęściej interwencyjnie w odniesieniu do określonej fazy cyklu życiowego czynnika chorobotwórczego (Junaid i in. 2013, www.rebeca-net.de). Większość gatunków grzybów glebowych uważana jest za gatunki kosmopolityczne, co oznacza, że z łatwością mogą przenosić się do innych środowisk (Gams

2007). Analizy porównawcze populacji grzybów glebowych prowadzone w różnych szerokościach geograficznych wskazują, że zarówno liczba, jak i skład jakościowy taksonów grzybów glebowych izolowanych z różnych środowisk są podobne (Hawksworth 2001), dlatego zdaniem Bae i in. (2011) gatunki BCA można stosować w innych warunkach środowiskowych.

Podstawową kwestią, którą należy rozważyć w odniesieniu do ochrony biologicznej jest uzyskanie zadowalającej skuteczności biopreparatów i powtarzalności wyników w glebie i na roślinach w warunkach produkcyjnych. Aby uzyskać dobry efekt przede wszystkim czynniki biologiczne muszą skutecznie skolonizować tkanki roślin. Wzajemne interakcje dotyczą głównie konkurencji o przestrzeń życiową i składniki pokarmowe. Wykształciły się one na drodze koewolucji w glebie i na roślinach, gdzie współzawodnictwo pomiędzy mikroorganizmami nie opiera się wyłącznie na szybkości kolonizacji (tempie wzrostu, szybkości cyklu życiowego, zdolnościach adaptacyjnych czy potencjale rozmnożeniowym), lecz dotyczy dynamicznej rywalizacji pomiędzy mikroorganizmami z wykorzystaniem wszelkich dostępnych środków obrony i agresji. Mikroorganizmy bytujące w określonej niszy ekologicznej wykształciły różne strategie umożliwiające im pokonanie konkurencji. Należy do nich zaliczyć: detoksyfikację wtórnych metabolitów innych mikroorganizmów, represję genów odpowiadających za syntezę metabolitów, syntezę antybiotyków szkodliwych dla konkurencyjnych organizmów oraz występowanie odporności na antybiotyki syntetyzowane przez inne mikroorganizmy (Duffy i in. 2003). Wymienione powyżej oddziaływania mogą przekładać się na mniejszą skuteczność biologicznej ochrony w naturalnych ekosystemach, dodatkowo na wzajemne relacje pomiędzy mikroorganizmami wpływa wiele czynników nie podlegających kontroli, decydujących o skuteczności zabiegów ochronnych, takich jak: warunki środowiskowe: temperatura, opady, pH gleby, obecność czynników hamujących wzrost, skład gatunkowy mikroorganizmów w określonej niszy (Benhamou 2004). Z tego powodu, badania dotyczące stosowania BCA w warunkach *in vitro* nie znajdują pełnego odniesienia (liniowej zależności) do wyników uzyskiwanych w warunkach *in vivo* (Elliot i in. 2009). Modele matematyczne zastosowane do analizy przebiegu choroby z uwzględnieniem mechanizmów biologicznej ochrony wykazały, że efektywność BCA uzależniona jest od stopnia kolonizacji tkanek roślinnych lub gleby oraz czasu aktywności BCA (Jeger i in. 2009), zaś badania Zeng i in. (2012) udowodniły że skuteczność stosowania biologicznej ochrony uzależniona jest od stabilnego utrzymywania się populacji BCA introdukowanych do środowiska. Wobec powyższego można wnioskować, że skuteczność BCA nie zależy od

krótkotrwałego oddziaływania mikroorganizmów antagonistycznych, a przełamanie mechanizmu obrony patogenów nie gwarantuje uzyskanie satysfakcjonującego efektu ochronnego. Z tego też powodu efektywność biologicznej ochrony w uprawach polowych jest ograniczona, a największe sukcesy z wykorzystaniem BCA uzyskuje się w uprawach szklarniowych (Paulitz i Belanger 2001). Obserwowana w niektórych doświadczeniach polowych niewielka skuteczność biologicznej ochrony roślin może wynikać także z wykorzystania organizmów antagonistycznych o wąskim mechanizmie oddziaływania na patogeny, dlatego zawsze wskazane jest stosowanie mikroorganizmów o szerokim wachlarzu zdolnościach antagonistycznych (Cook 1993). Wyspecjalizowany mechanizm oddziaływania na patogeniczne mikroorganizmy, oznacza bardzo małe prawdopodobieństwo zmiany zakresu żywicielskiego, przykładem może być nadpasożytniczy gatunek *Ampelomyces quisqualis* – pasożytujący wyłącznie na grzybach powodujących mączniaki prawdziwe (Angeli i in. 2012). Zdaniem niektórych badaczy wysoka specjalizacja żywicielska może być skorelowana z ewolucyjną labilnością (Parker i Gilbert 2004), zaś Heydari i Pessarakli (2010) twierdzą, że organizmy nadpasożytnicze wprowadzane do środowiska najczęściej nie zapewniają skutecznej ochrony, wykazują bowiem agresywne zachowania wobec innych organizmów jedynie w warunkach ograniczonej dostępności składników odżywczych.

Zastosowanie BCA oddziałujących wyłącznie na określony patogen często nie wpływa na inne organizmy zasiedlające niszę, co często prowadzi do kolonizacji roślin przez inne organizmy patogeniczne. Takie zjawisko ma ogromne znaczenie w przypadku patogenów odglebowych, dających podobne lub identyczne objawy chorobowe na roślinach. W takim wypadku brak precyzyjnych procedur diagnostycznych stosowanych w szkółkarstwie leśnym nie daje odpowiedzi dotyczącej skutecznego zwalczania określonego organizmu, jednocześnie nie można w takim wypadku mówić o skutecznym ograniczaniu chorób, kiedy roślina zostaje skolonizowana przez inne organizmy patogeniczne. Dodatkowym utrudnieniem są liczne formy przetrwalnikowe oraz zarodniki tworzone przez mikroorganizmy patogeniczne, które zostają rozproszone w wodach gruntowych i glebie. W sytuacji silnej konkurencji pomiędzy mikroorganizmami formy te umożliwiają przetrwanie gatunku, zaś w takim wypadku wielkość populacji grzybów i bakterii nadpasożytniczych wprowadzanych do ekosystemu będzie podlegała redukcji (Lourenco i in. 2006). Reasumując należy podkreślić, że w porównaniu do chemicznych metod stosowanie biologicznej ochrony roślin jest bardzo trudne, wymaga bowiem opracowania bardzo precyzyjnych procedur stosowania BCA w odniesieniu do konkretnych patogenów i gatunków roślin, oraz

znajomości biologii zarówno organizmów zwalczanych jak i czynników biologicznej ochrony. W związku z tym faktem należy poszukiwać nowych mikroorganizmów o właściwościach antagonistycznych w stosunku do patogenów, by powiększyć arsenał środków BCA, z drugiej skoncentrować się na wykorzystaniu lokalnych szczepów posiadających najkorzystniejsze właściwości umożliwiające ich stosowanie w określonych siedliskach. Tworzenie takich biopreparatów jest oczywiście niezwykle trudne, jednak poniesiony w tym zakresie wysiłek badawczy rekompensowany będzie z jednej strony poprawą skuteczności biopreparatów z drugiej uniknie się wątpliwości dotyczących introdukcji do środowiska mikroorganizmów pochodzących z odległych części świata. Receptą na poprawę skuteczności BCA jest łączne stosowanie synergicznie działających czynników biologicznej ochrony, co poprawia zarówno efekt ochronny, jak również umożliwia zwalczanie większej liczby patogenów (Dunne i in. 1998, Jetiyanon i Kloepper 2002). W literaturze funkcjonuje wiele doniesień o stosowaniu kilku kompatybilnych pod względem mechanizmu działania BCA. Wątpliwości jednak budzić może wzajemne ich oddziaływanie w środowisku. Równoczesne lub stosowane w krótkich odstępach czasu populacje BCA mogą ze sobą konkurować (Xu i in. 2011), dlatego też łączne stosowanie kilku BCA może dawać korzystny, neutralny lub niekorzystny efekt ochronny. Efekt ten zależy od organizmu zwalczanego, wielkości jego populacji oraz doboru konkretnych BCA (Ezziyyani i in. 2007, Kessel i in. 2002, Lourenco i in. 2006, Xu i in. 2010). Xu i in. (2011) analizując model aktywność BCA o różnych mechanizmach oddziaływania na patogen doszli do wniosku, że bardziej skuteczne w ograniczaniu chorób roślin jest stosowanie pojedynczych BCA o wielopunktowym mechanizmie oddziaływania na patogen, niż kombinacji kilku BCA o różnych lecz jednopunktowych zdolnościach antagonistycznych. Jednocześnie Xu i in. (2011) nie wykluczają wzrostu efektywności łącznie stosowanych BCA, przy czym podkreślają, że synergiczne oddziaływanie warunkowane jest przez wzajemną kompatybilność mikroorganizmów, która musi zostać potwierdzona w wykonanych wcześniej analizach laboratoryjnych. Powyższe założenie potwierdzają najnowsze wyniki zaprezentowane przez Xu i Jeger (2013), w których wykazano, że łączne stosowanie BCA o zdolnościach konkurencyjnych i nadpasożytniczych skutkowało opóźnieniem rozwoju epidemii.

Bardzo korzystne wydaje się wprowadzenie do tego układu mikroorganizmów stymulujących reakcję obronną roślin (SAR, ISR) prewencyjnie, czyli przed terminem największej wrażliwości roślin lub największej aktywności patogenu. Oczywiście wymaga to

wnikliwych badań określających zasady łącznego stosowania określonych BCA w odniesieniu do konkretnego patogenu, rośliny i siedliska. Skuteczne w ograniczaniu łęgniowców *Oomycetes* jest łączenie czynników biologicznej ochrony z klasycznymi środkami ochrony roślin (Silva i in. 2004) oraz połączenie stosowania BCA z syntetycznymi induktorami odporności (*Resistance inducers* - *RI*s) (Abo-Elyousr i in. 2009). Dla rozwoju biologicznych metod ochrony w szkółkarstwie leśnym ważne jest wykorzystanie grzybów mykoryzowych poprawiających wzrost roślin, a jednocześnie będących antagonistami patogenicznych grzybów (Pozo i in. 1999). Co jest korzystne ze względu na brak ujemnego wpływu na środowisko oraz ze względów ekonomicznych (Harrier i Watson 2004). Poprawę efektywności grzybowych preparatów biologicznych można uzyskać poprzez wzbogacenie ich receptury w sole wapnia (CaCO_3), co wzmacnia sporulację grzybów oraz zwiększa syntezę enzymów (Saxena i in. 2001, Wuyep i in. 2003). Wapń w biopreparatach poprawia ich jakość i aktywność antagonistów po aplikacji biofungicydu (Spadaro i Gullino 2004). W badaniach Sugimoto i in. (2008) wykazano, że jony wapnia wpływały ograniczająco na wzrost grzybni i uwalnianie zoospor *P. sojae*, a więc wzbogacanie preparatów BCA dedykowanych do zwalczania łęgniowców z rodzaju *Phytophthora* jest celowe. Taką tezę potwierdzają również prace von Broembsen i Deacon (1997), którzy wykazali efektywność CaCl_2 i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ w ograniczaniu *P. parasitica* oraz badania dotyczące zastosowania jonów Ca^{2+} w ochronie *Quercus ilex* przed *P. cinnamomi* (Serrano i in. 2012).

Rozdział 2.2. Metody chemiczne

Specyfika szkółkarstwa leśnego sprawia, że ryzyko występowania groźnych dla sadzonek patogenów grzybowych jest bardzo wysokie, jednocześnie ze względu na znikomy wachlarz uprawianych gatunków roślin może dochodzić do nagromadzenia się w glebach czynników chorobotwórczych, zaś ograniczony zasób środków ochrony roślin rekomendowanych do stosowania w szkółkach leśnych powoduje, że zabiegi fungicydowe okazują się często nieskuteczne. Z tego względu w produkcji szkółkarskiej stosuje się najczęściej zabiegi fungicydowe interwencyjnie z wykorzystaniem zaledwie kilku substancji aktywnych stosowanych od wielu lat. Dodatkowo konieczność powtarzania zabiegów na tych samych kwaterach szkółek leśnych substancjami aktywnymi z tej samej grupy lub o identycznym mechanizmie oddziaływania na komórki grzybów selekcjonuje rasy patogenów odpornych na działanie preparatów.

Ditiokarbaminiany np. Penncozeb 80 WP

W szkółkarstwie leśnym stosuje się przede wszystkim preparaty zawierające ditiokarbaminiany, oddziałujące na komórki grzyba poprzez zakłócenie różnych procesów metabolicznych, którego efektem jest zahamowanie kiełkowania zarodników (Wong i Wilcox 2001).

Mankozeb należący do ditiokarbaminianów sam w sobie nie wykazuje działania grzybobójczego, ale może być skuteczny jako pre-fungicyd, gdyż w kontakcie z wodą rozkłada się, uwalniając siarczek bis-izotiocyanianu etylenu (EBIS). Związek ten jest następnie pod wpływem promieniowania UV przekształcany do bis-izotiocyanianu etylenu (EBI). Oba te związki uważane są za toksyczne i oddziałują z grupami sulfhydrylowymi enzymów. Reakcje te zaburzają podstawowe procesy enzymatyczne i prowadzą do śmierci komórek. Przypuszcza się również, że związki te interferują z sześcioma różnymi procesami biochemicznymi zachodzącymi w cytoplazmie i mitochondriach komórek grzybów (Gulliano i in. 2010).

Mechanizm działania ditiokarbaminianów jest wielopunktowy co sprawia, że jest on niezwykle korzystny z punktu widzenia praktyki, ponieważ znacznie redukuje możliwość wystąpienia u grzybów odporności warunkowanej mutacją pojedynczych genów. W takim wypadku u grzybów może jedynie występować tzw. odporność poligenowa wywołana mutacjami w kilku genach, co może uruchomić mechanizmy detoksyfikacji substancji aktywnej i doprowadzić do występowania odporności krzyżowej (Gulliano i in. 2010).

Efekt ochronny tej grupy preparatów nie jest jednak doskonały, ponieważ są to substancje kontaktowe, ich działanie jest doraźne. Chociaż preparaty należące do tej grupy uzyskały na świecie sukces komercyjny, ze względu na szeroki zakres skuteczności w zwalczaniu wielu grup patogenów (*Ascomycetes*, *Oomycetes*, *Basidiomycetes* oraz *Deuteromycetes*), to jednak ich skuteczność jest wysoka wyłącznie we wczesnych fazach infekcji.

Amidy kwasu karboksylowego (CCA) np. Acrobat MZ 69 WG

Preparaty należące do grupy CCA (amidy kwasu karboksylowego), do których zalicza się dimetomorf, zostały wprowadzone do użycia na początku lat osiemdziesiątych.

Środki te są skuteczne w zwalczaniu *Oomycetes* z rodzin *Peronosporaceae* (takich jak *Plasmopara viticola* i *Bremia lactuceae*) oraz *Pythiaceae* (rodzaj *Phytophthora*, lecz nie *Pythium*) (Gisi i in. 2007). Ich działanie polega na zakłóceniu biosyntezy fosfolipidów

w komórkach grzyba, co wpływa niekorzystnie na proces tworzenia ściany komórkowej. Preparaty te hamują także wszystkie procesy związane z rozmnażaniem bezpłciowym grzybów, lecz nie wpływają na rozwój i mobilność zoospor (Wang i in. 2009).

W warunkach laboratoryjnych badając aktywność dimetomorfu stwierdzono umiarkowaną odporność szczepów *Phytophthora capsici* (Young i in. 2001). W Rosji odporne szczepy *Phytophthora infestans* (gatunku pokrewnego dla najważniejszych patogenów zgorzelowych występujących w Polsce) powstały w skutek częstego powtarzania zabiegów z wykorzystaniem dimetomorfu jako substancji aktywnej (Dereviagina i in. 1999). Na stronie internetowej (www.frac.info) organizacji FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) zrzeszającej badaczy z całego świata zajmujących się zjawiskiem odporności grzybów na fungicydy podano informację, że szczepy *P. infestans* są wrażliwe na preparaty CCA co jest bardzo istotne dla leśników i szkółkarzy (Moore i in. 2008).

Jednak inny gatunek grzyba *Plasmopara viticola* okazał się całkowicie odporny na wszystkie substancje aktywne z grupy CCA (Moore i in. 2008). Sytuacja ta jest o tyle interesująca, że do przełamania odporności doszło na skutek częstego powtarzania zabiegów ochronnych, co stwarza realną możliwość wystąpienia tego zjawiska w przypadku innych grzybów. Odporność na CAA zidentyfikowana w warunkach laboratoryjnych u *P. viticola* jest dziedziczona recesywnie (Blum i in. 2010), zaś w przypadku *P. capsici* warunkowana przez dwa geny dominujące (Meng i in. 2011). Najnowsze badania przeprowadzone przez Chen i in. (2012) pozwoliły na zidentyfikowanie w obrębie genomu *P. melonis* mutacji związanej z odpornością na preparaty CAA w obrębie genu *CesA3* kodującego polipeptyd zbudowany z 1139 aminokwasów o masie molekularnej 126,5 kDa. Porównanie sekwencji aminokwasowych izolatów wrażliwych i odpornych na CCA, udowodniło powstanie mutacji w kodonie 1109 powodującą zamianę aminokwasów: waliny na leucynę (Chen i in. 2012). Zdaniem autorów odporność na CAA izolatów *P. melonis* może być kontrolowana przez gen(-y) recesywny(-e), jednak potwierdzenie tej tezy wymaga dalszych eksperymentów genetycznych (Chen i in. 2012).

Podsumowując ryzyko występowania powszechnej odporności na substancje aktywne z grupy CAA lęgnowców *Oomycetes* na dużą skalę należy uznać za niewielkie, a dodatkowo można je jeszcze zmniejszyć poprzez zaprzestanie powtarzania zabiegów ochronnych w niewielkich odstępach czasu.

Karbaminiany np. Previcur Energy 840 SL

Karbaminiany są przeznaczone do zwalczania *Pythium*, *Phytophthora*, *Aphanomyces* oraz niektórych grzybów z rodzaju *Fusarium*, czyli patogenów powodujących choroby zgorzelowe wielu gatunków roślin (Cohen i Coffey 1986, Englander i in. 1980, Rapp i Richter 1983). Mechanizm działania propamokarbu, substancji aktywnej z tej grupy, polega na zakłóceniu przepuszczalności błon komórkowych młodej grzybni, jednak zarówno w odniesieniu do starszej grzybni, jak i kielkujących zarodników sporangialnych jego działanie jest mało skuteczne (Papavizas i in. 1978). W związku z tym działanie propamokarbu na roślinach silnie porażonych przez *P. infestans* jest niewidoczne (Samoucha i Cohen 1990). Wyniki badań Hu i Hong (2007) wskazują, że w produkcji szkółkarskiej preparat należy stosować prewencyjnie przed zakażeniem siewek zarodnikami pływkowymi (zoosporami). Propamokarb może spowalniać proces chorobowy poprzez inhibicję produkcji zarodni (sporangów) oraz ograniczenie aktywności zoospor. Natomiast po wystąpieniu infekcji efekt działania fungicydu zanika, dlatego wykonywanie zabiegów w takim przypadku jest niewskazane, jednocześnie wzrasta wówczas ryzyko uzyskania przez gatunek *Phytophthora* odporności. Prokamokarb nie wykazuje szkodliwego działania na korzystne dla roślin mikroorganizmy, co zostało wykazane w odniesieniu do *Trichoderma* i grzybów mykoryzowych (May i Kimati 2000, Wilde 1990). Z tego właśnie powodu preparat powinien być wykorzystywany w programach integrowanej ochrony przed chorobami zgorzelowymi w szkółkarstwie leśnym.

Fosfoniany np. Previcur Energy 840 SL

Systemiczne preparaty z grupy fosfonianów (fosetyl glinu i potasu, sole kwasu fosforowego) należą do najważniejszych środków przeznaczonych do ograniczania chorób powodowanych przez organizmy grzybopodobne *Oomycetes*, szczególnie z rodzaju *Phytophthora*. Fosfoniany stosowane szeroko zarówno w rolnictwie, ogrodnictwie, leśnictwie, jak również w środowisku naturalnym (Guest i Grant, 1991, Daniel i in. 2005). Stosuje się je w Afryce, Azji, Australii, Europie i Ameryce Północnej w celu ochrony rzadkich i zagrożonych gatunków roślin oraz w ochronie roślin uprawnych. Związki te w postaci oprysku roztworu wodnego (ze środkiem zwilżającym) wykorzystuje się także w ochronie drzew, lub wstrzykuje się je bezpośrednio do pni, gdzie są one przemieszczane w tkankach roślinnych za pośrednictwem szlaku fosforanowego (Guest i Grant, 1991). Fosfoniany nie są metabolizowane przez roślinę, co powoduje że utrzymują się w tkankach przez znaczny okres czasu (6-8 lat), co ściśle uzależnione jest od gatunku rośliny, jej

szybkości wzrostu oraz szybkości tracenia liści (Hardy i in. 2001). Związki te posiadają dwa odmienne mechanizmy działania na patogen, zależne od dawki substancji aktywnej (Smillie i in. 1989). Wysokie stężenia ograniczają wzrost i zarodnikowanie patogenów (Wilkinson i in. 2001, Garbelotto i in. 2009), zaś niskie mogą działać pośrednio przez stymulowanie reakcji obronnych roślin. Biorąc jednak pod uwagę, że stężenia fosfonianów w tkankach roślinnych rzadko uzyskują koncentracje, które działały fungistatycznie w warunkach *in vitro*, to stymulacja mechanizmów obronnych wydaje się mieć większe znaczenie.

Od dawna obserwowano, że działanie fosfonianów może być inne w stosunku do różnych roślin gospodarzy, a jedna z hipotez głosi, że związki te pobudzają przede wszystkim mechanizmy obronne organizmu (Grant i in. 1990, Daniel i Guest 2005). Fosetyl-Al opisywany jest w literaturze jako elitor mechanizmu obronnego roślin, a jego działanie powoduje wzmożoną syntezę związków fenolowych w liściach. Dercks i Creasy (1989) podają, że aktywność związku w zwalczaniu *P. viticola* była wysoka zarówno w fazie przedinfekcyjnej, jak również po infekcji. Porównanie aktywności fosetylu-Al w zwalczaniu mączniaka rzekomego winorośli na odmianach zróżnicowanych pod względem odporności wykazało, że reakcja obronna roślin była bezpośrednio związana ze zdolnością syntetyzowania fitoaleksyn przez roślinę. Najbardziej odporna odmiana winorośli dodatkowo silniej akumulowała w tkankach resweratrol, co wywierało bardzo silną presję na grzyba. Badania Dercks i Creasa (1989) wykazały także bardzo silną korelację odporności roślin z poziomem akumulacji resweratrolu. Istnieją także dowody na to, że mechanizm obronny roślin może być stymulowany poprzez zmiany w metabolizmie patogena. Badania Grant i in. (1990) wykazały, że niskie stężenia fosfonianów mogą modyfikować metabolizm gatunków *Phytophthora* bez widocznego wpływu na wzrost grzybni. Guest i Grant (1991) wysunęli hipotezę, że preparaty fosfonianowe mogą oddziaływać na patogen poprzez zakłócenie syntezy jego supresorów, czyli związków „oszukujących” system obronny roślin. Bardzo interesujące z punktu widzenia praktyki były badania przeprowadzone przez Pilbeam i in. (2011), które potwierdziły różne reakcje na stosowanie fosfonianów u odpornych i podatnych linii eukaliptusa na infekcję wywołaną przez *P. cinnamomi*. Fosfoniany powodowały zróżnicowaną odpowiedź histopatologiczną w tkankach roślin eukaliptusa. W liniach odpornych następowała stymulacja mitozy, powstawanie tkanki przyrannej (kalusa) i synteza ligniny, z kolei linie wrażliwe zwiększały produkcję ligniny i suberyny (Pilbeam i in. 2011).

Ryzyko występowania odporności patogennych lęgniowców *Oomycetes* na preparaty fosfonianowe ze względu na bardzo złożony niespecyficzny mechanizm oddziaływania

ochronnego oceniane jest jako niewielkie, jednak istnieją doniesienia o zmniejszonej wrażliwości izolatów *P. cinnamomi* (Dobrowolski i in. 2008) i *Bremia lactucae* (Brown i in. 2004).

Morfoliny np. Falcon 460 EC

Spiroksamina należy do preparatów morfolinowych - ważnej grupy fungicydów o zakresie stosowania ukierunkowanym na mączniaki prawdziwe, rdze i parcha (Pommer 1995). Wykazuje ona identyczny sposób oddziaływania na komórki grzyba jak inne substancje aktywne z tej grupy (fenpropimorf, fenpropidyna, tridemorf), miejscowo-specyficznie hamujące biosyntezę steroli (SBI klasy II) (Leroux i in. 1999). Sterole są podstawowym składnikiem wszystkich błon komórkowych organizmów eukariotycznych, a ich występowanie jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju (Joffrion i Cushion 2010). Sterole w komórkach grzybów pełnią kilka funkcji: odpowiadają za płynność i przepuszczalność błon komórkowych (Bard i in. 1978, Lees i in. 1979) oraz regulują enzymy z nimi związane (Cobon i Haslam 1973). Morfoliny wpływają w różnym stopniu na dwa specyficzne punkty w szlaku biosyntezy steroli, hamując przemianę dimetyloergostatrienu do dimetyloergostadienu przez blokowanie Δ^{14} -reduktazy oraz fękostierolu do episterolu, przez zakłócenie działania $\Delta^{8,7}$ -izomerazy (Kerkenaar 1995).

Użycie spiroksaminy jest rekomendowane przede wszystkim w zwalczaniu mączniaków prawdziwych różnych gatunków roślin, a próby jej wykorzystania w zwalczaniu innych grzybów patogenicznych wykazały niską skuteczność substancji aktywnej (Debieu i in. 2000).

W literaturze można odnaleźć doniesienia o spadku wrażliwości populacji patogenicznych grzybów na fungicydy morfolinowe: *Erysiphe graminis* (Felsenstein i in. 1994, Napier i in. 2000), *Microdochium nivale* (Debieu i in. 2000), *Botrytis cinerea* (Leroux i in. 1999), *Nectria haematococca* (Lasseron-De Felandre i in. 1999). Dodatkowo ze względu na możliwość uzyskiwania odporności krzyżowej organizacja FRAC w 2005 roku oceniała ryzyko wystąpienia odporności na spiroksaminę od niskiej do średniej (www.frac.info). Problemu odporności na preparaty z grupy SBI dotyczyły badania Zhu i in. (2008), które potwierdziły występowanie odporności krzyżowej na SBI u *Pseudoperonospora cubensis* (*Oomycetes*). W szczepach odpornych mutantów stwierdzono odporność zarówno na flumorf i dimetomorf (różne rodzaje fungicydów), a wyniki badań jednoznacznie wskazują że jest to ten sam mechanizm odporności, wobec powyższego ryzyko występowania odporności w tym wypadku należy uznać za średnie (Zhu i in. 2008).

Zastosowanie preparatów SBI w szkółkarstwie może nieść za sobą pewne zagrożenia. W szkółkach kontenerowych, gdzie poważnym problemem jest występowanie mączniaka prawdziwego, substancje morfolinowe mogą przenikać do bryłki substratu, przez co może dojść do spadku skuteczności stosowania szczepionek mykoryzowych. Morfoliny zastosowane w warunkach laboratoryjnych już w niskich dawkach wpływały niekorzystnie na wzrost strzępek i zarodnikowanie mykoryzowego gatunku *Glomus intraradices*, co było związane z zaburzeniami metabolizmu steroli (Campagnac i in. 2009).

Poprzednie badania przeprowadzone przez zespół pod kierunkiem Campagnac (Campagnac i in. 2008), dotyczące preparatów morfolinowych (fenpropimorfu i fenheksamidu), wykazały także bezpośredni wpływ wymienionych substancji aktywnych na stopień mykoryzacji korzeni przez *Glomus intraradices*. Przeprowadzone przez badaczy analizy wykazały, że pierwszy z wymienionych preparatów redukował ten proces w sposób drastyczny (Campagnac i in. 2008). Zastosowanie fenheksamidu wpływało także niekorzystnie na inny gatunek mykoryzowy *Glomus larum* (Cardenas-Flores i in. 2011). Autorzy w wyniku przeprowadzonych badań stwierdzili, że wysokie stężenie oraz częste powtarzanie zabiegów z wykorzystaniem substancji aktywnych z grupy SBI ma niekorzystny wpływ na grzyby mykoryzowe w glebie (Cardenas-Flores i in. 2011).

Negatywnego wpływu fenheksamidu na rozwój symbiozy ektomykoryzowej nie potwierdzają najnowsze wyniki badań uzyskane przez Kuc i Aleksandrowicz-Trzcińską (2012). Autorzy podają, że preparat Falcon 460 EC nie ograniczał mykoryzy sadzonek dębu z grzybem *Hebeloma crustuliniforme*, a wręcz przeciwnie uzyskane wyniki wskazują na możliwość stymulacji mykoryz powstających spontanicznie.

Preparaty DMI (triazole) np. Falcon 460 EC

Fungicydy należące do tej grupy obejmują około 30 substancji aktywnych, o wysokiej efektywności przeciwko wielu patogenom grzybowym. Preparaty DMI mają zastosowanie w ograniczaniu występowania mączniaków prawdziwych oraz grzybów rdzawnikowych i głowniowych, zgnilizny twardzikowej, szarej pleśni, a także innych patogenów grzybowych wywołujących plamistości liści.

Badania dowiodły, że fungicydy triazolowe przenikają przez korzenie, pędy i liście, absorbowane są w ksylemie i przemieszczane akropetalnie w roślinach, a nie są przenoszone floemem do korzeni, dlatego mechanizm działania tych substancji należy określić jako lokalnie systemiczny (Edgington 1981).

Związki te blokują biosyntezę steroli w komórkach grzybów (Yang i in. 2011). Mechanizm ten opiera się na hamowaniu 14- α demetylasy sterolowej zależnej od cytochromu P-450 w pozycji 14 lanosterolu oraz w mniejszym stopniu na inhibicji Δ^{24} -metylotransferazy sterolowej (Elliott 1999). Większość preparatów DMI hamuje działanie cytochromu poprzez przyłączenie do kieszeni cysteinowej w miejscu aktywnym enzymu. Jak wskazują dane literaturowe odporność polową na preparaty triazolowe stwierdzono już po około 10 latach stosowania, w populacjach mączniaków prawdziwych i parcha (Ma i Michailides 2005, McGrath 2001). Dalsze badania dotyczące odporności grzybów na te fungicydy pozwoliły na zidentyfikowanie form o zmniejszonej wrażliwości w populacjach: *Fusarium asiaticum* (Yin i in. 2009), *F. graminearum* (Yin i in. 2009), *F. solani* (Kalamarakis i in. 1991), *Microdochium nivale* (Cristani i Gambogi 1993). W związku z punktowym mechanizmem oddziaływania na patogen oraz dużą różnorodnością preparatów o podobnym mechanizmie działania, ryzyko uzyskania odporności na preparaty oceniane jest jako średnie z dużym prawdopodobieństwem występowania odporności krzyżowej (www.frac.info).

Literatura podaje że, mechanizmy odporności na DMI zaobserwowane w populacjach grzybów obejmują: mutację enzymu- 14 α -demetylasy (*CYP51*), co prowadzi do zmniejszenia powinowactwa DMI do docelowego białka (Delye i in. 1997), nadekspresję lub zwiększenie liczby kopii genu *CYP51*, co skutkuje zwiększeniem ilości docelowego enzymu (Hamamoto i in 2000), nadekspresję białek transportowych kasety wiążącej ATP (ABC) (efflux pumps) zaangażowanych w transport cukrów, aminokwasów, białek, peptydów oraz jonów metali (Zwiers i in. 2002), oraz niezidentyfikowane mechanizmy odporności na DMI (Mellado i in. 2001, Wood i in. 2001).

Preparaty DMI poza właściwościami fungistatycznymi wykazują pośrednie działanie na komórki bakteryjne, pomimo że nie zawierają one steroli. W pracach badawczych wykazano, że tritikonazol stymuluje proliferację bakterii w glebie, zaś fenpropimorf i propikonazol całkowicie hamują aktywność glebowych bakterii (Milenkovski i in. 2010).

Związki triazolowe ze względu na mechanizm modyfikujący szlak sterolu różnych organizmów, wykazują także zbliżone do regulatorów wzrostu oddziaływanie na rośliny (Barnes i Kelley 1992, Coolbaugh i in. 1982). Niektóre preparaty triazolowe wykorzystuje się jako retardanty wzrostu roślin (inhibitory wzrostu) (Rademacher 2000). Działanie DMI w tym zakresie polega na hamowaniu biosyntezy gibereliny, co prowadzi do ograniczenia wzrostu wydłużeniowego korzeni i pędów (Görtz i in. 2008).

Okazuje się, że mimo szerokiej aktywności preparatów DMI wpływających zarówno na grzyby, bakterie i rośliny, związki triazolowe nie wykazują oddziaływania fungistatycznego na lęgnowce. Odpowiedzialny za to jest duży dystans filogenetyczny dzielący grzyby właściwe i lęgnowce, co przekłada się bezpośrednio na różną efektywność środków ochrony roślin w ograniczaniu występowania tych odrębnych grup organizmów. Komórki *Phytophthora* oraz innych gatunków należących do *Oomycetes* nie zawierają ergosterolu, a w ich genomach nie występują funkcjonalne geny *CYP51* (Tyler i in. 2006). Organizmy te mają jednak zdolność do produkcji skwalenu i transformacji egzogennych steroli, dlatego można je zaliczyć do organizmów aukstroficznych w kierunku pozyskiwania steroli (Marshall i in. 2001). Lęgnowce pobierają związki prekursorowe dla steroli od rośliny gospodarza w trakcie infekcji, w czym pośredniczy duża rodzina zewnątrzkomórkowych białek strukturalnie związanych z transferem lipidów zwanych elicytynami. Białka te uczestniczą w relacjach roślina-patogen, a ich obecność podczas patogenezy skutkuje aktywowaniem reakcji nadwrażliwości (Blein i in. 2002).

Preparaty triazolowe w szkółkarstwie i uprawach leśnych stosuje się interwencyjnie w zwalczaniu mączniaka prawdziwego dębu (*Erysiphe alphitoides*) osutki sosny (*Lophodermium pinastri*, *L. seditosum*) i opadziny modrzewia (*Meria laricis*).

Znane są także przykłady stosowania preparatów DMI w starszych drzewostanach. W USA propikonazol stosowany jest w leczeniu zamierania dębów (*Chalara quercina*). Skuteczność wymienionej substancji aktywnej w zwalczaniu tej groźnej choroby dębów została udokumentowana w pracach badawczych Eggers i in. (2005) oraz Peacock i Fulbright (2007). Przeprowadzenie zabiegu leczniczego polega na wprowadzeniu fungicydu za pomocą makro- lub mikroiniekcji do części drewna, uczestniczącej w transporcie wody (Wilson i Lester 2002). Wykonanie mikroiniekcji polega na wprowadzeniu małej objętości stężonej substancji aktywnej za pomocą mikroinjektorów przez otwór wywiercony w drewnie. Liczba miejsc mikroiniekcji uzależniona jest od średnicy drzewa, a rozmieszczenie ich jest równomierne. Mechanizm pobierania fungicydu przez tkanki drzewa jest przede wszystkim pasywny, może także zostać wymuszony za pomocą injektorów (Haugen i Stennes 1999). W zabiegu makroiniekcji wprowadza się stężone substancje aktywne (4-8 ml) w większej objętości wody. Badania przeprowadzone przez Haugen i Stennes (1999) wykazały, że duże objętości rozcieńczonych fungicydów są lepiej rozprowadzane w tkankach drzew a przez to skuteczniejsze. Efekt ochronny protiokonazolu w zamieraniu dębów utrzymuje się przez dwa

lata od zastosowania preparatu (Eggers i in. 2005), lecz jego aplikacja nie jest skuteczna gdy porażone zostały korzenie (Wilson i Lester 2002).

Aminopirymidyny np. Nimrod 250 EC

Aminopirymidyny to grupa systemicznych substancji aktywnych skutecznych wobec mączniaków prawdziwych (*Erysiphales*), w mniejszym stopniu stosowanych w zwalczaniu rdzy i głowni. Do tej grupy fungicydów należy bupyrimat, którego mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy kwasów nukleinowych (Hollomon 1979), poprzez ograniczenie aktywności deaminazy adenozy (ADA), enzymu uczestniczącego w metabolizmie puryn, który katalizuje reakcję deaminacji adenozy do inozy (Hollomon i Chamberlain 1981). Dowiedziono, że preparaty aminopirymidynowe powinny być stosowane we wczesnych fazach infekcji, ponieważ hamują formowanie apresoriów i haustoriów mączniaków prawdziwych, wykorzystanie tej grupy substancji aktywnych może być także korzystne w późniejszych fazach rozwojowych ponieważ hamują one kiełkowanie zarodników (Hollomon i Schmidt 1987).

Pierwsze preparaty aminopirymidynowe wprowadzono około 1968 roku, wykazywały początkowo bardzo skuteczne działanie w ograniczaniu mączniaka prawdziwego ogórka (*Sphaerotheca fuliginea*), jednak po około dwóch latach ze względu na częste powtarzanie zabiegów ochronnych, w populacjach *S. fuliginea* zaobserwowano odporność na te substancje aktywne (Brent 1982).

Występowanie form odpornych na aminopirymidyny potwierdzono także w populacjach mączniaków prawdziwych jęczmienia (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) (Hollomon 1979). Jak dotąd mechanizm odporności grzybów na tę grupę substancji aktywnych pozostał niewyjaśniony. Brent i Hollomon (2007) podają, że odporność mączniaków na aminopirymidyny może występować mniej gwałtownie, lecz należy ją określić jako ciągłą i progresywną. Zdaniem autorów populacja patogenu może powrócić do stanu wrażliwości na preparat, jeśli zabiegi ochronne będą wykonywane mniej intensywnie z jednoczesnym wykorzystaniem innych substancji aktywnych (Brent i Hollomon 2007).

Podsumowując należy zwrócić uwagę, iż rekomendowane do zwalczania mączniaków i osutki sosny triazolowe i aminopirymidynowe substancje aktywne, mające służyć do ograniczania występowania tych jednostek chorobowych, mają niezwykle wąski mechanizm działania na grzyby. Oczywiście intensyfikacja zabiegów ochronnych w sytuacji gdy brakuje innych zalecanych substancji aktywnych może skutkować występowaniem zjawiska

odporności na większą skalę. Dodatkowo ograniczenie występowania mączniaków prawdziwych jest niezwykle trudne, co wynika z ogromnego potencjału rozmnożeniowego (intensywne zarodnikowanie), szybkiego cyklu życiowego oraz szerokich preferencji temperaturowych i wilgotnościowych tej grupy organizmów. Zahamowanie występowania objawów chorobowych osiąga się przez częste powtarzanie zabiegów ochronnych, zaś ograniczony dostęp substancji aktywnych, powoduje iż koniecznością staje się poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania tych patogenów (Pap i in. 2012).

Preparaty nieorganiczne (tlenochlorek miedziowy) np. Miedzian 50 WP

Związki nieorganiczne są najstarszą grupą substancji aktywnych stosowanych w zwalczaniu chorób roślin. Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania miedzi organicznej sięgają 1761 roku, kiedy siarczan miedzi (CuSO_4) wykorzystano w bardzo dużej koncentracji do ochrony pszenicy przed głownią. Prace nad zastosowaniem miedzi w zwalczaniu chorób roślin kontynuował Prevost (1807), który odnotował hamowanie kiełkowania zarodników głowni. Dalsze badania dotyczące wykorzystania miedzi prowadził botanik, profesor Millardet z Bordox, który około roku 1885 zastosował „ciecz bordoską” ($3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4 \cdot \text{CaSO}_4$) do ochrony winorośli przed mączniakiem rzekomym (*Plasmopara viticola*). W kolejnych latach preparaty miedziowe stosowano także w zwalczaniu zarazy ziemniaka. Największy postęp w badaniach nad preparatami miedziowymi przypadał na lata 1925-35, kiedy opatentowano pierwsze substancje aktywne z tej grupy.

Obecnie w ochronie roślin jony miedzi (Cu^{2+}) stosuje się w postaci siarczanu miedzi, tlenku miedzi, naftenianu miedzi, tlenonochlorku miedzi, 8-hydroksykwinoLINIANU miedzi. Preparaty miedziowe stosuje się do zwalczania: mączniaków rzekomych, zarazy ziemniaka, oraz innych grzybów powodujących plamistości liści, a leśnictwie do ograniczania występowania osutki sosny .

Mechanizm oddziaływania miedzi na komórki grzybów jest złożony. Jony miedzi wykazują powinowactwo do różnych grup chemicznych występujących w komórkach grzybów i reagują z grupami tiolowymi, powodując niespecyficzną denaturację białek i enzymów. Tworzą trwałe kompleksy z koenzymami i innymi związkami biologicznie czynnymi co prowadzi do ograniczenia aktywności metabolicznej grzybów. Preparaty miedziowe ograniczają procesy oddechowe w komórkach grzybów, poprzez inhibicję powstawania acetylo-CoA, przerywają proces fosforylacji w łańcuchu oddechowym i jednocześnie hamują tworzenie ATP .

Wpływ preparatów miedziowych nie ogranicza się do grzybów patogenicznych. Badania z wykorzystaniem tlenochlorku miedzi wykazały ich negatywny wpływ na populacje grzybów mykoryzowych *Glomus* spp. i *Arachis hypogea* L. (Sreenivasa i Bagyaraj 1989) oraz neutralny wpływ na gatunki *Glomus fasciculatum* i *Agrostis palustris* L. (Rhodes i Larser 1981). Uzyskane rozbieżne rezultaty badań wynikały z odmiennego oddziaływania substancji aktywnej na grzyby mykoryzowe w różnych gatunkach roślin (Rhodes i Larser 1981, Sreenivasa i Bagyaraj 1989).

Inne prace badawcze wykazały zmniejszenie aktywności mikroorganizmów glebowych oraz hamujący wpływ preparatów miedziowych na grzyby ektomykoryzowe w środowiskowych próbach na sadzonkach sosny (Manninen i in. 1998). Dalsze badania dotyczące tlenochlorku miedzi wykazały ograniczenie wzrostu kolejnych gatunków grzybów mykoryzowych: *Cantharellus cibarius*, *Corticium bicolor*, *Paxillus involutus* i *Suillus* (Laatikainen i Heinonen-Tanski 2002).

Dane literaturowe wskazują także na możliwość niekorzystnego wpływu preparatów miedziowych na rośliny. Gibson (1958) wykazał, że związki miedzi zastosowane na glebach kwaśnych (tlenochlorek miedzi i tlanek miedzi) działały fitotoksycznie na gatunki sosny *Pinus radiata* i *P. patula*. Niekorzystne oddziaływanie polegało na przedwczesnym zamieraniu wierzchołka korzenia i ostatecznie śmierci sadzonek, mechanizm ten jest jednak mało poznany (Orbovic i in. 2007).

W literaturze można odnaleźć także informację, że jony miedzi są skuteczne przeciwko niektórym grzybom powodującym zgnilizny drewna. Z badań wykonanych przez Chen (2010), wynika że mechanizm ochrony drewna przed grzybami polega na wiązaniu miedzi z polisacharydami i ligninami w ścianach komórkowych drewna. Bardzo korzystna dla tego procesu jest także migracja jonów Cu^{2+} w drewnie (Choi i in. 2001). Preparaty miedziowe wykazują niższą skuteczność przeciwko białej i brązowej zgniliźnie drewna, powodowanej przez grzyby z rodzin *Antrodia* i *Serpula*, które wiążąc jony miedzi tworzą nietoksyczne kryształy szczawianu miedzi (Hastrup i in. 2005). Poprawę skuteczności preparatów miedzi organicznej w ograniczaniu grzybów uszkadzających drewno można uzyskać przez łączne stosowanie z czwartorzędowymi solami amoniowymi (QAC- substancje czynne niszczące bakterie, mniej skuteczne na grzyby), które w połączeniu z jonami miedzi dają efekt synergiczny (Härtner i Barth 1996).

ROZDZIAŁ 3. DZIAŁANIA Z ZAKRESU PROFILAKTYKI W RAMACH INTEGROWANEJ OCHRONY ROŚLIN

3.1. Ocena zagrożenia fitopatologicznego szkółek leśnych na podstawie badań ankietowych

Metodyka

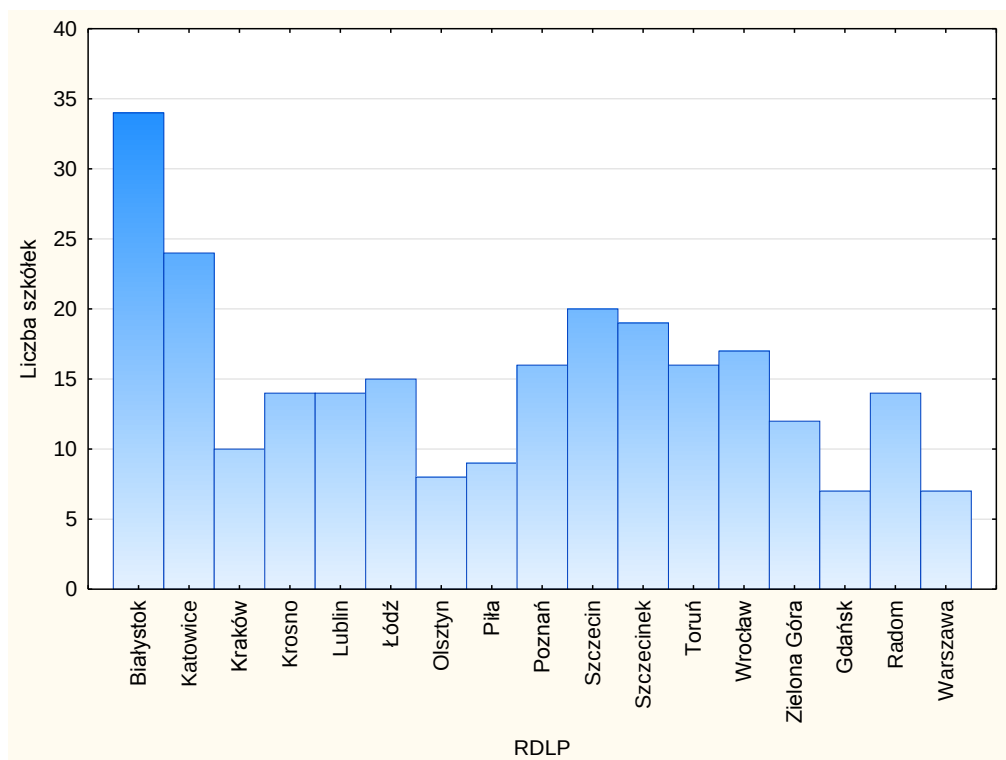
Ocena stanu zagrożenia fitopatologicznego szkółek leśnych na drodze badania ankietowego była jednym z elementów tematu BLP 367. Nadrzędnym celem tego działania było określenie czynników mogących mieć wpływ na występowanie patogenów grzybowych zakłócających produkcję szkółkarską. Ankiety (Załącznik 2) zostały rozesłane drogą elektroniczną do wszystkich nadleśnictw na terenie kraju. Respondenci zostali poproszeni o określenie podczas wypełniania ankiety skali problemów fitopatologicznych z jakimi borykają się w szkółkach leśnych, których są gospodarzami. Przyjęto pięciostopniową skalę występowania problemów. Wśród możliwych odpowiedzi były: „Brak”, „Mała”, „Średnia”, „Duża” i „Bardzo duża”.

Wyniki

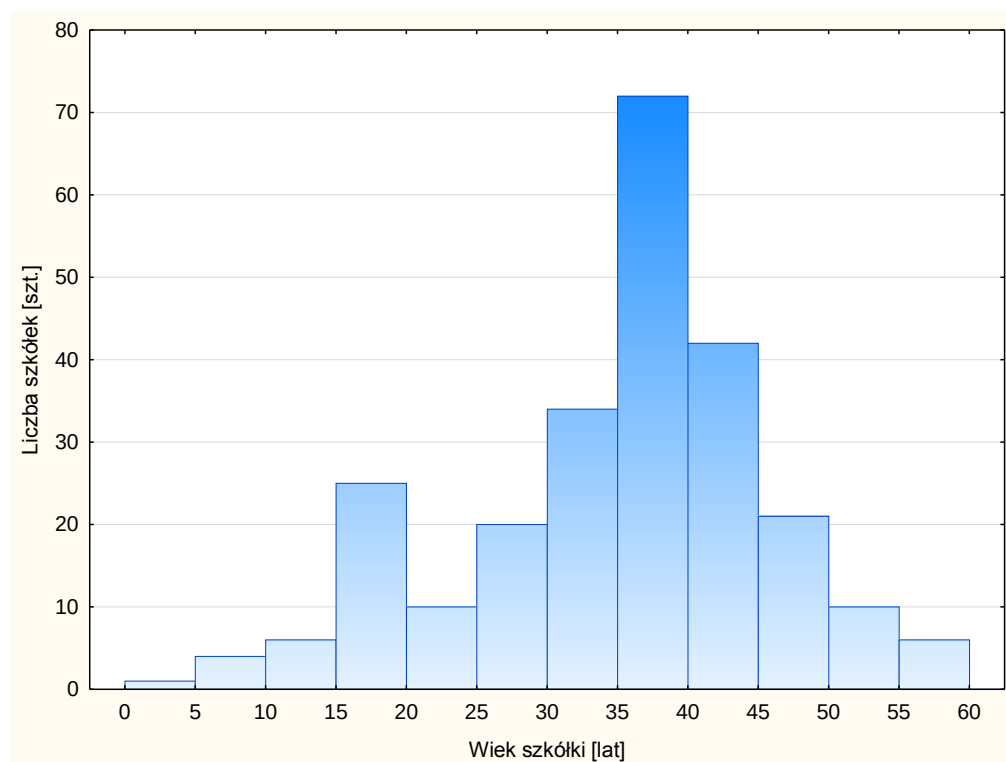
Otrzymano wypełnione kwestionariusze dotyczące 256 szkółek leśnych z terenu 247 nadleśnictw (Ryc. 1). Najwięcej wypełnionych kwestionariuszy nadesłano z terenu rdLP: Białystok, Katowice, najmniej zaś z rdLP: Warszawa, Gdańsk, Olsztyn, Kraków oraz Piła. Liczba kwestionariuszy nadesłanych z poszczególnych rdLP była związana z ogólną liczbą szkółek położonych na ich terenie.

Charakterystyka obiektów objętych badaniem ankietowym.

Przeciętny wiek szkółki scharakteryzowanej w ankiecie wynosi 35 lat. Blisko 59% wszystkich szkółek leśnych stanowiły obiekty w wieku od 30 do 45 lat (Ryc. 2). Najstarszymi szkółkami dysponuje RDLP Białystok oraz RDLP Kraków. Najkrócej użytkowane obiekty występują w rdLP: Lublin, Krosno i Katowice (Tab. 1).

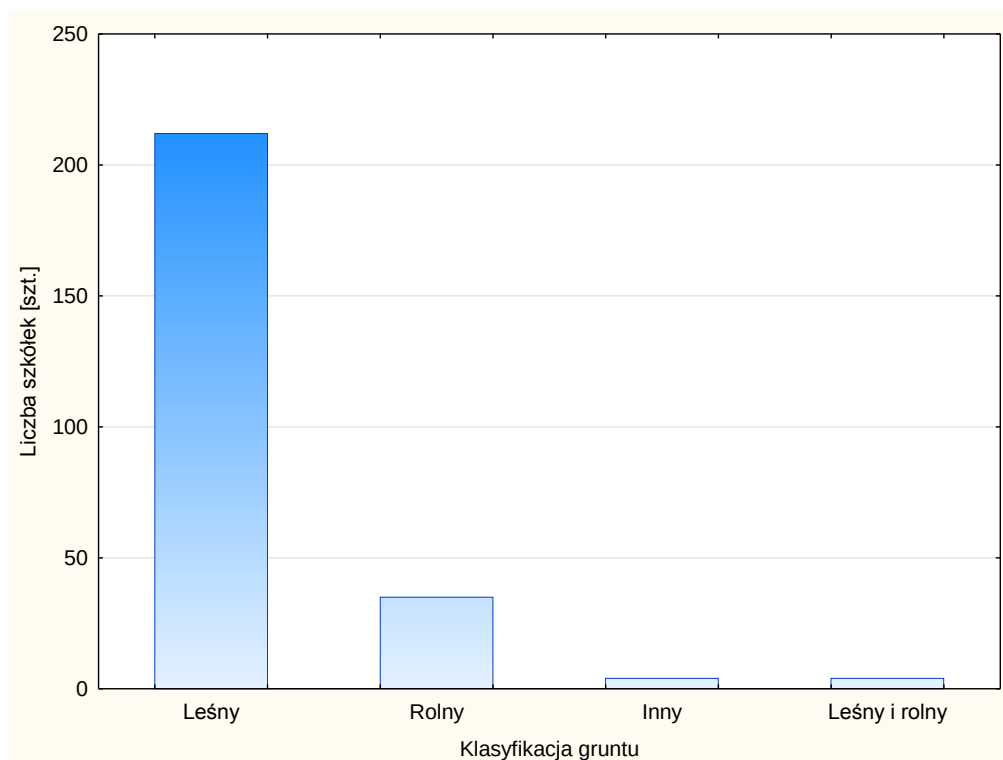


Ryc. 1. Liczba szkółek poszczególnych rdLP objętych badaniem ankietowym.



Ryc. 2. Liczebność szkółek leśnych PGLP w klasach wiekowych.

212 szkółek leśnych z 256 (83%) scharakteryzowanych w ankietach to obiekty założone na gruntach leśnych wcześniej porośniętych drzewostanem. Większość pozostałych szkółek założono na terenach, które wcześniej były użytkowane rolniczo (Ryc. 3, Tab. 1). Nieliczne obiekty założono na terenach w części użytkowanych jako grunty leśne oraz rolne, pozostałe zaś sklasyfikowano jako „inne”.



Ryc. 3. Wcześniejsza klasyfikacja gruntów wykorzystanych do założenia szkółek leśnych.

Ankiety nadesłane z terenu rdLP Piła i Warszawa dotyczyły wyłącznie szkółek zlokalizowanych na terenie leśnym porośniętym wcześniej drzewostanem. Stosunkowo duży udział szkółek założonych na gruntach porolnych raportowano z terenu rdLP Katowice, Lublin, Szczecin i Zielona Góra.

Tabela 1. Przeciętny wiek szkółek w poszczególnych rdLP oraz liczba szkółek założonych na gruncie leśnym oraz porolnym.

RDLP	Przeciętny wiek szkółki [lat]	Liczba szkółek założonych na gruncie leśnym [szt.]	Liczba szkółek założonych na gruncie porolnym [szt.]
Białystok	42	31	3
Gdańsk	40	6	1
Katowice	29	15	6
Kraków	42	7	2
Krosno	29	11	2
Lublin	29	9	4
Łódź	34	13	1
Olsztyn	35	6	2
Piła	36	9	-
Poznań	37	15	1
Radom	35	13	1
Szczecin	34	14	4
Szczecinek	35	18	1
Toruń	40	15	1
Warszawa	36	7	-
Wrocław	33	14	3
Zielona Góra	37	9	3
Średnia	35	nie dotyczy	nie dotyczy

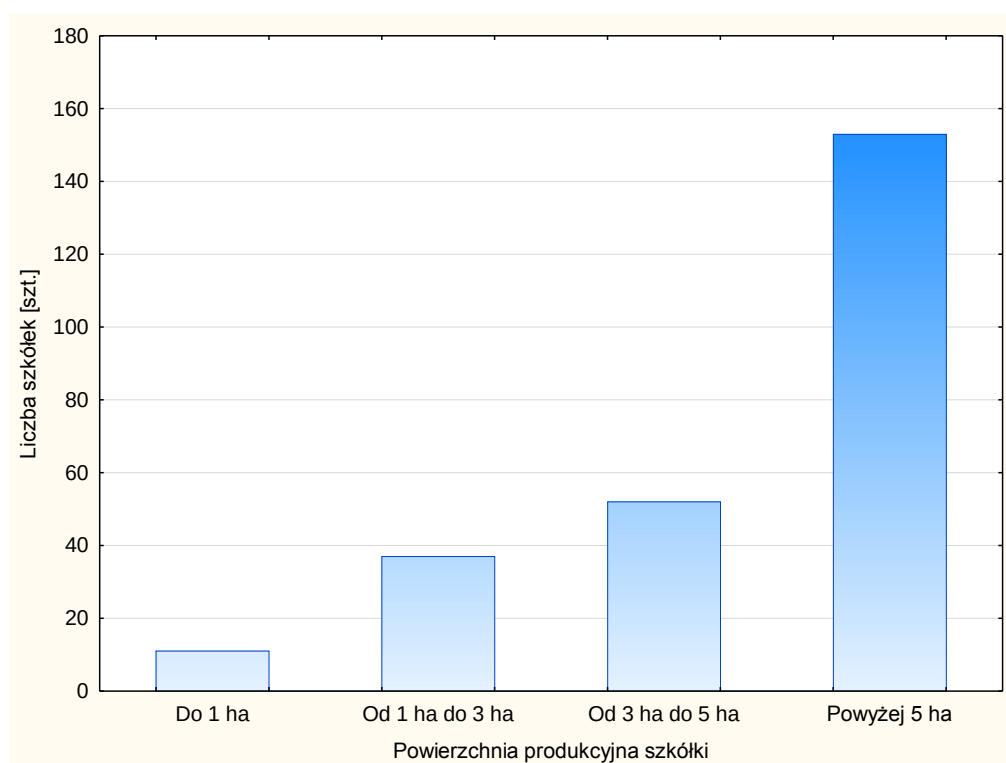
Nadesłane ankiety dotyczyły w znakomitej większości szkółek otwartych (Tab. 2). Stanowiły one 82% spośród wszystkich analizowanych obiektów. Udział szkółek podokapowych i kontenerowych był niewielki i wynosił ok 2% wszystkich obiektów. Szkółki otwarte, na fragmentach których prowadzona jest produkcja sadzonek pod okapem drzewostanu stanowiły 8%. Produkcję kontenerową oraz gruntową prowadziło blisko 5% wszystkich szkółek. W pozostałych obiektach łączono produkcję gruntową na otwartej przestrzeni, podokapową oraz kontenerową.

Charakterystykę powierzchniową szkółek leśnych objętych badaniem ankietowym przedstawiono w tabeli 3 i na rycinie 4. Najliczniej reprezentowane są duże szkółki, o powierzchni produkcyjnej przekraczającej 5 ha. Najmniej respondentów gospodarowało zaś w obiektach bardzo małych, tj. o powierzchni produkcyjnej poniżej 1 ha. 35% ogółu szkółek, z których nadesłano wypełnione ankiety miało powierzchnię produkcyjną od 1 ha do 5 ha.

Tabela 2. Liczebności różnych rodzajów szkółek w poszczególnych rdLP.

RDLP	Szkółka otwarta [szt.]	Szkółka podokapowa [szt.]	Szkółka kontenerowa [szt.]	Szkółka otwarta + podokapowa [szt.]	Szkółka otwarta + kontenerowa [szt.]	Szkółka otwarta + podokapowa + kontenerowa [szt.]
Białystok	34	-	-	-	-	-
Katowice	13	3	2	4	1	-
Kraków	8	-	1	-	1	-
Krosno	5	2	-	3	2	1
Lublin	11	-	1	-	-	-
Łódź	8	-	-	5	1	1
Olsztyn	8	-	-	-	-	-
Pila	9	-	-	-	-	-
Poznań	14	-	-	-	2	-
Szczecin	19	-	-	1	-	-
Szczecinek	17	-	-	1	1	-
Toruń	14	-	-	1	1	-
Wrocław	16	-	-	-	1	-
Zielona Góra	11	-	-	-	1	-
Gdańsk	6	-	-	-	1	-
Radom	9	-	-	5	-	-
Warszawa	6	-	-	1	-	-
Suma	209	5	4	21	12	2

Najmniejsze szkółki (o powierzchni produkcyjnej poniżej 1 ha) posiadały jedynie rdLP Białystok, Katowice, Kraków i Krosno. Najwięcej szkółek o powierzchni między 1 ha a 3 ha w rdLP Białystok, Wrocław i Kraków. Szkółki o powierzchni od 3 ha do 5 ha najliczniej występowały na terenie rdLP Białystok, Łódź oraz Poznań. Największe szkółki (o powierzchni produkcyjnej pow. 5 ha) posiadały rdLP Szczecin, Szczecinek, Białystok oraz Toruń. Najmniej dużych szkółek występowało w rdLP Kraków, Warszawa, Wrocław i Gdańsk. Przeciętna powierzchnia produkcyjna szkółki objętej ankietą wyniosła 5,46 ha.



Ryc. 4. Charakterystyka powierzchniowa szkółek leśnych objętych badaniem ankietowym.

Tabela 3. Charakterystyka powierzchniowa szkółek leśnych objętych badaniem ankietowym

RDLP	< 1 ha [szt.]	1 - 3 ha [szt.]	3 - 5 ha [szt.]	> 5 ha [szt.]
Białystok	1	9	8	16
Gdańsk	-	-	2	5
Katowice	5	3	4	11
Kraków	4	5	-	1
Krosno	1	3	2	8
Lublin	-	3	4	7
Łódź	-	1	6	8
Olsztyn	-	1	1	6
Pila	-	-	4	5
Poznań	-	1	6	9
Radom	-	2	2	10
Szczecin	-	-	2	18
Szczecinek	-	-	2	17
Toruń	-	2	1	13
Warszawa	-	1	3	3
Wrocław	-	6	4	5
Zielona Góra	-	-	1	11
Suma	11	37	52	153

Scharakteryzowane w nadesłanych ankietach obiekty są z reguły wyposażone w deszczownie stałe, rzadziej przenośne (Tab. 4). 157 szkółek (62% ogółu) wyposażono w stałe deszczownie. Z przenośnych systemów deszczownic korzystają 80 obiektów (31% ogółu). Brak deszczowni zadeklarowali gospodarze 17 szkółek leśnych (7% obiektów). Ankiety dotyczące szkółek nieposiadających deszczowni nadesłano z terenu rdLP Katowice, Krosno, Białystok, Wrocław, Warszawa, Olsztyn, Lublin oraz Kraków.

Tab. 4. Wyposażenie szkółek objętych badaniem ankietowym w deszczownie.

RDLP	Deszczownia stała [szt.]	Deszczownia przenośna [szt.]	Brak deszczowni [szt.]
Białystok	15	16	3
Gdańsk	2	5	-
Katowice	15	4	4
Kraków	6	3	1
Krosno	7	3	4
Lublin	5	8	1
Łódź	13	2	-
Olsztyn	5	2	1
Piła	3	6	-
Poznań	7	9	-
Radom	13	1	-
Szczecin	17	3	-
Szczecinek	9	10	-
Toruń	15	1	-
Warszawa	2	4	1
Wrocław	14	1	2
Zielona Góra	10	2	-
Suma	157	80	17

Jako źródła wody do nawodnień szkółek objętych badaniem wykorzystywano najczęściej studnie głębinowe oraz naturalne i sztuczne zbiorniki wodne (Tab. 5). Studnie głębinowe najliczniej wykorzystywały szkoły w rdLP Białystok, Łódź oraz Radom. Z wody zgromadzonej w naturalnych i sztucznych zbiornikach wodnych najczęściej korzystano w szkołkach z terenu rdLP Białystok, Toruń i Szczecinek. Cieki wodne jako źródła wody deszczownicowej najliczniej wykorzystywano w obiektach położonych na terenie rdLP

Szczecin i Szczecinek. Te szkółki są szczególnie narażone na zawleczenie patogenicznych lęgnowców przenoszonych wraz z prądem wody naturalnych cieków.

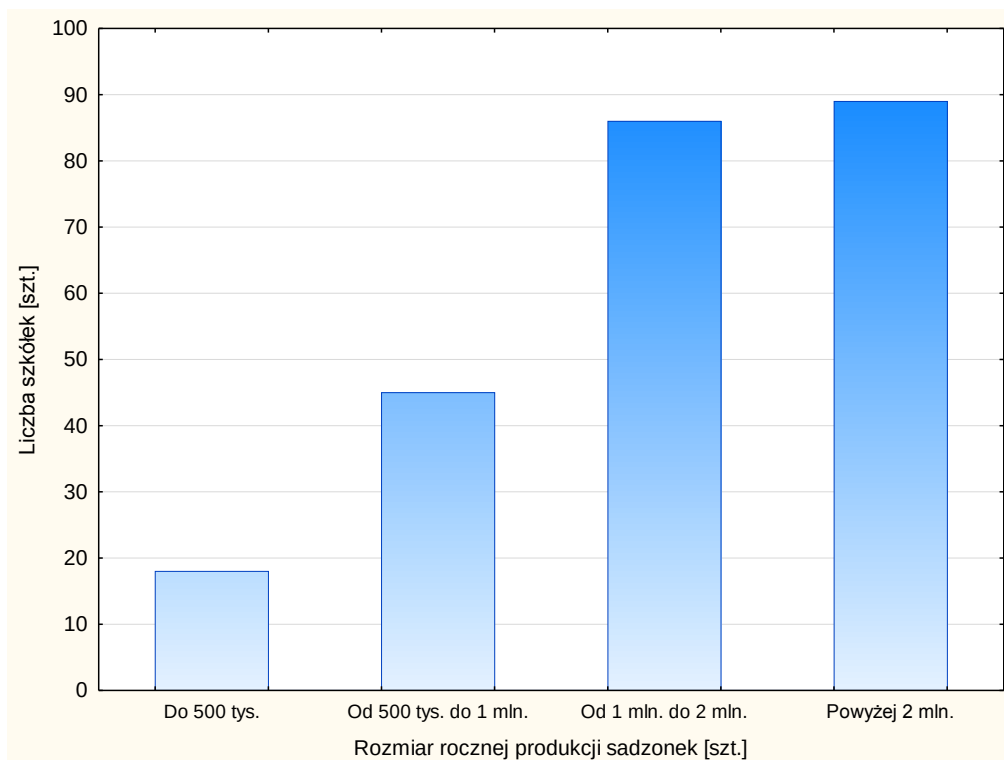
Tab. 5. Liczba szkółek leśnych objętych badaniem ankietowym wykorzystujących poszczególne rodzaje źródeł wody do nawodnień.

RDLP	Studnia głębinowa [szt.]	Zbiornik wodny [szt.]	Ciek wodny [szt.]	Ciek + zbiornik wodny [szt.]	Studnia głębinowa + zbiornik wodny [szt.]
Białystok	17	13	1	-	-
Gdańsk	2	5	-	-	-
Katowice	7	7	3	2	-
Kraków	3	1	3	1	-
Krosno	5	5	-	2	-
Lublin	5	4	3	1	-
Łódź	9	3	1	-	1
Olsztyn	4	1	2	-	-
Piła	4	2	3	-	-
Poznań	6	7	3	-	-
Radom	9	3	2	-	-
Szczecin	6	7	6	1	-
Szczecinek	1	9	8	-	-
Toruń	2	11	2	-	-
Warszawa	4	-	2	-	-
Wrocław	6	7	1	1	-
Zielona Góra	7	4	1	-	-
Suma	97	89	41	8	1

Szkółki objęte badaniem ankietowym produkowały rocznie przeciętnie 1867,6 tys. sadzonek. Ekstrema dla tej cechy wyniosły 40 tys. i 7 mln sztuk sadzonek. Strukturę rocznego rozmiaru produkcji sadzonek w szkółkach objętych badaniem ankietowym przedstawiono na rycinie 5 (dla PGLP) oraz w tabeli 6 (w rozbiciu na poszczególne rdLP).

Szkółki produkujące rocznie powyżej 1 mln. sztuk sadzonek stanowiły blisko 74% ogółu obiektów objętych badaniem. Szkółek produkujących poniżej 500 tys. sztuk sadzonek rocznie było poniżej 8% spośród wszystkich ujętych w ankiecie.

Obiekty produkujące rocznie najmniej sadzonek występowały na terenie rdLP Katowice, Kraków i Krosno, najczęściej na obszarach górskich oraz wyżynnych. Szkółki o największej mocy produkcyjnej uczestnicy badania deklarowali najczęściej na terenie rdLP Szczecin i Szczecinek.

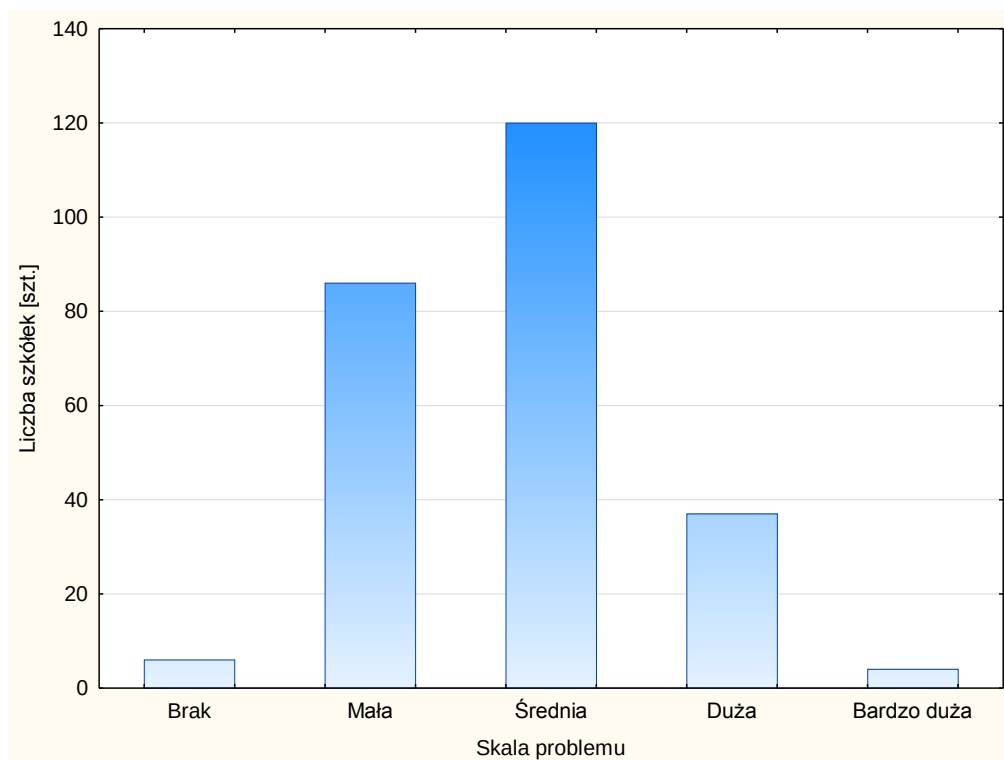


Ryc. 5. Struktura rozmiaru rocznej produkcji sadzonek w szkółka objętych badaniem ankietowym.

Tab. 6. Struktura rocznego rozmiaru produkcji sadzonek w ankietowanych szkółkach

RDLP	< 0,5 mln szt. [szt.]	0,5 - 1 mln. szt. [szt.]	1 - 2 mln. szt. [szt.]	> 2 mln. szt. [szt.]
Białystok	2	8	16	5
Gdańsk	-	2	1	4
Katowice	5	2	10	7
Kraków	3	3	2	-
Krosno	3	2	5	2
Lublin	-	2	6	2
Łódź	-	4	9	2
Olsztyn	1	1	3	2
Piła	-	1	3	5
Poznań	-	5	4	7
Radom	1	3	3	7
Szczecin	-	2	2	13
Szczecinek	-	-	3	15
Toruń	-	3	6	6
Warszawa	1	2	3	1
Wrocław	2	5	3	4
Zielona Góra	-	-	5	7
Suma	18	45	86	89

Wyniki badania problemów zdrowotności sadzonek przedstawiono na Ryc. 6. Najliczniej reprezentowane były szkółki, w których skalę problemów fitopatologicznych określono jako „Średnia”. Stanowiły one bliski 50% wszystkich obiektów objętych badaniem. Najmniej zarejestrowano szkółek, których gospodarze udzielili odpowiedzi „Brak” oraz „Bardzo duża” (odpowiednio: 2,4% i 1,6%).



Ryc. 6. Ocena skali problemów fitopatologicznych występujących w badanych szkółkach leśnych .

Analiza istotności wpływu wybranych elementów charakteryzujących szkółki objęte badaniem ankietowym na ocenę skali problemów fitopatologicznych prezentowaną przez ich gospodarzy

Istotność wpływu wybranych elementów charakteryzujących szkółki objęte badaniem ankietowym na ocenę skali problemów fitopatologicznych prezentowaną przez ich gospodarzy badano wykorzystując test Kruskala-Wallisa. Hipotezę zerową o braku istotnego wpływu elementu charakteryzującego szkółkę na skalę problemów fitopatologicznych w niej stwierdzanych odrzucano przy $p \leq 0,05$. Analizę przeprowadzono w programie Statistica. Wyniki analizy zaprezentowano w tabeli 7.

Tabela 7. Wpływ wybranych elementów na ocenę skali problemów fitopatologicznych. Na czerwono zaznaczono elementy istotnie wpływające na problemy fitopatologiczne.

Cecha	Wynik testu Kruskala-Wallisa
Wiek szkółki (3 klasy wiekowe)	H (2, N= 248) =5,576437 p =,0615
Wcześniejsza klasyfikacja gruntu wykorzystanego pod założenie szkółki	H (3, N= 252) =3,038757 p =,3857
Grupa granulometryczna gleb występujących w szkółce	H (3, N= 180) =4,971717 p =,1739
Rodzaj pokrywy roślinnej na gruncie wykorzystanym pod szkółkę	H (3, N= 191) =2,004677 p =,5714
Rodzaj szkółki leśnej	H (5, N= 250) =14,71425 p =,0117
Powierzchnia produkcyjna szkółki (w 4 klasach powierzchni)	H (3, N= 250) =8,450647 p =,0376
Typ deszczowni używanej w szkółce	H (3, N= 252) =6,933818 p =,0740
Rodzaj ujęcia wody deszczownianej wykorzystywanego w szkółce	H (4, N= 234) =3,345299 p =,5018
Rozmiar rocznej produkcji sadzonek (4 klasy)	H (3, N= 236) =5,999200 p =,1117
Stwierdzone braki podstawowych składników pokarmowych	H (1, N= 252) =5,616818 p =,0178
Stwierdzony nadmiar podstawowych składników pokarmowych	H (1, N= 251) =6,702763 p =,0096
Stosowano zakwaszanie gleby w szkółce	H (1, N= 249) =6,549563 p =,0105
Stosowano alkalizację gleby w szkółce	H (1, N= 250) =,5251333 p =,4687
Stosowano nawożenie zielone w szkółce	H (1, N= 245) =8,151966 p =,0043

Istotny wpływ na kształtowanie się oceny skali problemów fitopatologicznych w szkółkach objętych badaniem ankietowym miały następujące cechy charakteryzujące te obiekty:

- rodzaj szkółki,
- powierzchnia produkcyjna szkółki,
- fakt stwierdzenia braku podstawowych składników pokarmowych w glebie,
- fakt stwierdzenia nadmiaru podstawowych składników w glebie,
- fakt stosowania zabiegów zakwaszania gleby w szkółce,
- fakt stosowania w szkółce nawożenia zielonego.

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej można stwierdzić, że istotnie większe prawdopodobieństwo uzyskania oceny stwierdzającej mniejszą skalę problemów fitopatologicznych miały:

- a. szkółki kontenerowe i podokapowe;
- b. szkółki o powierzchni produkcyjnej do 1 ha;
- c. szkółki, w których glebach nie stwierdzano niedoborów ani nadmiarów podstawowych składników pokarmowych;
- d. szkółki, w których nie zachodziła konieczność obniżenia pH gleby;
- e. szkółki, w których nie stosowano nawożenia zielonego.

Trafność powyższych stwierdzeń potwierdzają znane fakty dotyczące środowiska glebowego oraz mikroklimatu szkółek leśnych:

- a. szkółki kontenerowe używają jałowego substratu;
- b. szkółki podokapowe cechuje korzystny mikroklimat oraz względna równowaga w środowisku glebowym np. naturalne związki symbiotyczne korzeni z grzybami;
- c. małe szkółki cechuje korzystny mikroklimat, a równowaga ich środowiska glebowego z reguły jest większa niż w dużych obiektach; istnieje mniejsze ryzyko zawleczenia patogenów;
- d. właściwe odżywienie sadzonek oraz prawidłowy odczyn gleby zmniejsza szansę wystąpienia oraz skalę infekcji grzybowych; rośliny w dobrej kondycji są mniej podatne na infekcje korzeni i pędów;
- e. stosowanie nawożenia zielonego (zwłaszcza z udziałem roślin motylkowych), szczególnie w roku poprzedzającym siew może zwiększyć zagrożenie siewek patogenami grzybowymi.

Wśród uzyskanych wyników analizy statystycznej dziwi fakt stwierdzenia braku wpływu wieku szkółek leśnych objętych badaniem ankietowym na ocenę skali ich zagrożenia fitopatologicznego. Cecha ta często kojarzona jest z postępującym w miarę zwiększania się

długości okresu użytkowania szkółki zmęczeniem gleby, uznawanym za czynnik potęgujący zagrożenie ze strony patogenicznych grzybów.

Opinia szkółkarzy na temat czynników wpływających na zagrożenie fitopatologiczne

Respondenci wypełniając ankietę mogli się wypowiedzieć na temat czynników i zabiegów mających pozytywny i negatywny wpływ na stan zagrożenia fitopatologicznego szkółek leśnych. Poniżej zaprezentowano najczęściej występujące odpowiedzi.

Zagadnienie 1: Zabiegi zmniejszające zagrożenie występowaniem chorób

- częste spulchnianie gleby - 20 odpowiedzi;
- stosowanie profilaktyki zgodnie z zaleceniami IBL - 9 odpowiedzi;
- systematyczne głęboszowanie kwater - 9 odpowiedzi;
- nawożenie organiczne - 9 odpowiedzi;
- okrywanie wschodów gatunków iglastych jałowym piaskiem lub włókniną - 7 odpowiedzi;
- mykoryzacja gleby w szkółce ściółką świerkową lub sosnową - 7 odpowiedzi;
- częsta wymiana podłoża produkcyjnego w przypadku wykorzystywania inspektów, koryt, technologii kontenerowej itp. - 5 odpowiedzi;
- stosowanie preparatów opartych na wyciągach roślinnych (np. cebula) - 5 odpowiedzi;
- zmianowanie gatunków produkowanych w szkółce - 4 odpowiedzi;
- stosowanie preparatów „EM” (Efektywne Mikroorganizmy) - 4 odpowiedzi;
- przedsiewne podkiełkowanie nasion gatunków iglastych - 3 odpowiedzi;
- szybkie reagowanie na wystąpienie infekcji - 2 odpowiedzi;
- stosowanie roślin o właściwościach sanitarnych w ugorach zielonych - 2 odpowiedzi;
- dezynfekcja podłoża przed wysiewem nasion – 2 odpowiedzi;
- przedsiewna kontrola temperatury gleby w celu zapewnienia szybkich wschodów - 2 odpowiedzi
- ręczne usuwanie zainfekowanych siewek - 2 odpowiedzi;
- trzymywanie właściwego odczynu gleby - 2 odpowiedzi.

Zagadnienie 2: Zabiegi sprzyjające występowaniu chorób

- brak skutecznych fungicydów dopuszczonych do stosowania w szkółkach leśnych - 14 odpowiedzi;

- warunki atmosferyczne w okresie produkcji materiału sadzeniowego - 8 odpowiedzi;
- wzrost aktywności patogenów po nawożeniu azotowym - 6 odpowiedzi;
- brak lub zbyt krótkie ugorowanie - 5 odpowiedzi;
- zastosowanie łubinu w ugorach zielonych - 4 odpowiedzi;
- stosowanie ugorów zielonych - 3 odpowiedzi;
- przegęszczane siewy - 2 odpowiedzi;
- nadmierne deszczowanie siewów - 2 odpowiedzi.

Sugestie te, prezentowane najczęściej przez szkółkarzy z długoletnią praktyką i dużym doświadczeniem warte są uwzględnienia przy formułowaniu zaleceń dla praktyki leśnej.

Wnioski

1. Stosowanie jałowych substratów w technologii kontenerowej zmniejsza ryzyko i skalę infekcji patogenami grzybowymi.
2. Szkółki zakładane na terenach, których gleby wykazują zawartość składników pokarmowych oraz odczyn zbliżone do optymalnego dla planowanego profilu produkcji, są mniej zagrożone ze strony patogenów grzybowych.
3. W szkółkach o mniejszej powierzchni produkcyjnej występuje niższe zagrożenie infekcjami ze strony patogenów grzybowych.
4. Nawożenie zielone, szczególnie stosowane w roku poprzedzającym siew gatunków iglastych może zwiększać stopień zagrożenia fitopatologicznego na danej kwaterze.
5. Zwiększenie przewiewności gleby poprzez spulchnianie oraz głęboszowanie zmniejsza ryzyko wystąpienia infekcji grzybowych.
6. Do zmniejszenia zagrożenia ze strony patogenów grzybowych przyczynia się przedśiewne podkielkowanie nasion gatunków iglastych oraz przykrywanie siewów jałowym piaskiem, bądź włókniną. Zabiegi te prowadzą do uzyskania szybkich i równomiernych wschodów.

3.2. Wpływ płodozmianu na zdrowotność roślin – badania laboratoryjne

Celem badań prowadzonych w szklarni IBL oraz szkółce Nadleśnictwa Bielsk i Nowogród było sprawdzenie wpływu stosowania nawozów zielonych i ugorowania na rozwój i zdrowotność sadzonek.

Metodyka

W szkółce Nadleśnictwa Nowogród (Gawrychy), jako nawóz zielony zastosowano mieszankę roślin: wyka (15%), gryka (20%), peluszka (15%) i łubin (50%). W szkółce Nadleśnictwa Bielsk (Czechy) zastosowano samą grykę. Ze szkółek, które stosowały płodozmian, pobrano glebę z kwater, na których rok wcześniej zastosowano ugór zielony i ugór czarny. Założono następujący schemat doświadczenia z czterema rodzajami gleby (po dwa z każdej szkółki), napełniając nimi po 30 doniczek (po ok 2 l gleby):

Nadleśnictwo Bielsk

ugór czarny (kontrola)

ugór zielony

Nadleśnictwo Nowogród

ugór czarny (kontrola)

ugór zielony

W wazonach wysadzono podkiełkowane siewki dębu szypułkowego *Quercus robur* L.. Po okresie kilkumiesięcznej adaptacji i wzrostu w warunkach kontrolowanych w szklarni, w listopadzie 2013 r. połowę siewek wyjęto i poddano analizom biometrycznym, a glebę analizom fizyko-chemicznym oraz na obecność patogenów z rodzaju *Phytophthora*. Wykonano następujące pomiary parametrów biometrycznych: długości części nadziemnej, długości części podziemnej oraz grubości szyjek korzeniowych przy poziomie gleby. Dodatkowo korzenie poddano analizie na skanerze korzeni EPSON Perfection V700 Photo z oprogramowaniem WinRHIZO biorąc pod uwagę całkowitą ich długość, powierzchnię i stosunek długości drobnych korzeni do długości korzeni matecznych. W przypadku porównań długości korzeni i pędów zastosowano statystyczny test parametryczny T.

Glebę analizowano na obecność makro pierwiastków N, P, K, Ca i Mg, mikropierwiastków, zbadano odczyn kwasowości pH oraz policzono gęstość gleby. Do obliczeń gęstości pobrano po 100 cm³ gleby z 9 miejsc. Następnie każdą próbkę suszono

w piecu w temp. 104°C przez 90 minut i ważono. Wyniki przeliczono na 1 cm³ i uśredniono dla każdego wariantu doświadczenia.

Obecność patogenów z rodzaju *Phytophthora* w próbkach gleby pobranych ze szkółek sprawdzono za pomocą metody pułapek roślinnych. Glebę przesypiano do plastikowych pojemników a następnie zalano wodą, tak aby jej poziom był ok 1-2 cm nad poziomem gleby. W trakcie osadzania się gleby na dnie pojemników na powierzchni wody zbierały się części spławialne, które usuwano kilkakrotnie bibułą filtracyjną. Ze specjalnie wyhodowanych siewek dębowych i bukowych pobrano młode liście, które po wstępnym umyciu pod bieżącą wodą osuszono bibułą filtracyjną i umieszczono (spodem do dołu) na powierzchni wody, aby mogły swobodnie się na niej utrzymywać przez kilka dni (Ryc. 7).



Ryc. 7. Izolacja *Phytophthora* sp. za pomocą pułapek roślinnych

Jeżeli organy przetrwalnikowe lub strzępki patogenów z rodzaju *Phytophthora* są obecne w glebie to zalanie wodą stymuluje powstawanie zarodni (sporangiów), w których powstają zarodniki (zoospory). Te ostatnie dzięki wiciom posiadają zdolność ruchu i naturalnie płyną ku powierzchni wody, gdzie napotykać liście pułapki. W zetknięciu z nimi zarodniki wciągają wici, otorbijają się i rozpoczyna się proces infekcji tkanek liści. W efekcie powstają nieregularnego kształtu ciemne plamy, z których pasażuje się grzybnię patogena na

pożywki selektywne. Hodowle patogenów z rodzaju *Phytophthora* prowadzono w temperaturze 22°C w standardowych warunkach oświetlenia. Dodatkowo, plamy na liściach oraz strzępki rozwijających się kultur badano za pomocą testów płytkowych typu ELISA (Neogen Ltd.) umożliwiające identyfikację na poziomie rodzaju (*Phytophthora* i *Pythium*).

Zbadano także wpływ towarzyszących roślin uprawnych na rozwój siewek *Fagus sylvatica* L. Doświadczenie przeprowadzono w kontrolowanych warunkach szklarniowych. Do sterylnej podłoża, złożonego z ziemi torfowej o pH 5,5-6,5 i perlitu (3:1), zostały wysiane rośliny uprawne: gorczyca, gryka, szczypior i czosnek. Na każdy wariant doświadczenia przyjęto trzy powtórzenia (skrzynki). Jako kontrolę wykorzystano glebę nieobsianą. Gorczycę wysiano w dolki o głębokości ok. 3 cm po 2 ziarna w każdej; w sumie co najmniej 40 ziaren na skrzynkę. W analogiczny sposób wysiano grykę. Szczypior wysiano w 4 rzędach w poprzek skrzynki w odstępach ok. 4-5 cm na głębokości ok. 0,5 cm. Czosnek wysadzono w postaci cebulek w 3 rzędach po 3 sztuki w każdym, na głębokość ok. 4cm, w więźbie 7 x 10 cm. Po 7 tygodniach od wysiania, do każdej skrzynki wysiano po 15 nasion buka zwyczajnego, poddanych uprzednio stratyfikacji. Doświadczenie prowadzono przez kolejnych 7 miesięcy. W trakcie nie dodawano do gleby żadnych nawozów. Po zakończeniu doświadczenia sadzonki wyjęto z gleby i wykonano następujące pomiary parametrów biometrycznych: długości części nadziemnej, długości części podziemnej oraz grubości szyjek korzeniowych przy poziomie gleby. Korzenie poddano analizie na skanerze korzeni EPSON Perfection V700 Photo z oprogramowaniem WinRHIZO, biorąc pod uwagę całkowitą ich długość (TRL), powierzchnię (FRSA) i stosunek długości drobnych korzeni do długości korzeni matecznych (FRL/MRL).

Wyniki

Pomiary długości poszczególnych części siewek oraz szerokości szyjek korzeniowych siewek dębowych hodowanych w glebie po zastosowaniu mieszanki nawozu zielonego pobranej z Nadleśnictwa Nowogród zebrano w tabeli 8. W przypadku długości części podziemnej nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy wariantami doświadczenia. Stwierdzono natomiast istotne statystycznie różnice pomiędzy siewkami rosnącymi w glebie z nawozem zielonym i czarnym ugiem. Mieszanka nawozów zielonych

wpłynęła korzystnie na rozwój siewek. Średnia długość pędów głównych wyniosła 12,1 cm (w kontroli 10,5 cm). Średnia grubość sadzonek dębowych wysadzonych do gleby po nawozach zielonych była średnio o 2 mm większa niż u siewek kontrolnych, aczkolwiek różnice te nie okazały się być istotne statystycznie.

Tabela 8. Parametry biometryczne sadzonek dębu szypułkowego hodowanych w glebie po zastosowaniu mieszanki nawozu zielonego pobranej z Nadleśnictwa Nowogród

Średnia				
	Nawóz zielony	Kontrola	t	p
Długość korzenia (cm)	18,5	16,8	0,622	0,539
Długość pędu (cm)	12,1	10,5	2,425	0,022
Grubość szyi korzeniowej (cm)	2,8	2,6	1,137	0,265

Test parametryczny T, $\alpha=0,05$, N=15

Pomiary długości poszczególnych części siewek oraz szerokości szyjek korzeniowych siewek dębowych hodowanych w glebie z Nadleśnictwa Bielsk zebrano w tabeli 9. Średnia długość głównych korzeni siewek dębowych rosnących w glebie z gryką była nieznacznie mniejsza niż w kontroli. Podobnie jak w przypadku korzeni, średnia długość pędu u siewek dębowych rosnących w glebie po zastosowaniu w płodozmianie gryki była mniejsza. Różnice te jednak nie były istotne statystycznie. Zastosowanie nawozu zielonego (gryki) zwiększyła się grubość siewek dębowych w szyjkach korzeniowych o ponad 6 mm w porównaniu do siewek kontrolnych. Różnice te okazały się istotne statystycznie.

Tabela 9. Parametry biometryczne sadzonek dębu szypułkowego hodowanych w glebie po zastosowaniu mieszanki nawozu zielonego pobranej z Nadl. Bielsk

Średnia				
	Nawóz zielony	Kontrola	t	p
Długość korzenia (cm)	19,3	21,1	-0,695	0,492
Długość pędu (cm)	10,6	16,1	-0,884	0,384
Grubość szyi korzeniowej (cm)	2,9	2,3	4,29	0,000

Test parametryczny T, $\alpha=0,05$, N=15

Pomiary parametrów charakteryzujących system korzeniowy sadzonek dębowych hodowanych w glebie po zastosowaniu mieszanki nawozu zielonego pobranej z Nadleśnictwa

Nowogród zebrano w tabeli 10. Zastosowanie mieszaniny nawozów zielonych nie wpłynęło istotnie statystycznie na całkowitą długość korzeni ani na liczbę i udział korzeni drobnych, zmniejszyło natomiast powierzchnię drobnych korzeni u badanych siewek dębowych. Stwierdzone różnice w powierzchni drobnych korzeni okazały się być istotne statystycznie.

Tabela 10. Parametry biometryczne korzeni drobnych dębu szypułkowego hodowanych w glebie po zastosowaniu mieszanki nawozu zielonego pobranej z Nadleśnictwa Nowogród

Suma rang				
	Nawóz zielony	Kontrola (ugór czarny)	U	p
TRL	243	222	102	0,678
FRL	226	239	106	0,803
FRL/MRL	261	204	84	0,245
FRSA	127	338	7	0,000

Test U Manna-Whitneya, $\alpha=0,05$, N=15

Pomiary długości poszczególnych parametrów charakteryzujących system korzeniowy siewek dębowych hodowanych w glebie z Nadleśnictwa Bielsk zebrano w tabeli 11. Zastosowanie przedplonu nie wpłynęło istotnie na całkowitą długość systemów korzeniowych. Nie stwierdzono istotnego wpływu płodozmianu na długość drobnych korzeni u badanych siewek dębowych. Stosunek długości korzeni drobnych do długości korzeni matecznych jest większy u roślin rosnących w glebie z nawozem zielonym. Różnice te są istotne statystycznie, świadczy to o większej liczbie wytworzonych drobnych korzeni u siewek z płodozmianem niż u siewek kontrolnych. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w powierzchni drobnych korzeni pomiędzy siewkami dębowymi rosnącymi w wazonach z płodozmianem i kontrolnych. Jednak tendencja do zwiększania powierzchni drobnych korzeni została zauważona (Tab. 11).

Tabela 11. Parametry biometryczne korzeni drobnych dębu szypułkowego hodowanych w glebie po zastosowaniu mieszanki nawozu zielonego pobranej z Nadl. Bielsk

Suma rang				
	Nawóz zielony	Kontrola (ugór czarny)	U	p
TRL	272	193	73	0,106
FRL	263	202	82	0,213
FRL/MRL	286	179	59	0,028
FRSA	270	195	75	0,125

Test U Manna-Whitneya, $\alpha=0,05$, N=15

Wyniki badań szklarniowych nad wpływem towarzyszących roślin uprawnych wykazały, że najmniejsze długości części nadziemnych przyjmowały buki rosnące w pojemniku razem z gryką. Wartości median dla wszystkich wariantów były na bardzo zbliżonym poziomie (Tab. 12), a porównanie długości części nadziemnej nie wykazało statystycznie istotnych różnic. Wartość prawdopodobieństwa testowego dla porównania median wyniosła 0,1093.

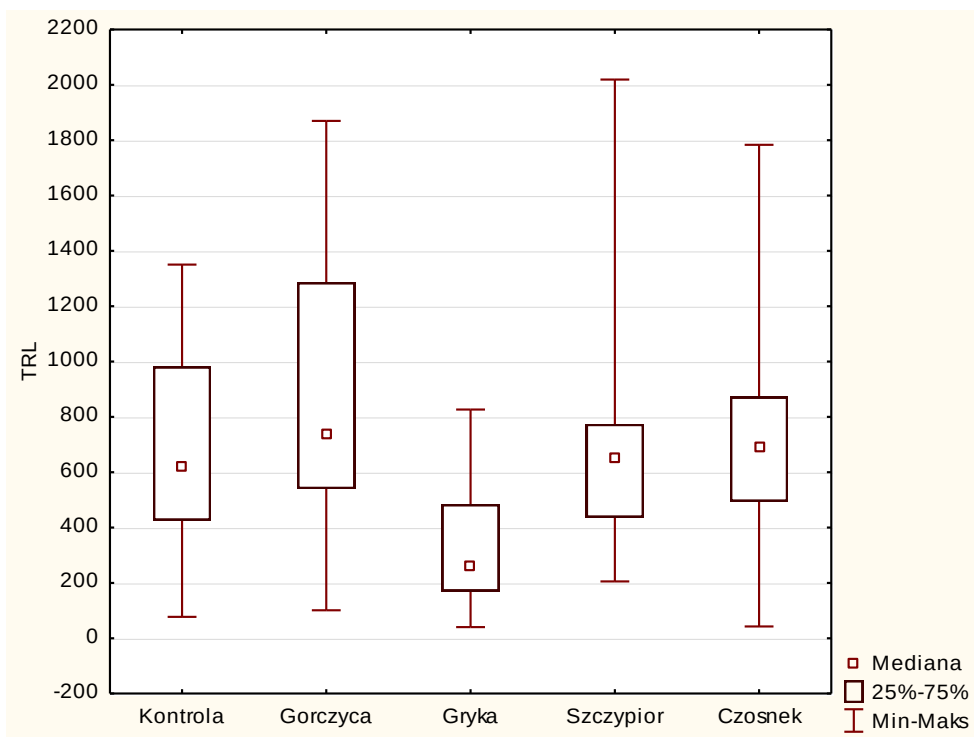
Porównanie omawianych wariantów pod względem grubości szyi korzeniowej wykazało istotne statystycznie różnice ($p=0,0085$). Różnice wystąpiły pomiędzy wariantem gdzie razem z bukami w pojemniku rosły gryka i czosnek. W pierwszym wariancie grubości były najmniejsze natomiast w drugim największe ze wszystkich badanych prób (Tab. 12).

Tabela 12. Parametry biometryczne siewek buka zwyczajnego hodowanego w szklarni w różnych wariantach ugoru zielonego

		Kontrola	Gorzycza	Gryka	Szczypior	Czosnek
Długość pędu (cm)	<i>m</i>	130,04	117,84	101,09	126,5	132,81
	<i>Me</i>	120	115	98,5	120	120
Długość korzenia (cm)	<i>m</i>	273,65	289,02	253,68	273,88	291,74
	<i>Me</i>	265	280	224	270	275
Grubość szyi korzeniowej (cm)	<i>m</i>	2,56	2,45	2,15	2,16	2,79
	<i>Me</i>	2,47	2,49	2,15	2,18	2,8

m - średnia arytmetyczna; *Me* - mediana

Pomiary całkowitej długości systemów korzeniowych (TRL) wykonane przy pomocy skanera wodnego i oprogramowania WinRhizo wykazały, że najwyższe wartości tego parametru przyjmowały sadzonki z wariantu, gdzie razem z bukami rosła gorzycza, najmniejsze natomiast w wariantcie z gryką (Ryc. 8).



Ryc. 8. Wpływ towarzyszących roślin uprawnych na długość korzeni (TRL) sadzonek buka zwyczajnego

Porównanie median za pomocą testu Kruskala-Wallisa wskazuje, że istotne statystycznie różnice przy przyjętym poziomie istotności $\alpha=0,05$ ($p=0,0000$) wystąpiły w wariancie z dodatkiem gryki. Jednoroczne sadzonki bukowe miały najniższe wartości omawianego parametru.

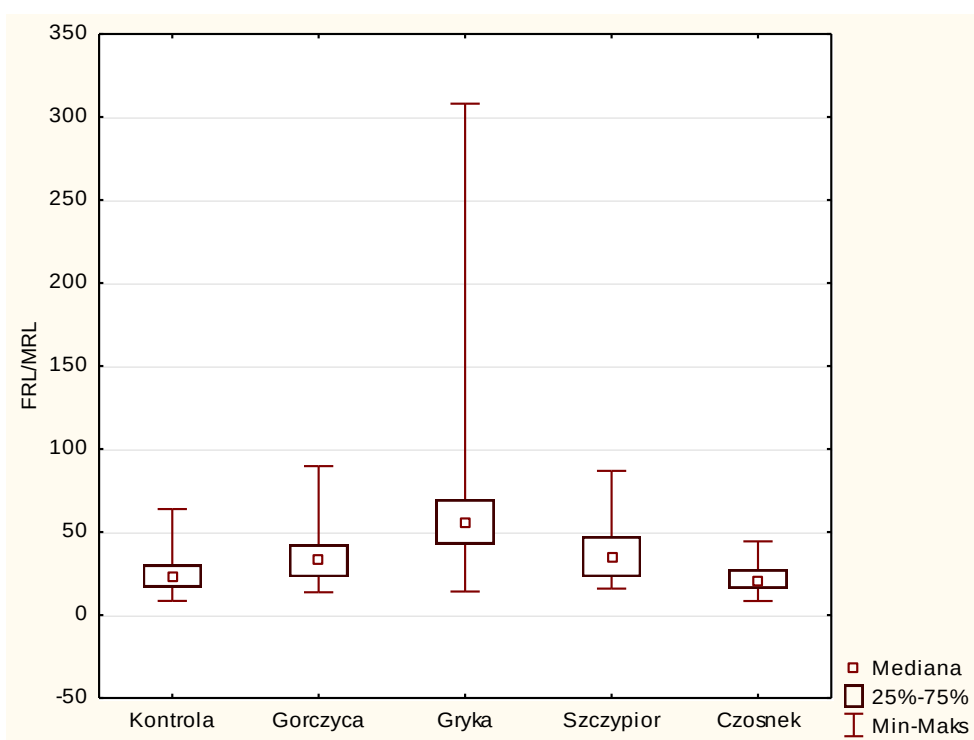
Tabela 13. Parametry biometryczne korzeni drobnych buka zwyczajnego hodowanego w szklarni w różnych wariantach ugoru zielonego

		Kontrola	Gorczyca	Gryka	Szczypior	Czosnek
TRL	<i>m</i>	693,33	890,45	327,34	719,38	703,31
	<i>Me</i>	618,24	739,25	264,34	651,24	690,43
FRL	<i>m</i>	649,94	849,22	320,84	686,35	646,87
	<i>Me</i>	574,92	680,42	253,05	610,18	624,74
FRL/MRL	<i>m</i>	24,6	34,77	84,25	38,81	22,76
	<i>Me</i>	22,93	32,94	56,08	35,41	20,27
FRSA	<i>m</i>	27,22	32,9	41,75	39,96	28,61
	<i>Me</i>	23,81	27,91	36,65	28,64	27,07

m - średnia arytmetyczna; *Me* - mediana

Kolejnym porównywanym parametrem były długości korzeni drobnych w wariantach gdzie razem z bukami rosły gorczyca, gryka, szczypior i czosnek. Podobnie jak czy pomiarach całkowitej długości systemów korzeniowych najdłuższe korzenie drobne zaobserwowano u drzewek, które rosły razem z gorczycą a najkrótsze w wariacie z gryką (Tab. 13). Analiza statystyczna wykazała, że sadzonki bukowe rosnące z gryką miały istotnie statystycznie krótsze korzenie drobne od pozostałych wariantów doświadczalnych ($p=0,000$).

Analizie poddano również stosunek długości korzeni drobnych do długości korzeni matecznych. Wartość prawdopodobieństwa testowego dla tej analizy wyniosła 0,000, oznacza to istotne statystycznie różnice pomiędzy wariantami. Po przeprowadzeniu analizy polegającej na porównaniach wielokrotnych zaobserwowano, że od wariantu kontrolnego istotnie różniły się warianty gdzie buki rosły z gryką i szczypiozem. Gryka różniła się istotnie od wszystkich wariantów, z wyjątkiem szczypioru, przyjmując najwyższe wartości (Ryc. 9). Wariant z czosnkiem różnił się istotnie statystycznie od pozostałych wariantów (za wyjątkiem kontroli) i wartości te były najniższe.



Ryc. 9. Wpływ towarzyszących roślin uprawnych na udział korzeni drobnych (FRL/MRL)

Ostatnim porównywamy parametrem były powierzchnia zajmowana przez korzenie drobne buków rosnących w wariantach z gryką, szczypiorem, czosnkiem, gorczycą oraz w wariancie kontrolnym. Wartość prawdopodobieństwa testowego przy porównywaniu tej cechy wyniosła 0,3025, wskazuje to na brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy wariantami założonymi w doświadczeniu.

Dyskusja

Grubość szyjek korzeniowych jest ważnym parametrem często brany pod uwagę przy ocenie jakości i zdrowotności materiału sadzeniowego. W przypadku zastosowania gryki w Nadleśnictwie Bielsk parametr ten zwiększył się znacząco, co potwierdziły testy statystyczne. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku mieszaniny nawozów zielonych w Nadleśnictwie Nowogród.

Inne parametry biometryczne, takie jak długość części nadziemnych i korzeni są mniej skorelowane ze zdrowotnością siewek. W tym przypadku również stwierdzono korzystne oddziaływanie nawozów zielonych, szczególnie w Nadleśnictwie Nowogród, na główne pędy siewek dębowych (różnice istotne statystycznie). Jedynie w przypadku zastosowania gryki w Nadleśnictwie Bielsk parametry te u siewek dębowych były niższe niż u kontrolnych, chociaż uzyskane różnice okazały się być nieistotne statystycznie. Być może fitoncydy produkowane przez grykę mają właściwości inhibujące rozwój korzeni, a co za tym idzie i rozwój części nadziemnych.

Wnioski

1. Zastosowanie w płodozmianie mieszanki roślin wchodzących w skład nawozów zielonych nie wpłynęło na rozwój systemów korzeniowych u badanych siewek dębowych; zarówno całkowita długość, jak i długość ich drobnych korzeni nie różniła się w porównaniu do tych samych parametrów u siewek kontrolnych.

2. Zastosowanie mieszanki roślin wchodzących w skład nawozów zielonych wpłynęło niekorzystnie na powierzchnię drobnych korzeni u siewek dębu w Nadl. Nowogród.

3. Zastosowanie gryki jako przedplonu nie miało wpływu na przyrost części nadziemnej oraz długość głównego korzenia siewek dębu, natomiast wpłynęło korzystnie na grubość szyi korzeniowej oraz ilość drobnych korzeni u tychże siewek.

5. Przedplon z gryki wpłynął negatywnie na parametry wzrostu siewek buka, podczas gdy gorczyca, czosnek oraz szczypior wykazywały oddziaływanie pozytywne.

3.3. Wpływ stymulatorów wzrostu oraz nawozów fosforowych na odporność roślin na choroby grzybowe

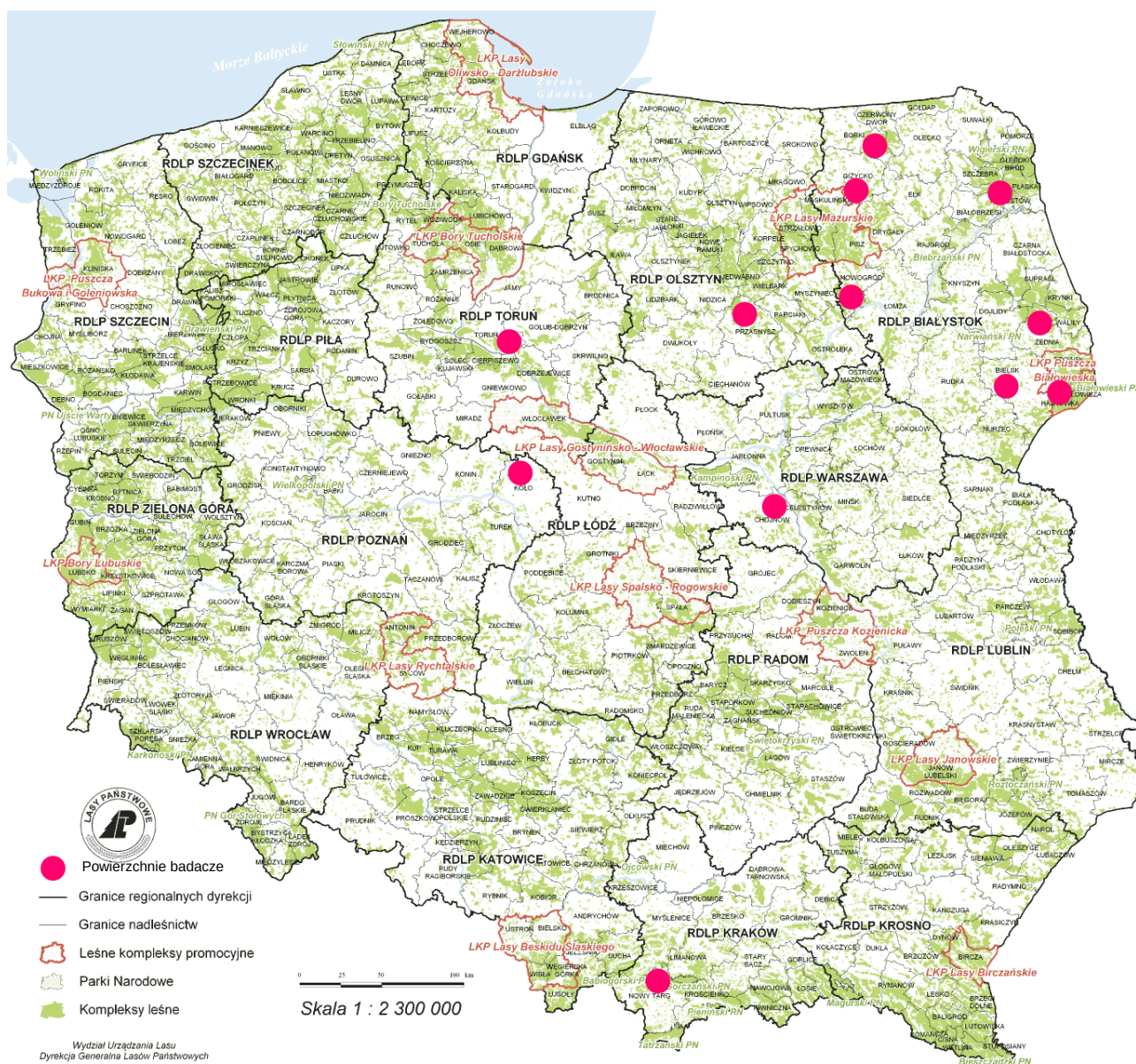
3.3.1. Rozwój sadzonek

Celem pracy było testowanie skuteczności stymulatorów wzrostu na rozwój sadzonek dębu, buka, sosny, świerka i olszy. Do badań wybrano środki: Grevitax, Actifos, Phos 60, fosforyn potasu, Zielony Busz, Zielony Busz Forte, Florovit, Bioekor, nawozy azotowe (mocznik, saletra amonowa) oraz Efektywne Mikroorganizmy, a następnie sprawdzono ich skuteczność na terenie szkółek leśnych zlokalizowanych na terenie całego kraju.

Metodyka

Powierzchnie doświadczalne - do przeprowadzenia analizy mającej na celu porównanie skuteczności różnych preparatów zebrano materiał ze szkółek leśnych znajdujących się na terenie Nadleśnictw: Augustów, Borki, Chojnów, Giżycko, Hajnówka, Jawor, Koło, Przasnysz, Nowy Targ, Toruń oraz Żednia (Ryc. 10). Na każdej z wymienionych szkółek założono powierzchnię doświadczalną, na której zastosowano oprysk oraz dla porównania powierzchnię kontrolną, na której nie wykonywany był żaden zabieg. Poletka kontrolne oraz zabiegowe oddzielone były od siebie strefą buforową – pasem ziemi, na którym nie wykonywano żadnych zabiegów. Materiał do badań pobierano w 2011, 2012 i 2013 roku. Nawożenie było wykonywane w godzinach porannych, przy średnim zachmurzeniu i lekkim wietrze w temperaturze ok. 20 °C.

Z wymienionych powierzchni zebrano sadzonki z każdego wariantu (próby kontrolnej oraz wykonanego zabiegu) oraz z każdego powtórzenia (w większości szkółek zakładano więcej niż jedną powierzchnię doświadczalną w wariantach kontrolnym i zabiegu), a następnie mierzono długość części nadziemnej każdej sadzonki oraz długość korzenia. Uzyskane w ten sposób dane porównywano przy użyciu testów statystycznych Manna-Whitneya (analiza jednoczynnikowa) oraz ANOVA rang Kruskala-Wallisa (analiza wieloczynnikowa).



Ryc. 10. Położenie powierzchni doświadczalnych w szkółkach leśnych

Opis preparatów

ACTIFOS (dawniej AGROPHOS firmy Agropak) jest płynnym nawozem dolistnym do uzupełniającego nawożenia azotem oraz mikroelementami w celu pobudzenia wzrostu. Dopuszczony do obrotu Decyzją Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi Nr 241/10, ze względu na swoje specyficzne właściwości w bardzo istotnym stopniu hamuje rozwój niektórych chorób grzybowych. W przypadku drzew iglastych regularne stosowanie pozwala zminimalizować ryzyko wystąpienia niezwykle groźnej i powszechnej choroby – fytoftorzy.

BIOEKOR dla szkółek leśnych – jest to wieloskładnikowy dolistny nawóz płynny przeznaczony do stosowania tak dla roślin iglastych jak i liściastych w stężeniu od 0,5% do 1,0%. Zawartość azotu ogólnego (N) wynosi 8,5%, fosforu (P_2O_5) – 3,0%, potasu (K_2O) – 4,4% oraz mieszaninę mikroelementów takich jak bor (B), miedź (Cu), żelazo (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo) i cynk (Zn). Nie zawiera chlorków. Nawożenie dolistne lub podlewanie przy założeniu 1% stężenia nawozu w cieczy roboczej (400 l/ha).

FLOROVIT - zawiera zestaw makroskładników pokarmowych oraz mikroelementów w postaci schelatowanej. Azot (N) – 3,0% (postać amidowa – 2,3%; postać azotanowa – 0,7%); potas (K) – 2,0%; miedź (Cu) – 70 mg/l; żelazo (Fe) – 400 mg/l; mangan (Mn) – 170 mg/l; molibden (Mo) – 20 mg/l; cynk (Zn) – 150 mg/l oraz wapń (Ca), magnez (Mg), siarka (S), a także substancje błonkotwórcze. Odczyn (pH) roztworu 3,3-4,3. Nawożenie dolistne lub podlewanie przy założeniu 1% stężenia nawozu w cieczy roboczej (400 l/ha).

PHOS 60 (Proagro GmbH) jest nawozem płynnym o działaniu fungistatycznym do aplikacji nalistnej lub dogłębowej. Phos 60 pobudza układ odpornościowy roślin poprzez indukowanie akumulacji w komórkach naturalnych ciał odpornościowych (fitoaleksyn). Wzmacnia także strukturę błony i ścian komórkowych, dzięki czemu stanowią one lepszą fizyczną barierę dla wnikania patogenów. W składzie zawiera 43% P_2O_5 w formie mieszaniny fosforu amoniu i potasu.

ZIELONY BUSZ (Himal) jest nawozem mineralno-organicznym służącym do zastosowania dolistnego, z dodatkiem adiuwanta. Zawiera mydło Himal, wyciąg z piołunu, czosnku, pokrzywy i alg. Ponadto występują tu takie mikroelementy jak: Cu, Co, Zn, Mo, B oraz inne składniki pochodzące z wyciągów roślinnych. Głównym celem zastosowania tego nawozu jest wzmocnienie rośliny na działanie stresu fizjologicznego wpływającego negatywnie na zdrowotność rośliny. Badania producenta dowodzą, że dzięki temu siewki są żywotniejsze i stwarzają naturalny opór przeciwko czynnikom szkodliwym, jakimi są np. patogeniczne grzyby. Na życzenie ZOL IBL firma Himal przygotowała **ZIELONY BUSZ FORTE** z dodatkiem **fosforu i potasu**.

GREVITAX jest środkiem pochodzenia naturalnego opartym na ekstrakcji fitoncydów z grejpfruta. Grevitax jako środek biobójczy zalecany jest w ochronie wielu gatunków roślin przed chorobami bakteryjnymi i pochodzenia grzybowego w uprawach zintegrowanych. Badania Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach wykazały dużą skuteczność tego środka w ochronie warzyw przed szkodami biotycznymi.

EFEKTYWNE MIKROORGANIZMY to mieszanka mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych, które koegzystują w obrębie wspólnej przestrzeni na zasadzie symbiozy. Żaden z preparatów Technologii Efektywne Mikroorganizmy™ nie zawiera elementów modyfikowanych genetycznie ani chemicznych składników używanych w produkcji nawozów, herbicydów czy pestycydów. Producent Greenland Technologia zapewnia, że preparat EM naturalnie aktywny poprawia strukturę gleby, powoduje szybki rozkład resztek roślinnych, hamuje procesy przenoszenia chorób odglebowych, pomaga wiązać wolny azot z powietrza, intensyfikuje rozwój systemów korzeniowych, stwarza warunki do lepszego przyswajania nawozów przez co poprawia kondycję i zdrowia roślin.

MOCZNIK – uniwersalny jednoskładnikowy nawóz azotowy stosowany doglebowo z możliwością sporządzania roztworów wodnych do nawożenia dolistnego o zawartości azotu (N) 46%. W doświadczeniu wykorzystany został w formie nawozu dolistnego mającego dostarczyć łącznie 24 kg N/ha w stężeniu 1 % N w 400 litrach cieczy roboczej na hektar

SALETRA AMONOWA – granulowany nawóz azotowy o całkowitej zawartości azotu 34% przeznaczony do stosowania doglebowego. W doświadczeniu stosowano jednorazowo dawkę 24 kg N/ha.

Zabiegi

ZIELONY BUSZ

Wpływ preparatu Zielony Busz testowano w szkółkach leśnych „Budy” (Nadl. Augustów), „Jelenia Góra” (Nadl. Giżycko) oraz „Karwacz” (Nadl. Przesnysz). W badaniach wykorzystano sadzonki dębu szypułkowego, buka zwyczajnego, olszy czarnej, sosny zwyczajnej oraz świerka pospolitego.

Na terenie szkółki leśnej Budy testowano wpływ preparatu Zielony Busz na wzrost sadzonek olszy czarnej (kw. I) oraz dębu szypułkowego (kw. III). Na powierzchniach wykonano oprysk środkiem Zielony Busz, o stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta. W 2011 roku na kwaterze I oprysk wykonano tylko raz (2 września), natomiast w roku 2012 zabiegi powtórzono czterokrotnie w terminach: 15 V, 06 VI, 29 VI oraz 15 VIII. Dla porównania skuteczności działania tego preparatu z każdej powierzchni zabiegowej zebrano do analiz po 10 sadzonek oraz tyle samo z powierzchni kontrolnych. Wiosną 2012 r. na powierzchni badawczej na kwaterze I (Olcz) wykonano zabieg podcinania systemów

korzeniowych. Na kwaterze III w analogiczny sposób zastosowano preparat Zielony Busz o stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta. Opryski wykonano w roku 2012 czterokrotnie w terminach: 25 VI, 17 VII, 01 VIII oraz 22 VIII. Do badań zebrano łącznie 10 sztuk sadzonek z powierzchni kontrolnej oraz powierzchni zabiegowej.

Na terenie szkółki leśnej „Jelenia Góra” (Nadl. Giżycko) wytypowano trzy powierzchnie, na których zastosowano środek Zielony Busz oraz odpowiadające im trzy powierzchnie kontrolne. Badania prowadzono na sadzonkach sosny zwyczajnej oraz świerka pospolitego. W 2012 roku pierwszy oprysk wykonano 04 VI, zastosowano wtedy preparat Zielonego Buszu o stężeniu 5%, natomiast kolejny oprysk wykonano 19 VI stosując preparat o stężeniu 3%. Z każdej powierzchni zebrano następnie po 10 sadzonek (30 dla powierzchni opryskanej preparatem Zielony busz + 30 z próby kontrolnej).

Na terenie szkółki leśnej „Karwacz” (Nadl. Przasnysz) założono powierzchnie doświadczalne w 3 jednakowych powtórzeniach, na których testowano skuteczność preparatu Zielony Busz w stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta oraz analogiczne powierzchnie kontrolne. Na powierzchni tej rosły buki (Ryc. 11), które w 2011 roku miały dwa lata. W 2011 roku dwukrotnie wykonano opryskiwanie w terminach 10 i 17 VIII, natomiast w 2012 roku oprysk powtórzono czterokrotnie w terminach: 28 VI, 17 VII, 25 VIII oraz 11 IX. Z poletek doświadczalnych pozyskano materiał zarówno w 2011 roku jak i 2012, pobierając każdorazowo po 10 sadzonek. Wiosną 2012 roku na powierzchni wykonano zabieg podcinania korzeni.



Ryc. 11. Powierzchnia doświadczalna w Nadleśnictwie Przasnysz

ZIELONY BUSZ FORTE

Wpływ preparatu Zielony Busz Forte testowano w szkółce leśnej „Budy” (Nadl. Augustów) oraz szkółce w Nadleśnictwie Chojnów. W badaniach wykorzystano sadzonki olszy czarnej, buka zwyczajnego oraz dębu szypułkowego. W szkółce „Budy” w badaniach zastosowano preparat Zielony Busz Forte o stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta. W 2011 roku oprysk wykonano tylko raz (01 IX), natomiast w roku 2012, nawożenie odpornościowe wykonano czterokrotnie w terminach: 15 V, 06 VI, 29 VI oraz 15 VIII. Do analizy zebrano po 10 sztuk sadzonek z powierzchni, na której stosowano oprysk oraz z tyle samo z powierzchni kontrolnej. Wiosną 2012 r. na powierzchni badawczej wykonano zabieg podcinania systemów korzeniowych.

W szkółce w Nadl. Chojnów w 2012 roku wykonano dwukrotnie (18 VI i 2 VII) oprysk sadzonek dębu, olszy oraz buka preparatem Zielony Busz Forte w stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta. Do analizy pobrano po 25 sztuk sadzonek z poletek zabiegowych oraz kontrolnych (po 5 z każdego powtórzenia).

FOSFORYN POTASU

Na terenie szkółki leśnej „Budy” (Nadl. Augustów) testowano wpływ fosforynu potasu na wzrost sadzonek olszy czarnej. W 2011 roku zabieg wykonano na każdej powierzchni dwukrotnie w terminach 24 VIII oraz 20 IX, natomiast w roku 2012 nawożenie powtórzono czterokrotnie w terminach: 15 V, 06 VI, 29 VI oraz 15 VIII. Do analizy laboratoryjnej zebrano po 10 sadzonek wybranych losowo z każdej powierzchni, na której zastosowano oprysk oraz tyle samo sadzonek z powierzchni kontrolnej. Wiosną 2012 r. na powierzchni badawczej wykonano zabieg podcinania systemów korzeniowych.

ACTIFOS

Wpływ preparatu Actifos testowano w szkółkach leśnych „Zielonki” (Nadl. Borki), „Jelenia Góra” (Nadl. Giżycko), „Kiejsze” (Nadl. Koło), „Beskid” (Nadl. Nowy Targ), „Karwacz” (Nadl. Przesnysz), „Janowo” (Nadl. Toruń), „Podozierany” (Nadl. Żednia) oraz szkółka „Żabieniec” w Nadl. Chojnów. W badaniach wykorzystano sadzonki dębu szypułkowego, buka zwyczajnego, olszy czarnej, sosny zwyczajnej oraz świerka pospolitego.

Na terenie szkółki leśnej „Zielonki” wyznaczono dwie powierzchnie badawcze, na których rosły jednoroczne sadzonki dębu szypułkowego (Ryc. 12). W 2011 roku wykonano zabieg preparatem Actifos o stężeniu 13,3% (14 VII). Do analizy zebrano po 15 sadzonek z każdej z powierzchni w 2011 roku natomiast w roku 2012 po 20 sadzonek.



Ryc. 12. Powierzchnia doświadczalna w Nadleśnictwie Borki.

Na terenie szkółki leśnej „Jelenia Góra” wytypowano trzy powierzchnie, na których zastosowano środek Actifos oraz odpowiadające im trzy powierzchnie kontrolne. Analizowanym gatunkiem były jednoroczne siewki sosny zwyczajnej oraz świerka pospolitego. W 2012 roku wykonano oprysk jedynie raz (04 VI), stosując środek Actifos o stężeniu 6%. Z każdej powierzchni zebrano następnie po 10 sadzonek (30 z powierzchni opryskanej preparatem Actifos + 30 z próby kontrolnej).

W szkółce w Nadl. Chojnów dla każdego badanego gatunku (dąb, olsza, buk) wyznaczono pięć poletek zabiegowych oraz odpowiadające im poletki kontrolne. W 2012 roku wykonano dwukrotnie (20 VI i 4 VII) oprysk sadzonek preparatem Actifos w stężeniu

zgodnym z zaleceniami producenta (0,6%). Do analizy pobrano po 25 sztuk sadzonek z poletek zabiegowych oraz kontrolnych (po 5 z każdego powtórzenia).

W Nadleśnictwie Koło powierzchnie doświadczalne założono na terenie szkółki gospodarczej „Kiejsze”. Gatunkiem analizowanym w tym doświadczeniu były dwuletnie sadzonki olszy czarnej. Preparatem zastosowanym do nawożenia był Actifos o stężeniu 0,6%, zabieg wykonano 15.05.2011 roku. Z powierzchni kontrolnych pobrano 15 sztuk sadzonek oraz kolejne 15 sztuk z powierzchni opryskiwanej. Rok później zastosowano ponownie preparat o stężeniu 0,6% (12 IX). Po zakończeniu sezonu wegetacyjnego w 2012 roku z powierzchni na szkółce zebrano losowo po 10 drzew z każdego wariantu. Wiosną 2012r. wykonano zabieg podcinania systemów korzeniowych.

Na terenie szkółki „Karwacz” testowano skuteczność preparatu Actifos, w stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta, w odniesieniu do poletek kontrolnych na których nie prowadzono zabiegów. Na powierzchni tej rosły buki, które w 2011 roku miały dwa lata. Z powierzchni tych pozyskano materiał zarówno w 2011 roku jak i 2012. W 2011 roku dwukrotnie wykonano opryskiwanie preparatem Actifos w terminach 10 i 17 sierpnia. W 2012 roku oprysk powtórzono czterokrotnie w terminach: 28 VI, 17 VII, 25 VIII oraz 11 IX. Zarówno podczas pierwszego pobierania sadzonek jak i drugiego z każdej powierzchni zebrano po 10 sadzonek. Wiosną 2012 roku na powierzchni wykonano zabieg podcinania korzeni.

Na terenie Nadleśnictwa Nowy Targ badania przeprowadzono na powierzchni szkółki leśnej w leśnictwie Beskid. W 2010 roku założono po dwie powierzchnie na sześciu różnych kwaterach, na których rosły dwuletnie sadzonki olszy czarnej. Powierzchnie badane opryskano preparatem Actifos o stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta. Zabiegi wykonano w 2011 roku w terminach: 01 VIII, 07 VIII, 14 VIII oraz 21 VIII. Po zakończeniu sezonu wegetacyjnego z każdej powierzchni zebrano po 15 sadzonek.

Na terenie Nadleśnictwa Toruń w 2012 roku założono powierzchnie badawcze na szkółce gospodarczej „Janowo”, na których rosły dwuletnie sadzonki dębu szypułkowego (Ryc. 13). Trzy wytypowane powierzchnie opryskano preparatem Actifos o stężeniu 5%, powierzchnie te zostały porównane z próbą kontrolną. Zabiegi wykonano dwukrotnie w terminach 14 VII oraz 20 VII. Po zakończeniu sezonu wegetacyjnego zebrano po 15 sztuk z każdej z powierzchni (3 powierzchnie kontrolne oraz 3 zabiegowe).



Ryc. 13. Powierzchnia doświadczalna w Nadleśnictwie Toruń (dąb).

Powierzchnie badawcze zlokalizowano także na terenie szkółki leśnej „Podozierany”. Na dwóch kwaterach, na których rosły dwuletnie dęby szypułkowe (Ryc. 14) założono powierzchnię kontrolną oraz powierzchnię, która opryskana została środkiem Actifos o stężeniu 0,6%. W 2011 roku oprysk preparatem wykonano dwukrotnie w terminach: 11 VI oraz 09 VII. Po zakończeniu sezonu wegetacyjnego z każdej z powierzchni zebrano losowo po 5 sadzonek, co łącznie dało 10 sztuk z powierzchni kontrolnej oraz 10 z powierzchni zabiegowej.



Ryc. 14. Powierzchnia doświadczalna w Nadleśnictwie Żednia (dąb).

PHOS 60

W Nadl. Hajnówka w szkółce leśnej „Budy” na jednej z kwater produkcyjnych w połowie czerwca 2013r. założono doświadczenie (łącznie na 18 powierzchniach badawczych: 9 dla świerka i 9 dla dębu, o długości 2 m każda). Poletka doświadczalne umiejscowione były na pasie produkcyjnym o szerokości 1 m. Każda z powierzchni była oddzielona strefami buforowymi o takich samych wymiarach 1m x 2m. Na powierzchniach badawczych wykonano dolistne opryski dwuletnich, szkółkowanych sadzonek świerka pospolitego (2/1) oraz jednoroczne, nieszkółkowane sadzonki dębu szypułkowego (1/0). Opryski wykonano nawozem PHOS 60 o stężeniu zalecanym przez producenta (0,5%). Opryski przeprowadzano trzykrotnie w odstępie 7 dni (między 18 VI a 17 VII). Aby określić przyrosty wysokości wybrano losowo po 50 sadzonek z każdej kombinacji. Dodatkowo, korzenie poddano analizie na skanerze korzeni EPSON Perfection V700 Photo z oprogramowaniem WinRHIZO oraz oznaczono suchą biomasę korzeni i pędów.



Ryc. 15. Powierzchnia doświadczalna w Nadleśnictwie Toruń (sosna).

GREVITAX

Na terenie Nadleśnictwa Toruń powierzchnie badawcze założono na szkółce gospodarczej „Janowo”. W 2012 roku do analizy wytypowano sadzonki sosny zwyczajnej, (Ryc. 15), które opryskane zostały preparatem Grevitax o stężeniu 0,1%. Opryskano 3 powierzchnie, które porównano z powierzchniami kontrolnymi. Opryski wykonano

trzykrotnie w terminach: 21 VII, 28 VII oraz 04 VIII. Po zakończeniu sezonu wegetacyjnego z każdej z wymienionych powierzchni pobrano po 15 sadzonek, co dało łącznie 45 drzewek z powierzchni kontrolnej oraz 45 z powierzchni opryskanej.

EFEKTYWNE MIKROORGANIZMY (EM)

Wpływ preparatu EM testowano w szkółkach leśnych „Karwacz” (Nadl. Przesnysz), „Budy” (Nadl. Augustów), „Budy” (Nadl. Hajnówka) oraz „Żabieniec” (Nadl. Chojnów). W badaniach wykorzystano sadzonki dębu szypułkowego, buka zwyczajnego, olszy czarnej oraz sosny zwyczajnej.

Na kwaterze IV na terenie szkółki leśnej „Budy” (Nadl. Augustów) zastosowano nawożenie Efektywnymi Mikroorganizmami o stężeniu 0,06%. Na tej kwaterze wysadzono sosnę zwyczajną o symbolu 1/0, która została wyjęta wiosną 2012 roku. W 2011 roku wykonano jeden zabieg na powierzchni badanej (07 IX). Do analizy zebrano łącznie 10 sztuk sadzonek z powierzchni kontrolnych oraz 10 sztuk z powierzchni, na których stosowano oprysk.

Na terenie szkółki „Karwacz” zastosowano nawożenie Efektywnymi Mikroorganizmami, w stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta, w przeciwieństwie do poletek kontrolnych na których nie prowadzono zabiegów. Na powierzchni tej rosły buki, które w 2011 roku miały dwa lata. Z powierzchni tych pozyskano materiał zarówno w 2011 roku jak i 2012. W 2011 roku dwukrotnie wykonano nawożenie Efektywnymi Mikroorganizmami w terminach 10 i 17 sierpnia. W 2012 roku oprysk powtórzono czterokrotnie w terminach: 28 VI, 17 VII, 25 VIII oraz 11 IX. Zarówno podczas pierwszego pobierania sadzonek jak i drugiego z każdej powierzchni zebrano po 10 sadzonek. Wiosną 2012 roku na powierzchni wykonano zabieg podcinania korzeni.

W Hajnówce doświadczenia założono na szkółce leśnej „Budy” na jednej z kwater produkcyjnych, na której w połowie czerwca 2013r. założono doświadczenie (łącznie na 18 powierzchniach badawczych: 9 dla świerka i 9 dla dębu, o długości 2 m każda) umiejscowionych na grzędzie produkcyjnej o szerokości 1 m. Każda z powierzchni była oddzielona strefami buforowymi o takich samych wymiarach 1m x 2m. Na powierzchniach badawczych wykonano dolistne opryski dwuletnich, szkółkowanych sadzonek świerka

pospolitego (2/1) oraz jednoroczne, nieszkółkowane sadzonki dębu szypułkowego (1/0). Opryski wykonano preparatem z Efektywnymi Mikroorganizmami w stężeniach zalecanych przez producenta (10%). Opryski przeprowadzano trzykrotnie w odstępie 14 dni (18 VI-17 VII). Aby określić przyrosty wysokości wybrano losowo po 50 sadzonek z każdej kombinacji. Aby określić przyrosty wysokości wybrano losowo po 50 sadzonek z każdej kombinacji. Dodatkowo korzenie poddano analizie na skanerze korzeni EPSON Perfection V700 Photo z oprogramowaniem WinRHIZO oraz oznaczono suchą biomasę korzeni i pędów.

W szkółce w Nadl. Chojnów dla każdego badanego gatunku (dąb, olsza, buk) wyznaczono pięć poletek zabiegowych oraz odpowiadające im poletka kontrolne. W 2012 roku wykonano dwukrotnie (20 VI i 4 VII) nawożenie sadzonek preparatem zawierającym Efektywne Mikroorganizmy w stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta (10%). Do analizy pobrano po 25 sztuk sadzonek z poletek zabiegowych oraz kontrolnych (po 5 z każdego powtórzenia).

NAWOZY AZOTOWE

Na terenie szkółki leśnej „Muchów” w Nadleśnictwie Jawor testowano skuteczność nawozów azotowych na bazie mocznika (dolistnie) i saletry amonowej (doglebowo) oraz preparatów Florovit i Bioekor (dolistnie). W doświadczeniu wykorzystano dwuletnie sadzonki dębu szypułkowego. Na potrzeby doświadczenia przeznaczono jedną grzędę siewu dębu szypułkowego o długości 132 m, na której wyodrębniono cztery bloki podzielone na sześć odcinków każdy, odpowiadających wariantom doświadczenia. Testom poddano następujące warianty nawożenia:

1. Kontrola (brak nawożenia)
2. 6 x 4 kg N/ha 1% **mocznik** + 6 x 1% **Bioekor**
3. 6 x 4 kg N/ha 1% **mocznik** + 6 x 1% **Florovit**
4. 1 x 24 kg N/ha **saletra amonowa** + 6 x 1% **Bioekor**
5. 1 x 24 kg N/ha **saletra amonowa** + 6 x 1% **Florovit**
6. 1 x 24 kg N/ha **saletra amonowa** + 6 x 4 kg N/ha 1% **mocznik**

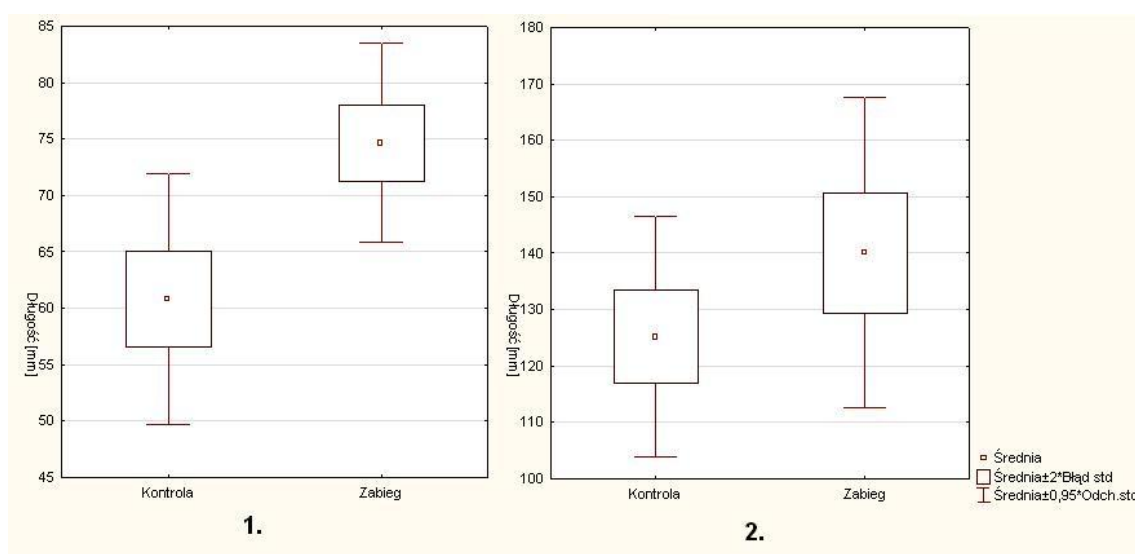
W roku 2012 nawożenia wykonywano w terminach 26 VI, 5 VII, 11 VII, 20 VII, 25 VII i 30 VII, natomiast w roku 2013 w terminach 12 VI, 21 VI, 6 VII, 15 VII, 25 VII i 2 VIII. Saletrę

amonową dodano do gleby przed rozpoczęciem oprysków: 25 VI w roku 2012 i 20 V w roku 2013.

Wyniki

ZIELONY BUSZ/ZIELONY BUSZ FORTE/FOSFORYN POTASU

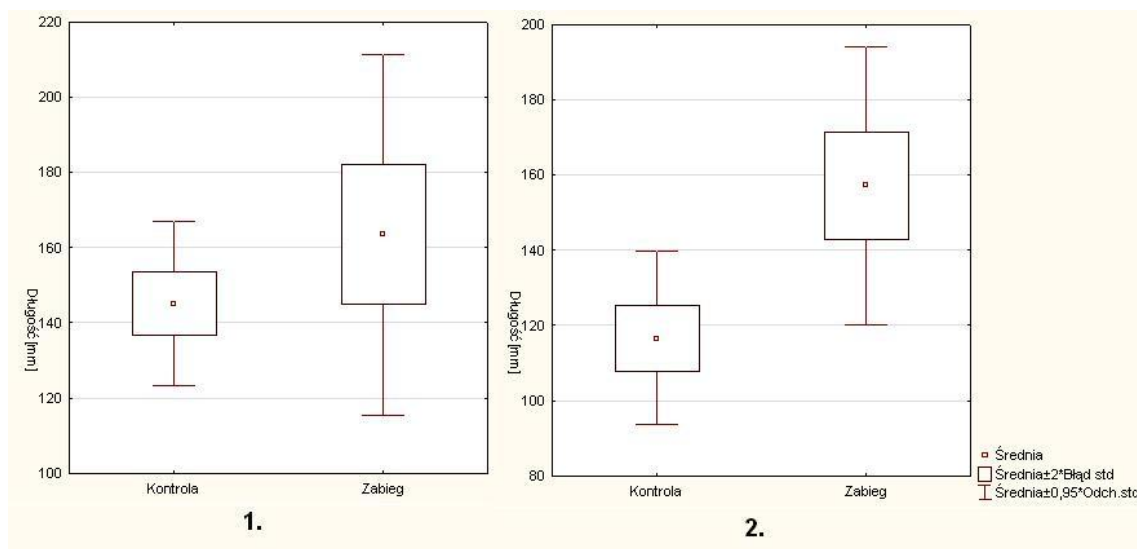
Skuteczność preparatu Zielony Busz stosowanego w szkółce „Jelenia Góra” w Nadl. Giżycko na jednorocznych siewkach sosny zwyczajnej i świerka pospolitego mierzono analizując parametry biometryczne siewek testowanych w porównaniu z kontrolnymi. Porównanie długości części nadziemnej oraz korzeni jednorocznych siewek sosny zwyczajnej między powierzchnią opryskaną preparatem Zielony Busz a powierzchnią kontrolną zilustrowano na rycinie 16. W obu wariantach, średnie długości osiągały większe wartości w przypadku stosowania oprysku preparatem Zielony Busz, jednak wartość prawdopodobieństwa testowego wskazuje na istotne statystycznie różnice tylko dla porównania długości części nadziemnej (p dla części nadziemnej: 0,000 i dla korzeni 0,095).



Ryc. 16. Wpływ preparatu Zielony Busz na długość części nadziemnej (1) i podziemnej (2) siewek sosny w szkółce Nadl. Giżycko

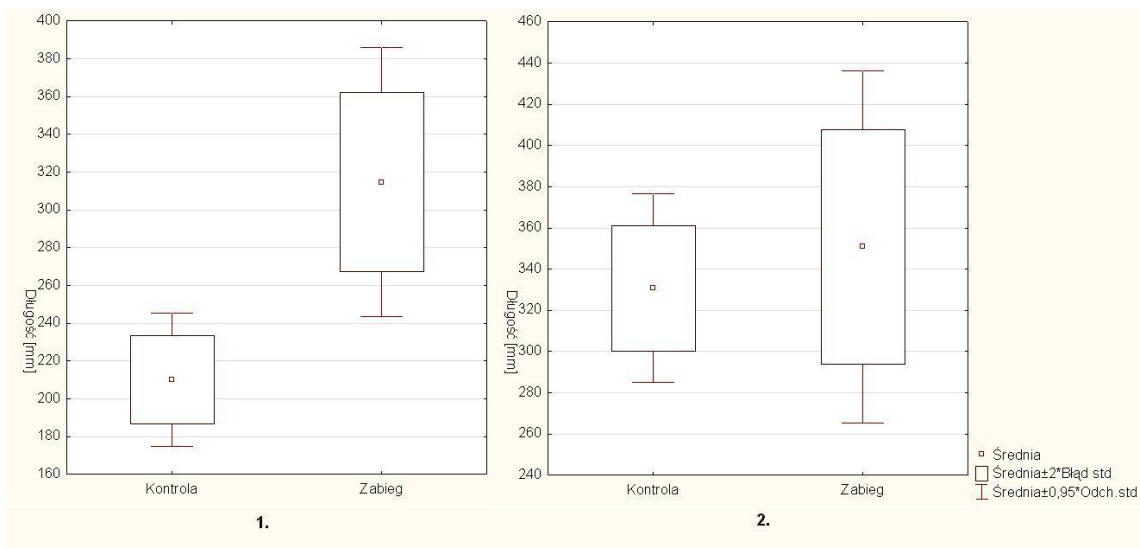
Porównanie długości części nadziemnej oraz podziemnej jednorocznych siewek świerka pospolitego z wariantu gdzie zastosowany był oprysk preparatem Zielony Busz wykazało, że wartości średnie z powierzchni zabiegowej były wyższe niż na powierzchni

kontrolnej (Ryc. 17). Istotność statystyczną różnic wykazano jedynie pomiędzy długościami części podziemnej ($p=0,000$; ryc. 17-1), natomiast dla części nadziemnej różnice te nie były na tyle duże, aby okazały się istotne statystycznie ($p=0,225$; ryc. 17-2).



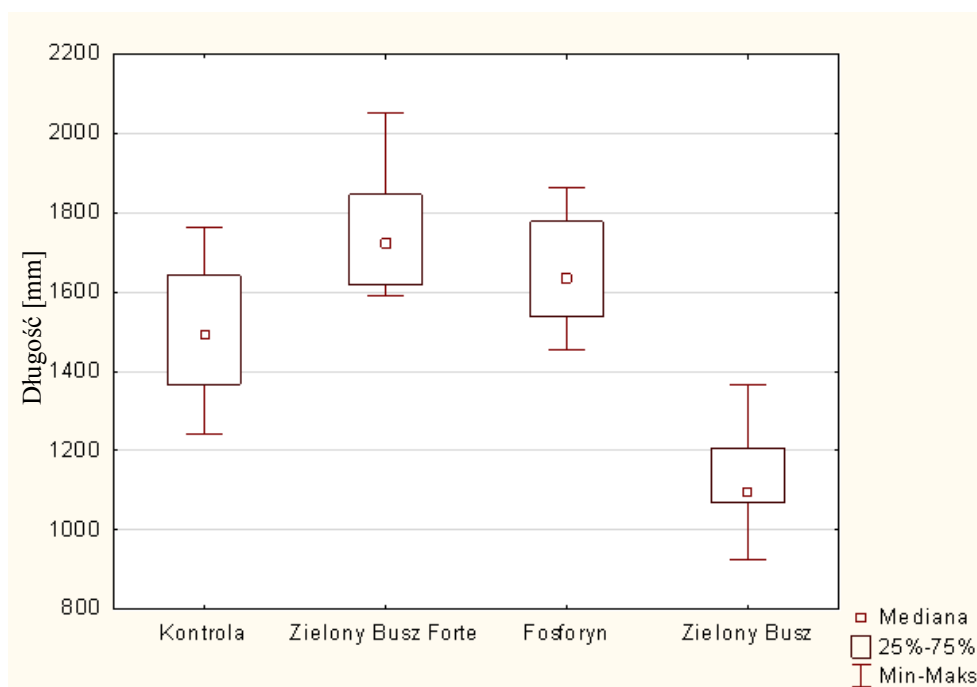
Ryc. 17. Wpływ preparatu Zielony Busz na długość części nadziemnej (1) i podziemnej (2) siewek świerka pospolitego w szkółce Nadl. Giżycko

Skuteczność preparatu Zielony Busz testowano na jednorocznych sadzonkach dębu szypułkowego w Nadleśnictwie Augustów. Pędy sadzonek opryskanych preparatem Zielony Busz osiągały większe rozmiary w porównaniu do kontroli: 315 mm vs. 210 mm. Analiza statystyczna wykazała istotność różnic pomiędzy wariantami ($p=0,004$). Porównując długości części podziemnej, rośliny z powierzchni opryskanej miały dłuższe korzenie (351 mm) niż rośliny kontrolne (331 mm), jednak różnice nie były na tyle duże, aby okazały się statystycznie istotne ($p=0,521$) (Ryc. 18).



Ryc. 18. Wpływ preparatu Zielony Busz na długość części nadziemnej (1) i podziemnej (2) sadzonek dębu szypułkowego w szkółce Nadl. Augustów

W tej samej lokalizacji na dwuletnich sadzonkach olszy czarnej testowano skuteczność preparatów Zielony Busz, Zielony Busz Forte oraz fosforyn potasu (Ryc. 19). Sadzonki te miały podcinany system korzeniowy w roku 2012. Średnia długość części nadziemnej sadzonek opryskanych preparatem Zielony Busz osiągnęła wartość 1126 mm, podczas gdy sadzonki kontrolne przyrastały na wysokość średnio 1508 mm. Na powierzchni, na której stosowano nawóz drzewka rosły o wiele gorzej niż na powierzchni kontrolnej, na której nie wykonano żadnego zabiegu ($p=0,001$). Nie zaobserwowano wpływu testowanego preparatu na długość korzeni ($p=0,064$), jednak jest to wynikiem zastosowanego zabiegu podcinania. Analiza długości części nadziemnej sadzonek traktowanych preparatem Zielony Busz Forte wykazała, że średnia wartość długości części nadziemnej drzewek opryskanych wynosi 1751 mm i jest znacznie wyższa niż tych z powierzchni kontrolnej (1504 mm). Analizy statystyczne wykazały istotność różnic pomiędzy wariantami przy $p=0,007$. Wartości średnie długości podciętych korzeni są bardzo do siebie zbliżone, a wartość prawdopodobieństwa wynosi 0,597; co wskazuje na brak istotnych statystycznie różnic. Średnie długości części nadziemnej dwuletnich sadzonek olszy opryskanych fosforynem potasu były do siebie zbliżone (zabieg: 1658 mm, kontrola: 1674 mm), a różnice te nie były istotne statystycznie ($p=0,734$). Statystycznie istotną różnicę wartości długości części podziemnej ($p=0,049$) uzyskano dla pomiaru korzeni sadzonek opryskanych (268 mm) w porównaniu z kontrolą (305 mm).



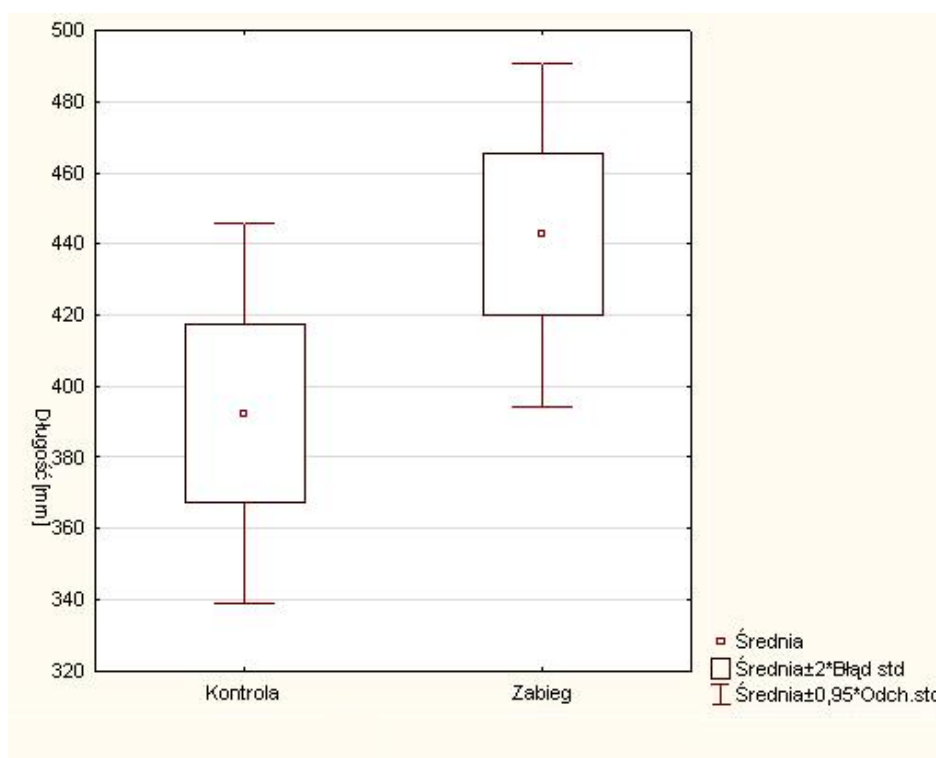
Ryc. 19. Wpływ preparatów Zielony Busz, Zielony Busz Forte oraz fosforyn potasu na długość części nadziemnej sadzonek olszy w szkółce Nadl. Augustów

ACTIFOS (Agrophos)

W pierwszym roku doświadczenia w szkółce leśnej „Zielonka” w Nadleśnictwie Borki testowano skuteczność preparatu Actifos względem jednorocznych sadzonek dębu szypułkowego. Długość części nadziemnej w wariancie kontrolnym wynosiła średnio 168 mm, natomiast w wariancie testowym średnio 191 mm. Długość części podziemnej w wariancie kontrolnym wynosiła średnio 191 mm, natomiast w wariancie testowym średnio 240 mm. Zaobserwowano większe wartości parametrów biometrycznych sadzonek opryskiwanych preparatem Actifos w porównaniu z kontrolnymi, jednak różnica średnich wartości długości części nadziemnych i podziemnych nie była istotna statystycznie. W przypadku części nadziemnej wartość prawdopodobieństwa testowego (p) wyniosła 0,431, natomiast dla korzeni 0,059 ($p > 0,05$).

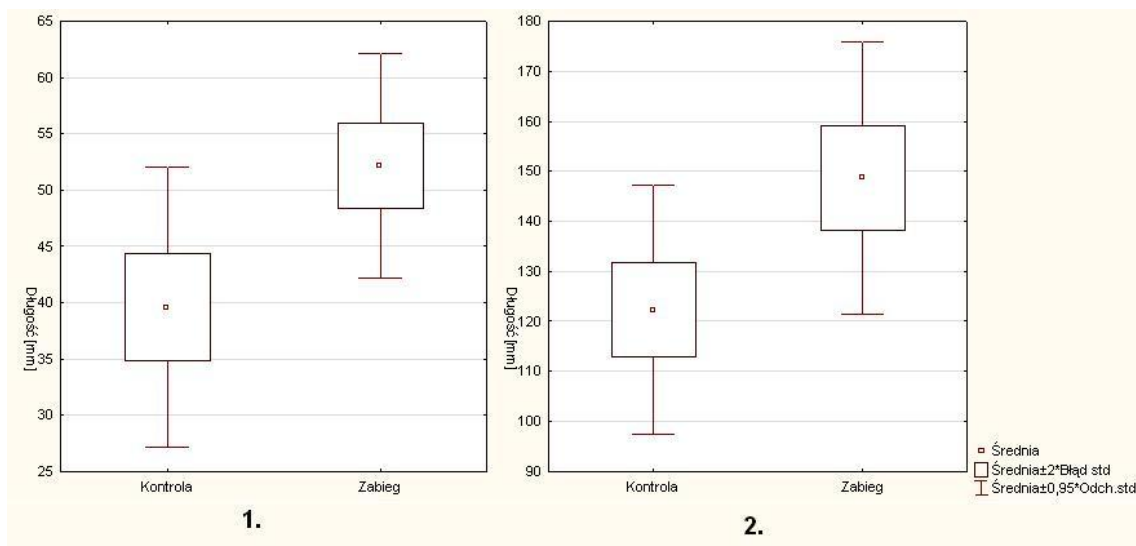
W kolejnym roku doświadczenia (2012) analizowano parametry biometryczne dwuletnich sadzonek dębu szypułkowego zebranych ze szkółki „Zielonka” w Nadleśnictwie Borki. Pobrałe sadzonki wiosną 2012r. miały podcinany system korzeniowy. Długość części nadziemnej w wariancie kontrolnym wynosiła średnio 392 mm, natomiast w wariancie

testowym średnio 443 mm. Długość części podziemnej w wariancie kontrolnym wynosiła średnio 384 mm, natomiast w wariancie testowym średnio 359 mm. Zaobserwowano, że sadzonki z powierzchni zabiegowej są znacznie większe od tych z powierzchni kontrolnej (Ryc. 20). Wartość prawdopodobieństwa testowego ($p=0,005$) wskazuje na istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi powierzchniami. Porównanie długości korzeni wskazuje na nieznacznie mniejsze wartości długości korzeni sadzonek opryskiwanych preparatem Actifos, jednak wpływ na wynik miał niewątpliwie zabieg podcinania systemów korzeniowych. Ponadto wartość prawdopodobieństwa testowego ($p=0,616$) nie wskazuje na istotne różnice pomiędzy długością systemów korzeniowych.



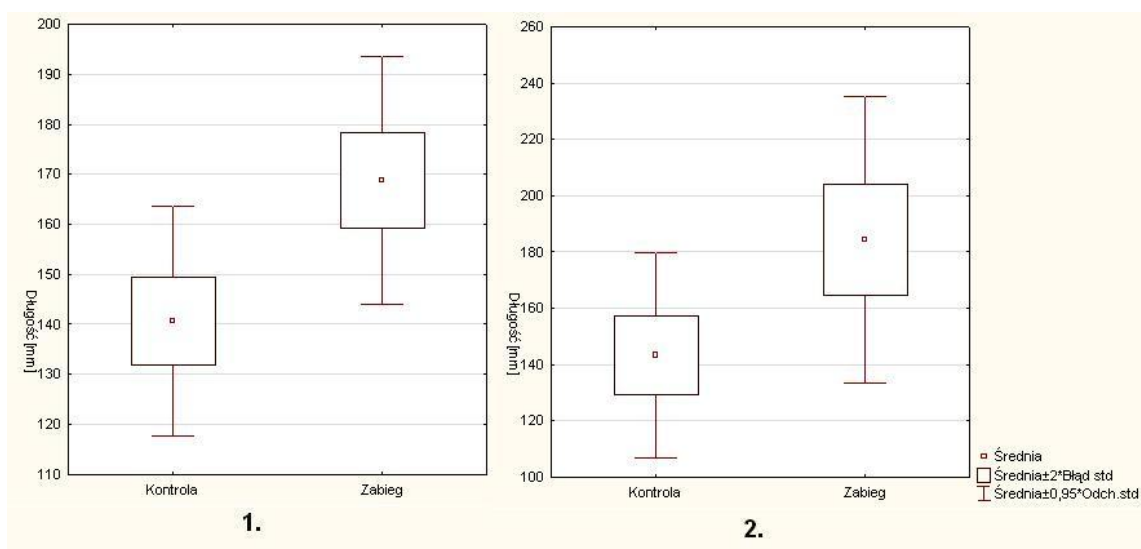
Ryc. 20. Wpływ preparatu Actifos na długość części nadziemnej sadzonek dębu szypułkowego w szkółce Nadl. Borki

Porównanie długości części nadziemnej oraz korzeni jednorocznych siewek sosny pospolitej w szkółce leśnej „Jelenia Góra” na terenie Nadleśnictwa Giżycko w wariancie gdzie zastosowano środek Actifos wykazało, że stosowanie tego preparatu powoduje silniejszy wzrost zarówno części nadziemnej (52 mm) w porównaniu do kontroli (40 mm) jak i korzeni (149 mm vs. 122 mm) ($p=0,000$) (Ryc. 21).



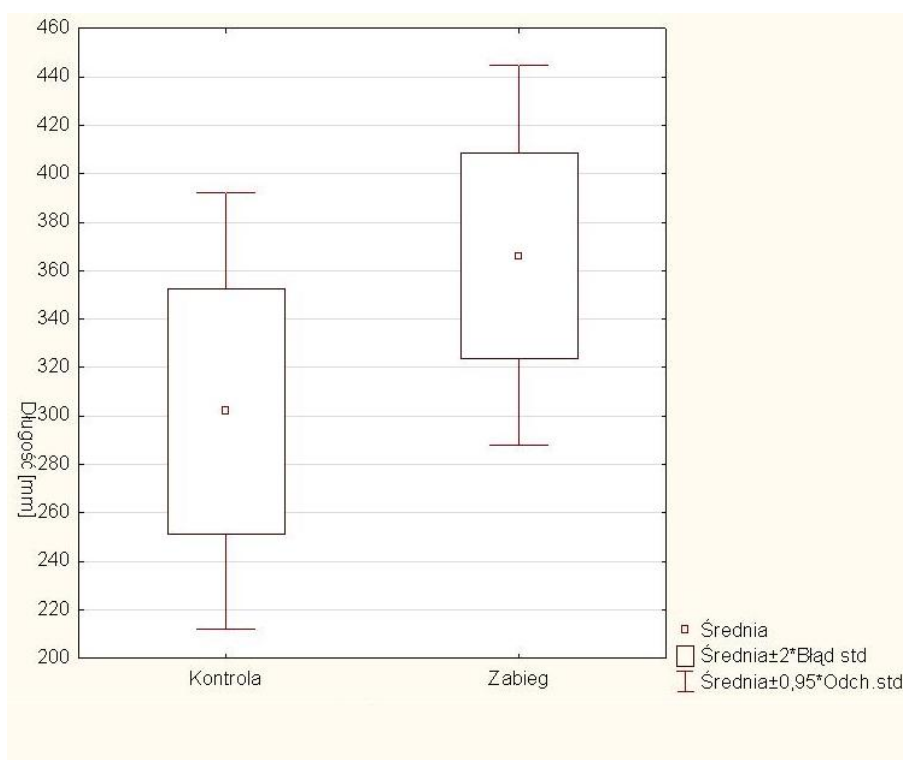
Ryc. 21. Wpływ preparatu Actifos na długość części nadziemnej (1) i podziemnej (2) siewek sosny w szkółce Nadl. Giżycko

W tej samej szkółce na powierzchni, na której stosowano środek Actifos, zaobserwowano, że zarówno część podziemna jednorocznych siewek świerka pospolitego (średnio 181 mm) jak i nadziemna (średnio 169 mm) okazały się być zdecydowanie większe na powierzchni zabiegowej niż na powierzchni kontrolnej (odpowiednio: 145 mm i 142 mm) (Ryc. 22). W obu przypadkach różnice okazały się być statystycznie istotne ($p=0,000$ i $p=0,002$).



Ryc. 22. Wpływ preparatu Actifos na długość części nadziemnej (1) i podziemnej (2) siewek świerka pospolitego w szkółce Nadl. Giżycko

W pierwszym roku stosowania preparatu Actifos (Actifos) długość części nadziemnej sadzonek olszy czarnej, rosnącej na szkółce „Kiejsze” w Nadl. Koło, wynosiła średnio 111 mm. Średnia długość części nadziemnej sadzonek kontrolnych była krótsza (105 mm). Prawdopodobieństwo testowe (p) wyniosło 0,930; co wskazuje na brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy próbą kontrolną, a próbą, na której stosowany był zabieg. Na powierzchni, gdzie stosowany był preparat, długości części podziemnych były zdecydowanie wyższe (366 mm) niż na porównywanej powierzchni kontrolnej (302 mm). Prawdopodobieństwo testowe wynosi 0,047, co świadczy o tym, że różnice te są istotne statystycznie (Ryc. 23).

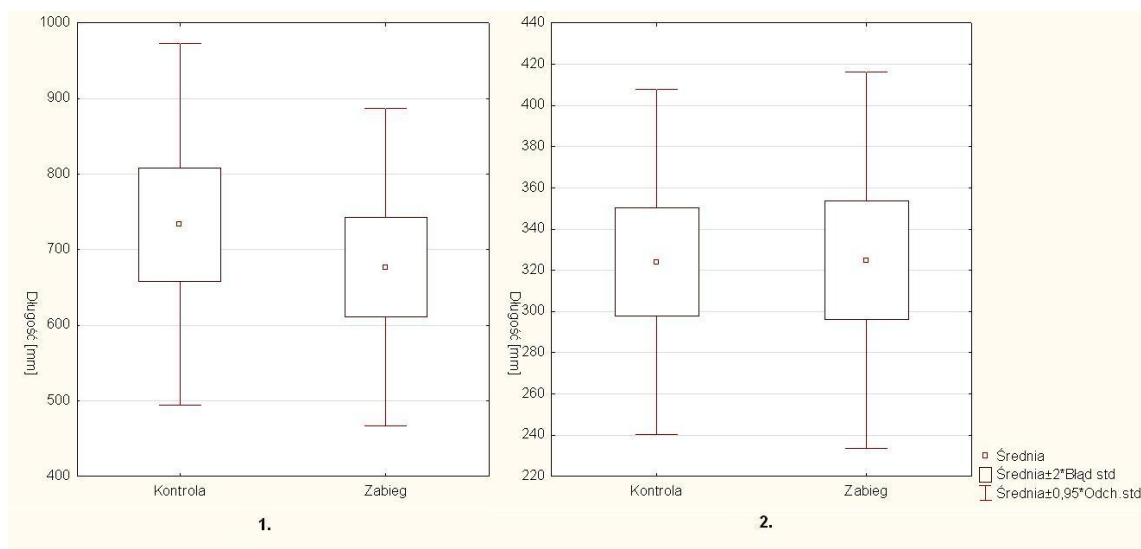


Ryc. 23. Wpływ preparatu Actifos na długość części podziemnej sadzonek olszy w szkółce Nadl. Kiejsze

W drugim roku stosowania preparatu Actifos na szkółce leśnej „Kiejsze” analizie poddano dwuletnie sadzonki olszy czarnej. Sadzonki pobrano z tej samej powierzchni, co w roku poprzednim. Porównanie średnich wartości długości części nadziemnej drzew z powierzchni nawożonej (1779 mm) były większe od średnich wartości z powierzchni kontrolnej (1631 mm), przy czym wartość prawdopodobieństwa testowego (p) wynosiła 0,387, co wskazuje na

brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy wysokościami sadzonek. Dłuższe korzenie miały sadzonki z powierzchni kontrolnej niż z zabiegowej (406 mm vs. 338 mm), jednak nie wykazano pomiędzy wariantami istotnych statystycznie różnic ($p=0,256$). System korzeniowy został w 2012 roku przycięty.

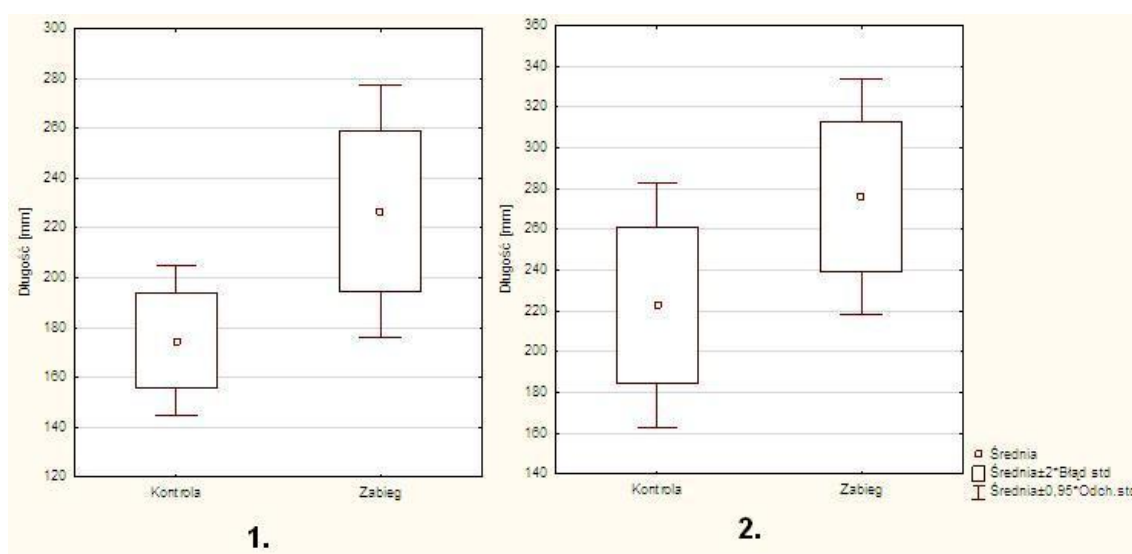
Skuteczność preparatu Actifos testowano również na dwuletnich sadzonkach dębu szypułkowego w szkółce leśnej w Nadleśnictwie Toruń (Ryc. 24). Sadzonki poddano zabiegowi podcinania systemu korzeniowego w trakcie trwania badań. Porównanie średnich długości części nadziemnej sadzonek z próby zabiegowej oraz kontrolnej wykazało, że wartości te różnią się między sobą ($p=0,018$). Większe rozmiary przyjmowały drzewka z powierzchni kontrolnej (średnio 734 mm) niż z zabiegowej (średnio 676 mm). Średnie długości korzeni nie różniły się między sobą, co potwierdza wartość prawdopodobieństwa testowego $p=0,910$.



Ryc. 24. Wpływ preparatu Actifos na długość części nadziemnej (1) i podziemnej (2) sadzonek dębu szypułkowego w szkółce Nadl. Toruń

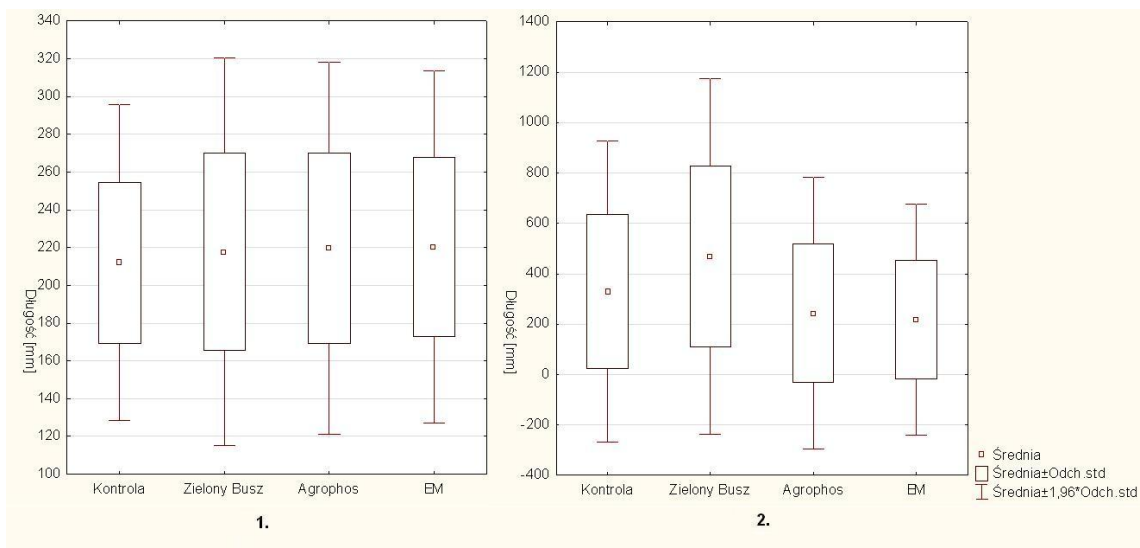
Po roku stosowania preparatu Actifos oceniono parametry biometryczne dwuletnich sadzonek dębu szypułkowego z Nadleśnictwa Żednia (Ryc. 25). Zarówno w przypadku średniej długości części nadziemnej jak i podziemnej analizowanych sadzonek uzyskano

wartości większe dla sadzonek z powierzchni, na której zastosowano opryski (pęd 227 mm, korzeń 276 mm) niż w przypadku sadzonek kontrolnych (pęd 175 mm, korzeń 229 mm). Potwierdzeniem takich wyników jest wartość prawdopodobieństwa testowego (p) mniejsza od 0,05 (dla części nadziemnej 0,022; dla korzeni 0,042) co oznacza, że w obu wypadkach różnice parametrów biometrycznych okazały się być istotne statystycznie.



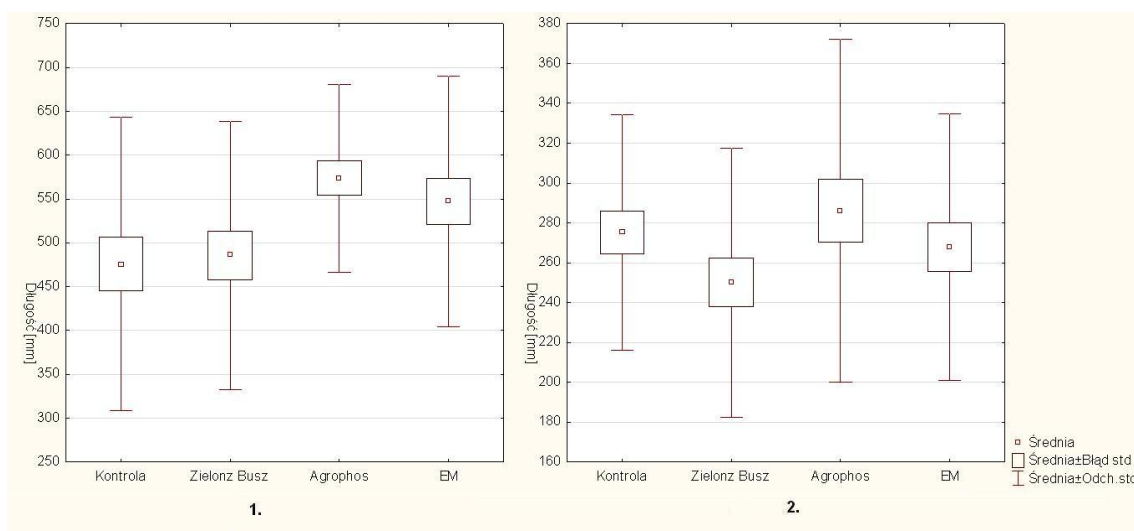
Ryc. 25. Wpływ preparatu Actifos na długość części nadziemnej (1) i podziemnej (2) sadzonek dębu szypułkowego w szkółce Nadl. Żednia

Na terenie szkółki leśnej „Karwacz” w Nadleśnictwie Przasnysz ocenie poddano wpływ preparatów Actifos, Zielony Busz oraz Efektywne Mikroorganizmy. Preparaty stosowane były jako oprysk na dwuletnich sadzonkach buka zwyczajnego. Porównanie długości części nadziemnej oraz korzeni sadzonek we wszystkich analizowanych wariantach wykazała, że średnie długości części nadziemnej są do siebie zbliżone (Ryc. 26.1), oraz brak jest istotności statystycznej różnic między wariantami ($p=0,157$). Wartości średnich długości korzeni, podobnie jak dla części nadziemnej, były bardzo zbliżone (Ryc. 26.2), a wartość prawdopodobieństwa testowego wyniosła 0,989.



Ryc. 26. Wpływ preparatów Zielony Busz, Actifos oraz EM na długość części nadziemnych (1) oraz podziemnych (2) sadzonek buka zwyczajnego w szkółce Nadl. Przasnysz w pierwszym roku doświadczenia

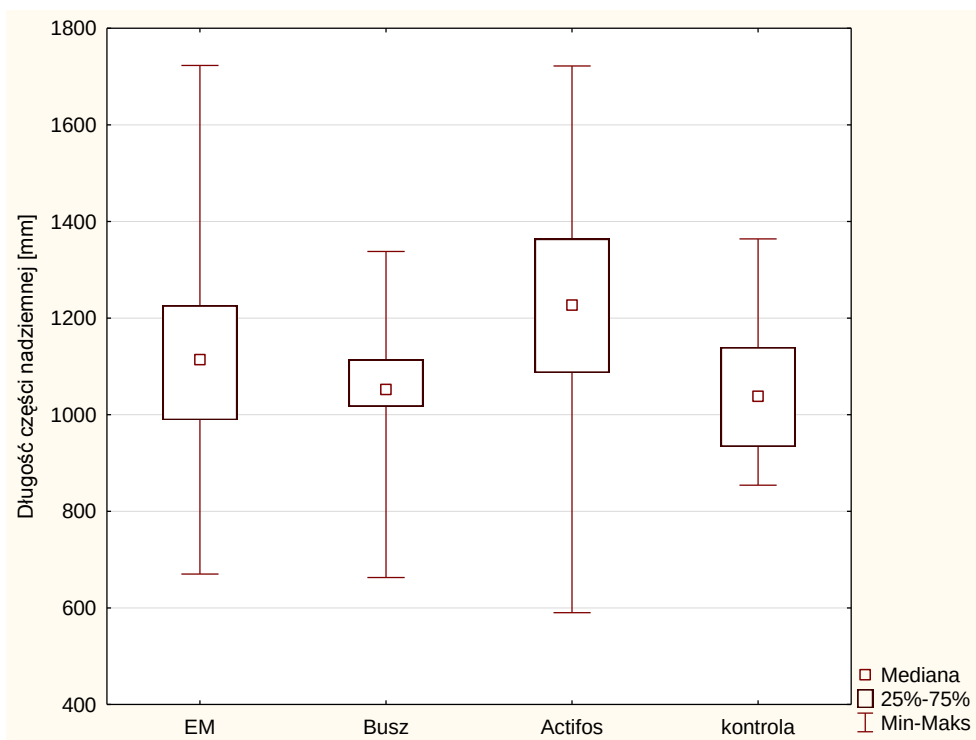
W drugim roku stosowania preparatów Actifos, Zielony Busz oraz Efektywne Mikroorganizmy analizie poddano trzyletnie sadzonki buka zwyczajnego, które w 2012 roku miały podcięty system korzeniowy. Po przeprowadzeniu porównań wielokrotnych wykazano, że w istotny statystycznie sposób różnią się sadzonki z powierzchni opryskanych Actifosem oraz Efektywnymi Mikroorganizmami od kontroli i Zielonego Buszu ($p=0,046$; ryc. 27.1). Wartości te były wyższe od próby kontrolnej oraz próby, w której zastosowano preparat Zielony Busz. Między sadzonkami traktowanymi preparatami Actifos i EM nie było statystycznie istotnych różnic. Wartość prawdopodobieństwa testowego dla części korzeniowej wyniosła $p=0,404$, co wskazuje na brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy długościami pędów sadzonek rosnących na powierzchniach opryskiwanych różnymi preparatami (Ryc. 27.2).



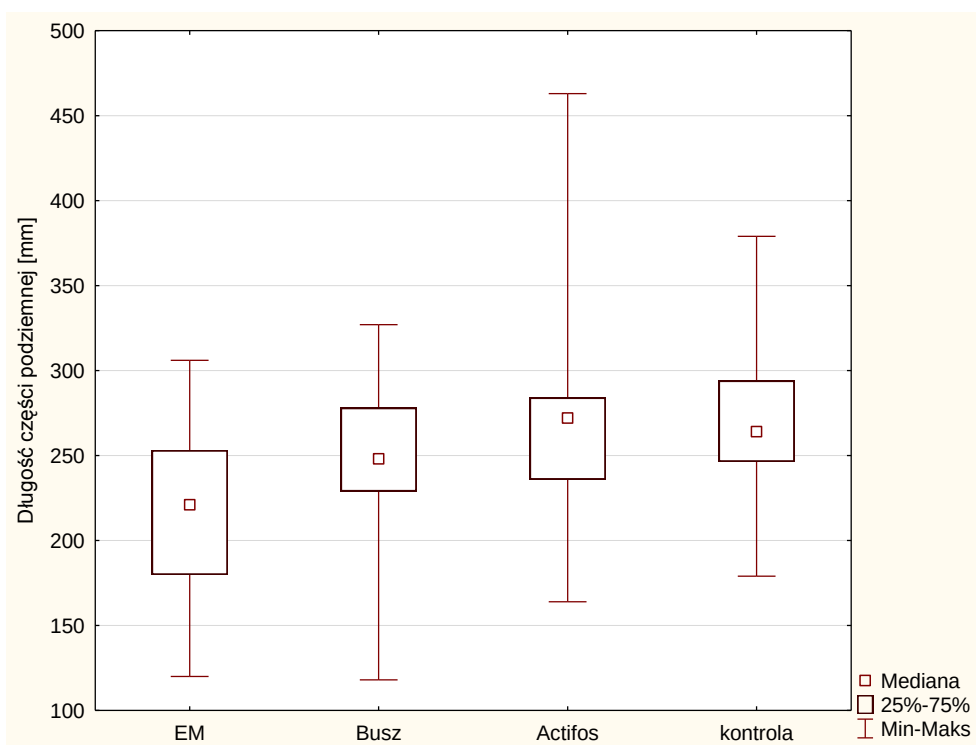
Ryc. 27. Wpływ preparatów Zielony Busz, Actifos oraz EM na długość części nadziemnych (1) oraz podziemnych (2) sadzonek buka zwyczajnego w szkółce Nadl. Przasnysz w drugim roku doświadczenia

Podobny schemat badań zastosowano na szkółce „Żabieniec” w Nadl. Chojnów, gdzie oceniono wpływ preparatów Actifos, Zielony Busz i EM na parametry biometryczne sadzonek dębu szypułkowego oraz olszy czarnej. Po przeprowadzeniu porównań wielokrotnych wykazano, że najwyższe przyrosty odnotowały sadzonki dębów z powierzchni opryskanych Actifosem ($p=0,019$), natomiast sadzonki z powierzchni EM i Zielony Busz nie różniły się istotnie od kontroli (Ryc. 28). W przypadku systemów korzeniowych statystycznie najkrótsze miały te sadzonki, które rosły na poletku nawożonym Efektywnymi Mikroorganizmami ($p=0,003$). Długości korzeni w pozostałych wariantach nie różniły się istotnie od kontroli.

Sadzonki olszy czarnej, podobnie jak w przypadku dębu szypułkowego, osiągnęły największy przyrost na powierzchni opryskiwanej preparatem Actifos ($p=0,019$); pozostałe warianty nie różniły się istotnie od kontroli. Jeśli chodzi o długość części podziemnej, zaobserwowano zahamowanie wzrostu korzeni u sadzonek nawożonych preparatem zawierającym Efektywne Mikroorganizmy ($p=0,004$) w porównaniu do kontroli. Pozostałe preparaty (Actifos i Zielony Busz) nie wpłynęły istotnie na rozwój systemów korzeniowych (Ryc. 29).



Ryc. 28. Wpływ preparatów Zielony Busz, Actifos oraz EM na długość części nadziemnych sadzonek dębu szypułkowego w szkółce Nadl. Chojnów



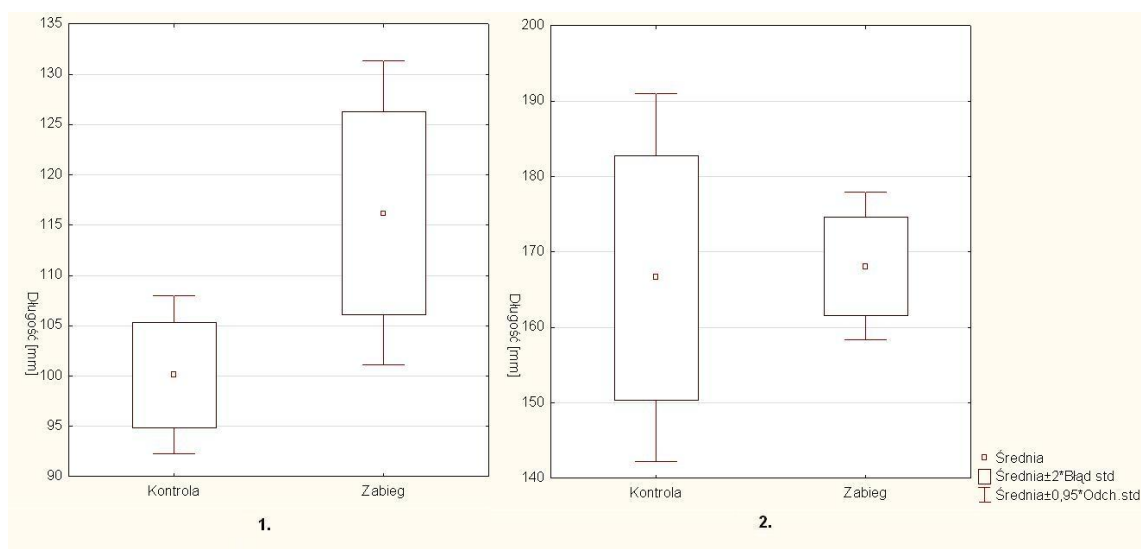
Ryc. 29. Wpływ preparatów Zielony Busz, Actifos oraz EM na długość części podziemnych sadzonek olszy w szkółce Nadl. Chojnów

Zarówno w przypadku sadzonek olszy czarnej jak i dębu szypułkowego nie zanotowano istotnego wpływu badanych preparatów na szerokość szyi korzeniowej jak i suchej masy pędu.

Na szkółce w Nadleśnictwie Nowy Targ po roku doświadczenia oceniono wpływ stosowania preparatu Actifos na przyrost części nadziemnej i podziemnej dwuletnich sadzonek olszy czarnej. Znacznie większe średnie wartości długości części nadziemnej stwierdzono u drzewek opryskanych (96 mm) w porównaniu z próbą kontrolną (86 mm). Wartość prawdopodobieństwa testowego wyniosła $p=0,013$, co stanowi o istotności statystycznej wyniku.

EFEKTYWNE MIKROORGANIZMY (EM)

W 2012 roku oceniono skuteczność preparatu EM na podstawie pomiarów części nadziemnej i podziemnej jednorocznych sadzonek sosny rosnących na szkółce znajdującej się na terenie Nadleśnictwa Augustów.

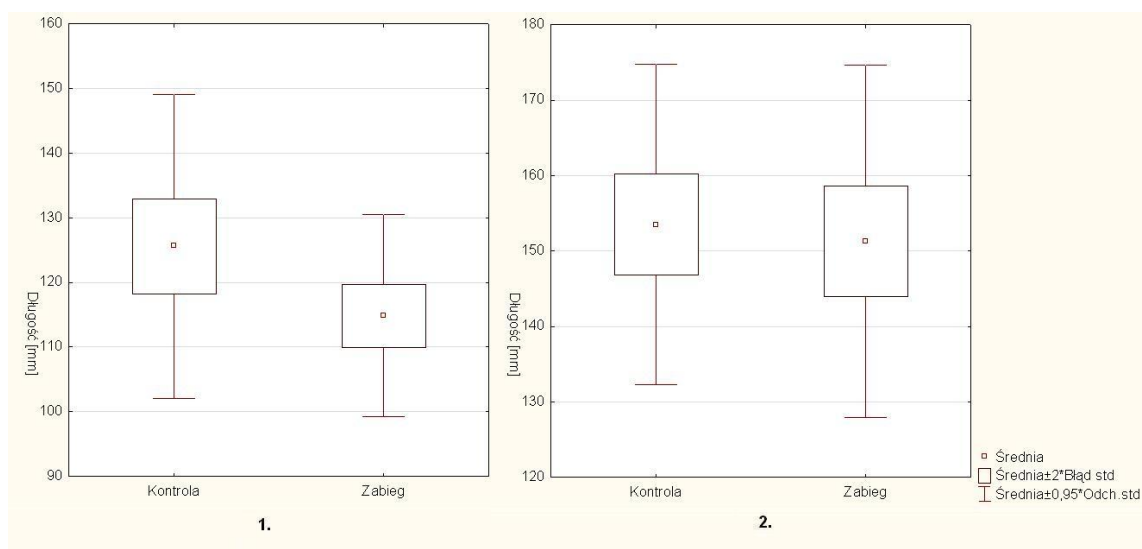


Ryc. 30. Wpływ preparatu EM na długość części nadziemnych (1) i podziemnych (2) sadzonek sosny w szkółce Nadl. Augustów

Na podstawie uzyskanych wyników, zdecydowanie większe średnie wartości długości pędów przyjmują rośliny z powierzchni opryskanej (116 mm) niż rośliny kontrolne (101 mm). Wartość prawdopodobieństwa testowego wyniosła 0,012, co oznacza, że różnice pomiędzy badanymi wariantami są istotne statystycznie (Ryc. 30.1). Wartości średnich długości korzeni były bardzo zbliżone (badane: 168 mm, kontrolne: 166 mm), a wartość prawdopodobieństwa testowego wyniosła 0,345; co wskazuje na brak istotnych statystycznie różnic (Ryc. 30.2).

GREVITAX

W szkółce leśnej Nadleśnictwa Toruń testowano preparat Grevitax, nawożąc nim jednoroczne sadzonki sosny zwyczajnej. Pomiar parametrów biometrycznych wykazał słabszy wzrost sadzonek na powierzchni zabiegowej (pęd: 115 mm) w porównaniu do powierzchni kontrolnej (126 mm). Wartość prawdopodobieństwa testowego równa 0,018 wskazuje na to, że różnice te są istotne statystycznie (Ryc. 31). Nie zaobserwowano natomiast różnic w długości korzeni sadzonek poddanych zabiegowi oraz kontrolnych ($p=0,910$).

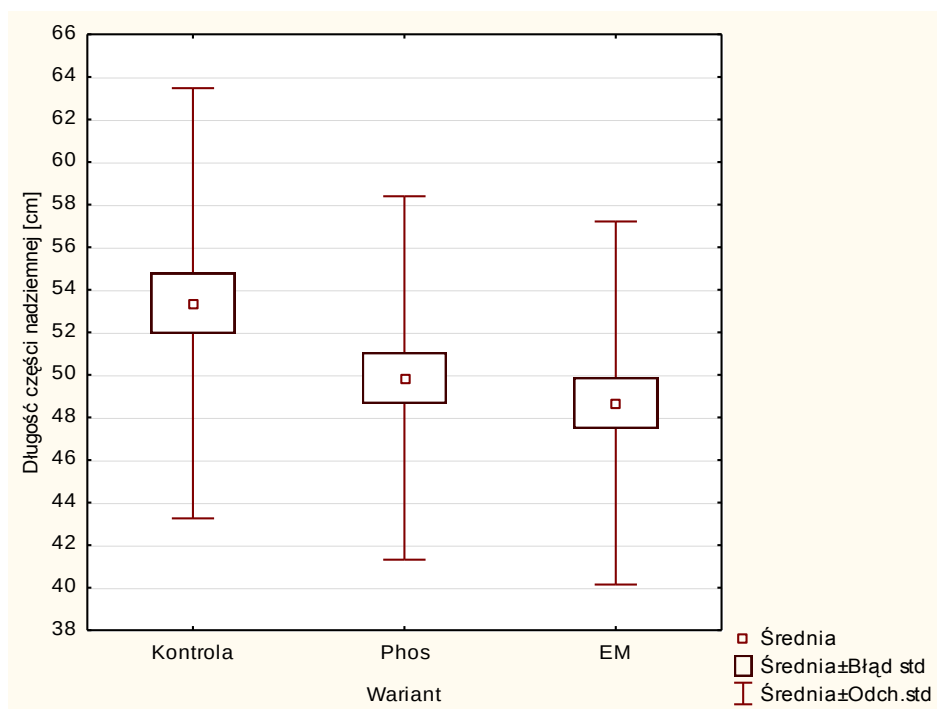


Ryc. 31. Wpływ preparatu Grevitax na długość części nadziemnych (1) i podziemnych (2) sadzonek sosny w szkółce Nadl. Toruń

EM i PHOS 60

Testy skuteczności preparatów zawierających Efektywne Mikroorganizmy oraz Phos 60 przeprowadzono na terenie szkółki leśnej w Nadl. Hajnówka nawożąc sadzonki świerka pospolitego i dębu szypułkowego. Ocenie poddano takie parametry biometryczne jak: długość pędu, długość części podziemnej i grubość szyi korzeniowej oraz całkowitą długość korzeni (TRL, ang. *Total Root Length*), długości korzeni drobnych (FRL, ang. *Fine Root Length*), długość korzeni matecznych (MRL, ang. *Mother Root Length*), powierzchnia drobnych korzeni sadzonek świerkowych (FRSA, ang. *Fine Root Surface Area*).

W przypadku siewek świerkowych nie odnotowano wpływu stosowania nawozów na wzrost części nadziemnej. Analiza przyrostu długości części nadziemnych siewek świerkowych po okresie wegetacji nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczenia ($p=0,0545$). Jednak, długości pędów głównych osiągnęły najwyższe wartości w wariancie kontrolnym (najwyższa wartość mediany), natomiast najniższe w wariancie, w którym zastosowano Efektywne Mikroorganizmy (Ryc. 32). Zastosowanie nawozów Phos 60 i Efektywnych Mikroorganizmów nie wpłynęło istotnie na grubości szyjek korzeniowych siewek świerkowych ($p=0,7956$). Wartości mediany przyjmowały wartości zbliżone jednak najwyższe wykazywały sadzonki kontrolne.



Ryc. 32. Wpływ preparatu EM i Phos60 na długość części nadziemnych siewek świerka pospolitego w szkółce Nadl. Hajnówka

Wartości suchej biomasy korzeni nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy wariantem kontrolnym oraz potraktowanymi preparatami Phos 60 i Efektywnymi Mikroorganizmami ($p=0,4556$). Wartości median zbliżały się do siebie, jednak dla wariantu kontrolnego przyjmowały nieznacznie wyższe wartości. Po przeanalizowaniu suchej biomasy części nadziemnych siewek świerkowych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wariantem kontrolnym i zabiegowymi ($p=0,5144$). Podobnie jak w wypadku korzeni, suche biomasy siewek potraktowanych preparatami posiadały mediany niższe od wariantu kontrolnego. Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy wariantem kontrolnym i zastosowaniem preparatu EM.

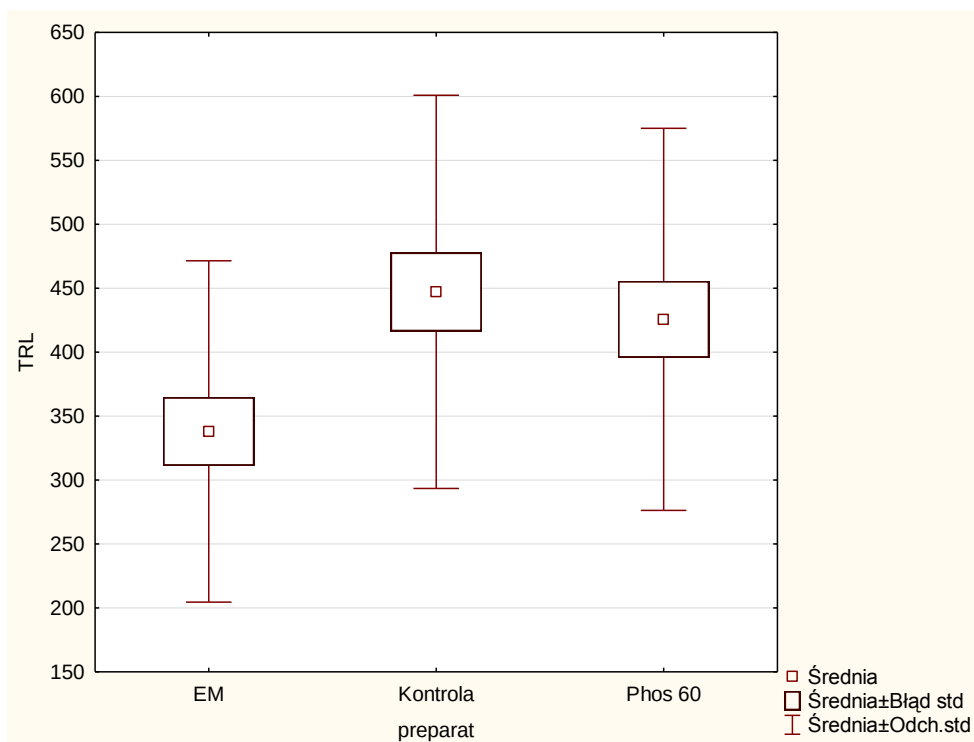
Tabela. 13. Średnie wartości parametrów biometrycznych korzeni sadzonek świerka w szkółce w Nadl. Hajnówka

	EM		Phos 60		Kontrola	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
TLR	337,99	133,45	425,60	149,38	447,12	153,75
FRL	289,35	122,68	359,25	133,28	377,75	136,53
MRL	38,79	11,98	54,22	19,41	56,38	19,17
FRSA	71,15	25,77	88,09	30,02	90,08	27,88
FRL/MRL	7,42	1,97	6,82	2,19	6,75	1,39

SD – odchylenie standardowe

Analiza statystyczna całkowitej długości korzeni siewek świerka pospolitego wykazała różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczenia (Tab. 13). Najkrótsze korzenie (**TRL**) stwierdzono w wariacie opryskiwanym preparatem EM ($p=0,044$), natomiast korzenie sadzonek opryskanych preparatem Phos 60 nie różniły się istotnie statystycznie od sadzonek kontrolnych, choć były od nich krótsze (Ryc. 33).

Zróznicowanie długości sadzonek było duże, o czym świadczy wartość odchylenia standardowego i średni błąd standardowy. Pod względem długości drobnych korzeni (**FRL**) nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy siewkami kontrolnymi, a poddanymi zabiegowi oprysków badanymi preparatami. Wyliczony parametr **FRL/MRL**, mówiący o stosunku długości drobnych korzeni ($< 2\text{mm}$) do długości korzeni matecznych, nie różnił się statystycznie pomiędzy badanymi wariantami, jednak średnio dłuższe drobne korzenie uzyskano w przypadku zastosowania preparatu EM w porównaniu do sadzonek kontrolnych lub opryskanych preparatem Phos 60.

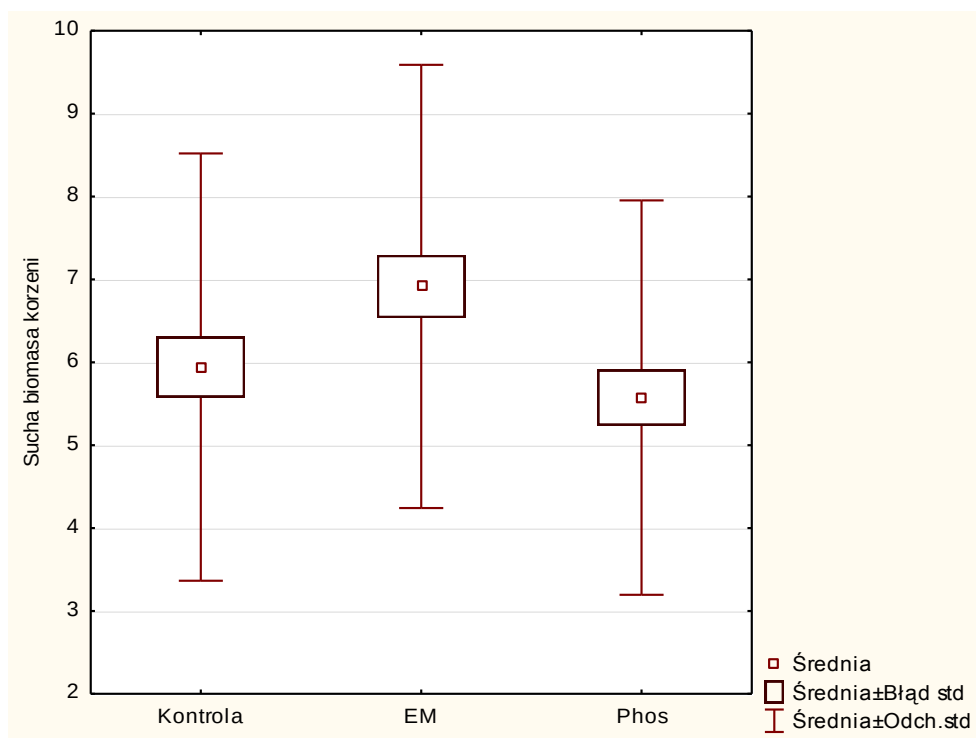


Ryc. 33. Wpływ preparatów EM i Phos60 na całkowitą długość korzeni (TRL) siewek świerka pospolitego w szkółce leśnej Nadl. Hajnówka

Ważnym analizowanym elementem systemów korzeniowych jest powierzchnia drobnych korzeni (**FRSA**), od której zależy efektywność pobierania wody z solami mineralnymi. Po kilku miesiącach trwania doświadczenia nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy jego wariantami. Średnia powierzchnia drobnych korzeni u sadzonek kontrolnych nie różniła się zasadniczo od tych opryskanych preparatami EM i Phos.

Analizy parametrów biometrycznych siewek dębowych nie wykazała istotnych różnic w długości pędów pomiędzy wariantami nawożenia ($p=0,1206$). Wartości median zbliżały się do siebie, jednak dla wariantu EM przyjmowały nieznacznie niższe wartości. Pomiary szerokości szyi korzeniowej sadzonek dębowych nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy wariantami kontrolnym oraz tymi gdzie zastosowano preparaty Phos i EM ($p=0,7414$). Wartości mediany były do siebie bardzo zbliżone natomiast szyjki korzeniowe siewek, gdzie zastosowano oprysk preparatami były nieznacznie wyższe od wartości drzewek kontrolnych. Pomierzone wartości suchej biomasy części nadziemnej sadzonek dębowych ponownie nie wykazywały istotnych statystycznie różnic pomiędzy wariantami ($p=0,5943$).

Mediany dla wszystkich wariantów są na bardzo zbliżonym poziomie jednak nieznacznie wyższe wartości przyjmowała masa sadzonek gdzie dodane były preparaty.



Ryc. 34. Wpływ preparatów EM i Phos60 na suchą biomasa korzeni siewek dębu szypułkowego w szkółce Nadl. Hajnówka

Porównanie suchej biomasy korzeni wykazało, że pomiędzy wariantami, gdzie zastosowano preparaty były istotne statystycznie różnice ($p=0,0331$). Najwyższe mediany przyjmowały masy korzeni sadzonek, które zostały wzbogacone przez zastosowanie Efektywnych Mikroorganizmów (Ryc. 34). Wartości te jednak nie były na tyle duże aby istotnie różniły się od wariantu kontrolnego (mimo, że mediany były wyższe od kontroli).

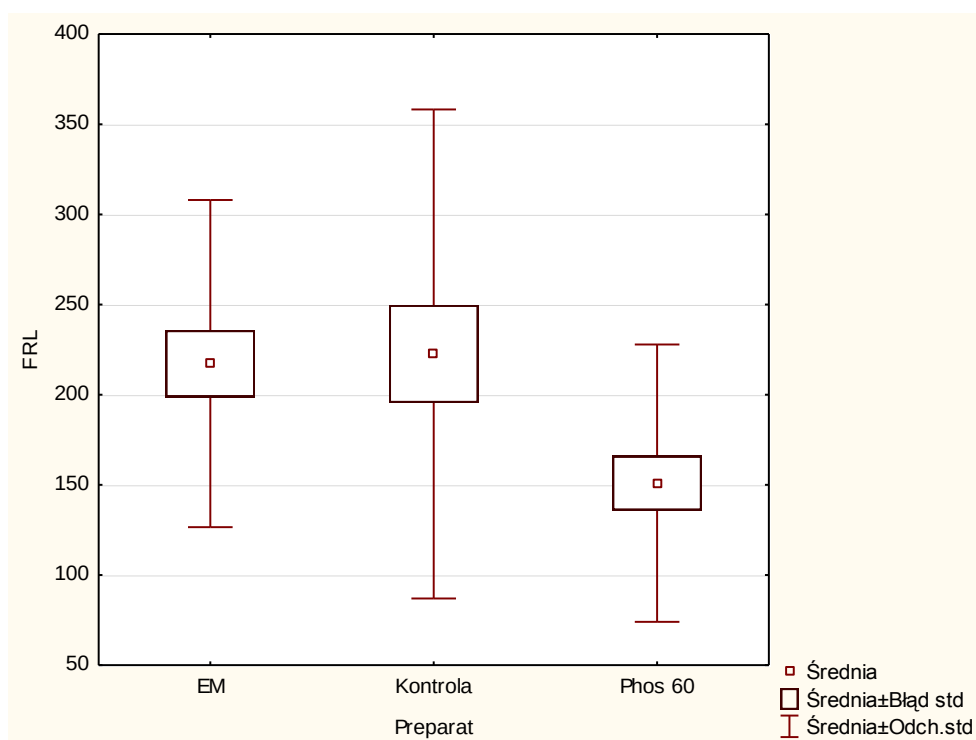
Wyniki analiz parametrów biometrycznych korzeni sadzonek dębu przedstawiały się odmiennie (Tab. 14). Pod względem całkowitej długości korzeni (**TRL**) nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczeni.

Tabela 14. Średnie wartości wybranych parametrów biometrycznych korzeni sadzonek dębu w szkółce Nadl. Hajnówka

	EM		Phos 60		Kontrola	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
TLR	255,14	95,80	184,81	87,35	256,38	139,28
FRL	217,25	91,55	150,94	77,33	222,62	133,44
MRL	17,25	6,68	16,31	10,23	15,37	8,46
FRSA	46,11	19,38	33,57	17,66	44,93	24,54
FRL/MRL	12,99	3,91	10,88	6,13	15,51	8,11

SD – odchylenie standardowe

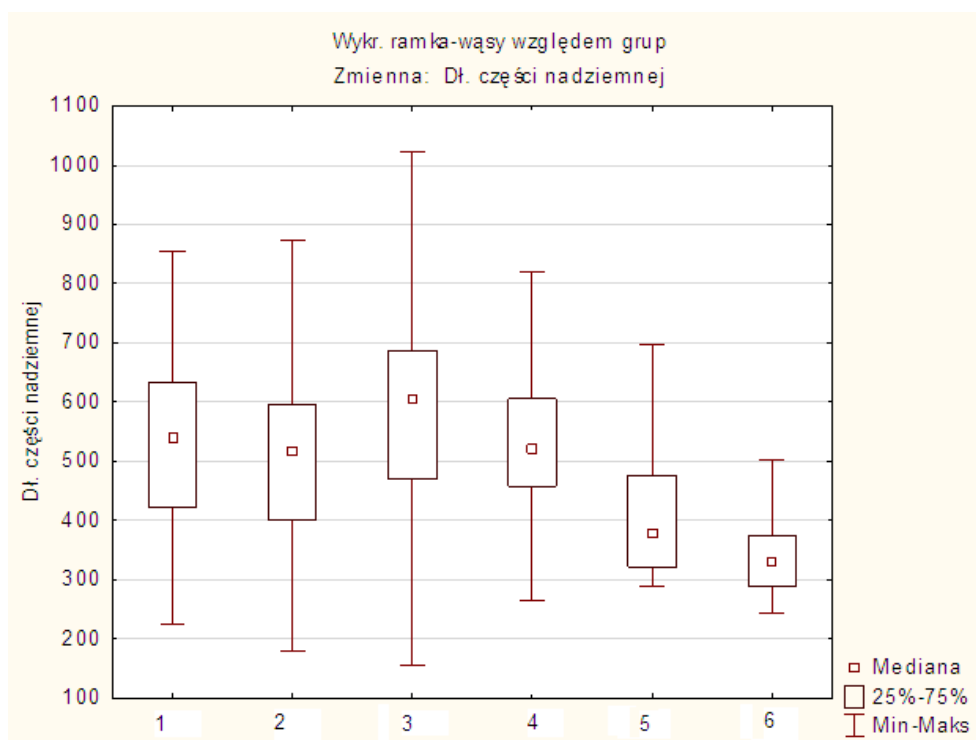
Średnia całkowita długość korzeni dębów opryskanych preparatem Phos 60 była mniejsza niż średnie policzone dla sadzonek kontrolnych i opryskanych preparatem EM. W przypadku analizy korzeni drobnych (**FRL**), różnice istotne statystycznie stwierdzono tylko pomiędzy sadzonkami traktowanymi preparatami EM i Phos ($p=0,045$) jednak nie różniły się one od kontroli. Preparat Phos 60 hamował rozwój korzeni drobnych w porównaniu do roślin opryskanych preparatem EM, jednak różnice te nie różniły się istotnie od roślin kontrolnych. Sytuacja ta wynikała z dużych wartości odchylenia standardowego (i w konsekwencji wysokiego błędu standardowego) w przypadku kontroli (Ryc. 35). Podobnie wyniki uzyskano porównując stosunek długości drobnych korzeni do korzeni matecznych. Istotne statystycznie różnice wystąpiły pomiędzy siewkami kontrolnymi i opryskanymi preparatem Phos 60 ($p=0,042$). Siewki traktowane posiadały mniej drobnych korzeni niż siewki kontrolne, o czym świadczy stosunek długości drobnych korzeni do długości korzeni matecznych. Biorąc pod uwagę parametry FRL i FRL/MRL, stwierdzono, że siewki dębu potraktowane preparatem Phos 60 posiadały mniej korzeni drobnych, i były one krótsze niż u siewek kontrolnych. Analizując parametr FRSA stwierdzono, że powierzchnia korzeni drobnych u siewek potraktowanych preparatem Phos 60 była wprawdzie najmniejsza, jednak różnice te nie były statystycznie istotne w porównaniu do innych wariantów doświadczenia.



Ryc. 35. Wpływ preparatów EM i Phos60 na długość korzeni drobnych (FRL) siewek dębu szypułkowego w szkółce leśnej Nadl. Hajnówka

NAWOZY AZOTOWE i NAWOZY WIELOSKŁADNIKOWE

Stosowanie nawożenia doglebowego azotem w postaci saletry amonowej i oprysku mocznikiem lub preparatem Florovit istotnie wpłynęło na zmniejszenie przyrostu części nadziemnej sadzonek dębu szypułkowego w stosunku do roślin kontrolnych i pozostałych wariantów ($p < 0,05$) (Ryc. 36). Największe przyrosty zaś (do 1022 mm) osiągały rośliny traktowane mieszanką mocznika i preparatu Florovit, jednak nie były to różnice istotne statystycznie. Ponadto, stosowanie nawożenia azotowego w wariancie saletra amonowa + mocznik znacząco obniżyło suchą masę pędów w odniesieniu do wariantu kontrolnego ($p = 0,005$). Żaden z wariantów doświadczenia nie wpłynął istotnie na długość i suchą masę części podziemnej oraz szerokość szyi korzeniowej ($p > 0,05$), przy czym najdłuższe korzenie miały rośliny opryskiwane preparatem Bioekor i nawożone doglebowo saletrą amonową.



Ryc. 36. Wpływ nawożenia na długość części nadziemnej sadzonek dębu szypułkowego w szkółce leśnej Nadl. Jawor. Warianty: (1) kontrola; (2) mocznik + Bioekor; (3) mocznik + Florovit; (4) saletra amonowa + Bioekor; (5) saletra amonowa + Florovit; (6) saletra amonowa + mocznik

Dyskusja

Po przeprowadzeniu wszystkich analiz stwierdzono, że w ponad połowie wypadków stosowanie preparatów stymulujących wzrost wpłynęło pozytywnie na zwiększenie wymiarów części nadziemnej lub podziemnej sadzonek, które zostały nimi opryskane.

Niemal we wszystkich wariantach zaistniały jakieś różnice istotne statystycznie, wyjątkiem okazały się wszystkie trzy preparaty stosowane w 2011 roku na terenie Nadleśnictwa Przasnysz (tzn. Actifos, Zielony Busz oraz Efektywne Mikroorganizmy). Jednak w rok później Efektywne Mikroorganizmy jak i Actifos wykazały już istotne statystycznie różnice i w porównaniu z poprzednimi wariantami sadzonki przyjmowały większe wartości. Jednak Zielony Busz również w 2012 roku nie wykazał istotnych statystycznie różnic. Żadnych różnic nie wykazano również przy zastosowaniu preparatu

Actifos na jednoroczne sadzonki dębu szypułkowego w Nadleśnictwie Borki oraz dwuletnich sadzonkach olszy czarnej w Nadleśnictwie Koło.

Najczęściej stosowanym preparatem był Actifos, który w ponad 60% przypadków zastosowania wykazał istotne statystycznie różnice. W większości z wariantów sadzonki opryskane tym preparatem okazywały się być większe od próby kontrolnej (dwuletnie sadzonki dębu szypułkowego a Nadleśnictwie Toruń okazały się być mniejsze od próby kontrolnej).

Interesujące spostrzeżenia dały zabiegi, w których zastosowano preparat Grevitax. W wariancie tym średnie wysokości drzewek z próby kontrolnej okazały się być większe niż z powierzchni opryskanej preparatem. Podobne spostrzeżenia dały też warianty: Ol 2/0 z Nadleśnictwa Augustów opryskanej fosforem potasu (korzenie na powierzchni opryskanej były krótsze), Ol 2/0 z tej samej powierzchni opryskanej środkiem Zielony Busz (krótsze części nadziemne w próbie z preparatem) oraz wariant dwuletnich sadzonek dębu szypułkowego w Nadleśnictwie Toruń, gdzie preparat Actifos wpłynął negatywnie na wzrost sadzonek.

Istotne statystycznie różnice pomiędzy korzeniami wykazano w sześciu przypadkach: kiedy analizowano dwuletnie sadzonki olszy czarnej z Nadleśnictwa Augustów w wariancie Zielony Busz; kiedy analizowano jednoroczne sadzonki olszy czarnej z Nadleśnictwa Koło w wariancie opryskanym Actifosem, kiedy porównywano jednoroczne sadzonki świerków i sosen z Nadleśnictwa Giżycko, gdzie stosowano preparat Actifos i dla świerków, gdzie zastosowano preparat Zielony Busz oraz kiedy porównywano dwuletnie sadzonki dębu szypułkowego w Nadleśnictwie Żednia. W pierwszym z wariantów korzenie okazały się krótsze niż u drzew z próby kontrolnej, natomiast w wariancie drugim i trzecim Actifos wpłynął pozytywnie na zwiększenie przyrostu korzeni.

Warto też podkreślić, że w wariantach Bk 3/0 (Nadleśnictwo Przasnysz), Db 2/0 (Nadleśnictwo Toruń), Db 2/0 (Nadleśnictwo Borki) Ol 2/0 (Nadleśnictwo Augustów) oraz Ol 2/0 (Nadleśnictwo Koło) zastosowano mechaniczne podcinanie systemów korzeniowych, co uniemożliwiło prześledzenie rozwoju podziemnej części sadzonek oraz ewentualnej skuteczności preparatu na ich rozwój. Podcinanie pozostawiło też duże rany w systemie korzeniowym (w wypadku olszy z Nadleśnictwa Koło, niektóre z tych ran miały średnicę 3 cm), które stanowią otwartą drogę infekcji dla grzybów i bakterii. Ma to szczególnie duże

znaczenie na szkółkach, gdzie występuje *Phytophthora*, ponieważ może to doprowadzić do dalszego rozprzestrzeniania się tego patogenu na uprawy, gdzie będą wysadzane sadzonki.

Dwuletnie siewki świerkowe rosnące w szkółce Budy okazały się być bardzo zróżnicowane pod względem wzrostu, wynika to prawdopodobnie z wykorzystania do siewu nasion bez ich wstępnej selekcji pod względem wielkości. Okazało się, że siewki świerkowe opryskane preparatem EM miały całkowitą długość korzeni średnio mniejszą od długości korzeni siewek kontrolnych lub opryskanych preparatem Phos60. U siewek świerkowych w przypadku zastosowania preparatu EM stwierdzono średnio większy stosunek długości drobnych korzeni do korzeni matecznych, niż u siewek kontrolnych lub opryskanych preparatem Phos. Należy uznać to zjawisko za korzystne, chociaż statystycznie różnice nie były jeszcze istotne. Podsumowując siewki świerkowe potraktowane preparatem EM posiadały najkrótsze całkowite systemy korzeniowe (różnice istotne statystycznie), a ich drobne korzenie były także krótsze i o mniejszej powierzchni niż siewki kontrolne. Dodatkowo, stwierdzono, że korzenie mateczne także były krótsze od kontrolnych, o czym świadczy stosunek FRL/MRL. Należy jednak pamiętać, że różnice te w trzech ostatnich przypadkach nie były istotne statystycznie.

Wnioski

1. W ponad 60% doświadczeń preparat Actifos wpłynął pozytywnie na zwiększenie przyrostu części nadziemnej siewek dębu, buka oraz olszy, a także dla korzeni olszy i dębu.
2. Zastosowanie preparatu Grevitax wpłynęło negatywnie na wzrost siewek sosny zwyczajnej.
3. Zastosowanie preparatu Zielony Busz wpłynęło negatywnie na długość korzeni olszy czarnej w Nadleśnictwie Augustów.
4. Preparat na bazie Efektywnych Mikroorganizmów (EM) wpłynął negatywnie na długość korzeni siewek świerka pospolitego.
5. Nie stwierdzono istotnego wpływu preparatu Phos 60 na długość, powierzchnię i ilość drobnych korzeni u siewek świerka pospolitego. W przypadku siewek dębowych,

preparat Phos 60 zmniejszył ilość drobnych korzeni, nie wpłynął jednak istotnie na ich powierzchnię.

6. U sadzonek dębu szypułkowego (Nadleśnictwo Toruń oraz Borki), buka pospolitego (Nadleśnictwo Przasnysz), olszy czarnej (Nadleśnictwa Augustów oraz Koło) w roku wykonania analiz podcięto system korzeniowy. Mogło mieć to wpływ na zaobserwowane różnice w długości systemów korzeniowych analizowanych sadzonek.

7. Stosowanie mechanicznego podcinania systemów korzeniowych jest przyczyną powstawania ran oraz stanowi otwartą drogę infekcji przez patogeniczne organizmy.

3.3.2. Analiza struktury mykoryz

Część I – analiza różnorodności mykoryz. Stan początkowy (2011r.)

Metodyka

Analizę struktury mykoryz prowadzono na jednorocznych siewkach dębu (*Quercus robur*) rosnących na terenie szkółki leśnej „Zielonka” w Nadl. Borki oraz buka (*Fagus sylvatica*) rosnących na terenie szkółki leśnej „Karwacz” w Nadl. Przasnysz. W ramach doświadczeń, zarówno siewki dębu jak i buka opryskiwane były preparatem Agrophos (obecnie Actifos), w stężeniu zalecanym przez producenta. Do analiz pobrano po 15 siewek dla każdego z wariantów doświadczenia: zabieg i kontrola. Po przewiezieniu do laboratorium korzenie myto pod bieżącą wodą i przechowywano w 70% alkoholu etylowym do momentu wykonania analiz. Analizę mykoryz przeprowadzano w oparciu o cechy morfologiczne, na podstawie kształtu, koloru i grubości mufki grzybniowej, sznurów grzybniowych oraz grzybni ekstramatrykalnej (Tab. 15), (www.deemy.de). Obliczono stopień mykoryzacji, jako udział mykoryz w liczbie wszystkich korzeni drobnych.

Wyniki

U siewek buka, niezależnie od wariantu doświadczenia, stwierdzono umiarkowane umykorowanie korzeni w przedziale od 75-100%. Wyróżniono 12 typów morfotypów mykoryzowych u siewek z wariantu kontrola i 11 dla siewek z wariantu zabiegowego (Tab. 15). Odnotowano 6 wspólnych morfotypów u siewek. U sadzonek dębu wyższą różnorodność grzybów mykoryzowych stwierdzono w wariancie zabiegowym, 11 morfotypów mykoryz (Tab. 16), natomiast w wariancie kontrolnym analizowane sadzonki były kolonizowane przez 6 grzybów mykoryzowych.

Tabela 15. Lista grzybów mykoryzowych, kolonizujących korzenie siewek buka w szkółce Nadl. Przasnysz

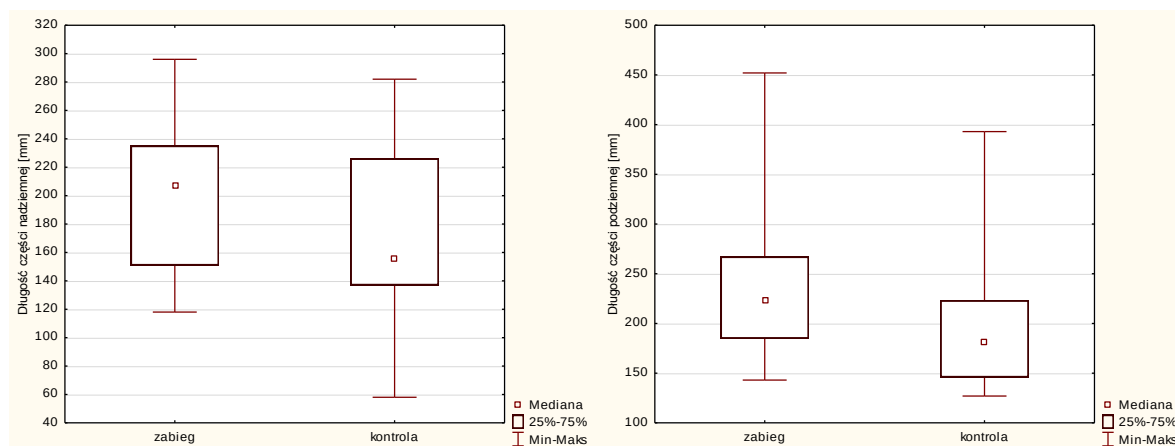
Rodzaj/gatunek grzyba mykoryzowego	Kontrola	Zabieg
<i>Alnicola</i> sp.	+	-
<i>Cenococcum geophilum</i>	+	-
<i>Cortinarius</i> sp.	-	+
<i>Hebeloma sacchariolens</i>	+	+
<i>Laccaria tortilis</i>	+	-
<i>Lactarius</i> sp.	+	+
<i>Phialophora</i> sp.	+	-
<i>Scleroderma areolatum</i>	+	+
<i>Tomentella</i> sp.	+	+
<i>Tuber</i> sp.1	+	-
<i>Tuber</i> sp.2	+	+
<i>Geopora cervina</i>	+	-
Unknown fungus	-	+
Unknown Ascomycota	-	+
<i>Genea</i> sp.	-	+
<i>Scleroderma citrinum</i>	+	+
<i>Hebeloma cavipes</i>	-	+

Tabela 16. Lista grzybów mykoryzowych kolonizujących korzenie siewek dębu w szkółce Nadl. Borki

Rodzaj/gatunek grzyba mykoryzowego	Kontrola	Zabieg
<i>Paxillus involutus</i>	+	+
<i>Hebeloma sacchariolens</i>	+	+
<i>Tomentella</i> sp.	+	+
<i>Cenococcum geophilum</i>	+	+
<i>Laccaria laccata</i>	-	+
<i>Scleroderma verrucosum</i>	-	+
<i>Peziza</i> sp.	+	+
<i>Inocybe curvipes</i>	+	-
<i>Inocybe</i> sp.	-	+
<i>Peziza</i> sp.	-	+
Unknown fungus	-	+

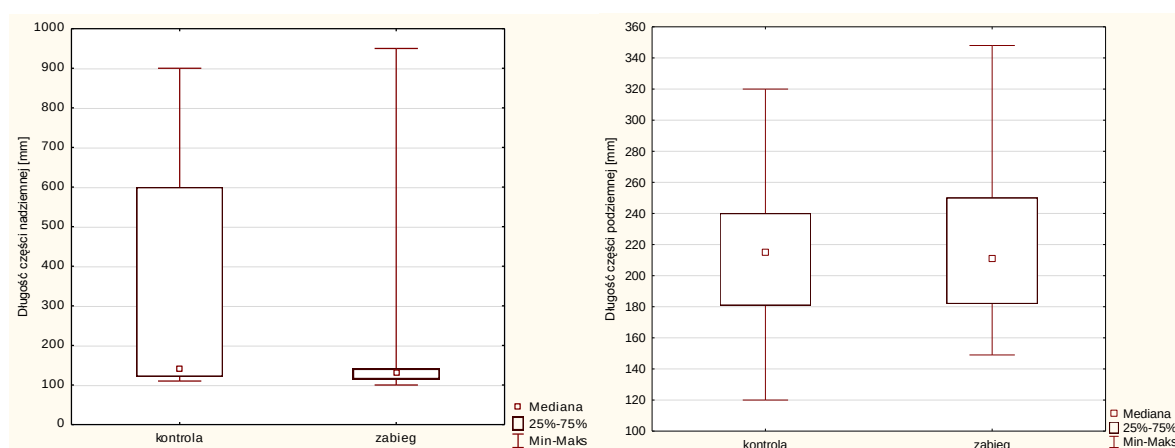
Jednocześnie z analizą struktury mykoryz u badanych sadzonek zmierzono parametry biometryczne, takie jak długość części nadziemnej oraz korzeni. Wykonanie zabiegu oprysku preparatem Agrophos w szkółce “Zielonki” nie wpłynęło istotnie na parametry biometryczne sadzonek (Ryc. 37 i 38), zarówno w części podziemnej ($p=0,059$) jak i nadziemnej ($p=0,305$). Jednak średnia wysokość sadzonek poddanych zabiegowi była nieznacznie wyższa. Sadzonki

dębowe opryskane w lipcu 2011r. preparatem fosforynowym Agrophos charakteryzowały się prawidłowym rozwojem systemów korzeniowych. Zauważono że szyje korzeniowe roślin potraktowane fosforynami były szersze, ale sucha masa pędów nie różniła się znacząco od wariantu kontrolnego.



Ryc. 37. Długość części nadziemnej i podziemnej sadzonek dębu szypułkowego w szkółce Nadl. Borki potraktowanych preparatem Agrophos oraz kontrolnych

Parametry biometryczne sadzonek dębu szypułkowego poddanego opryskom w szkółce “Karwacz” nie różniły się istotnie od parametrów sadzonek kontrolnych (pęd $p=0,081$; korzeń $p=0,599$). Mimo braku różnic w przypadku sadzonek bukowych stwierdzono prawidłowy rozwój pędów i korzeni.



Ryc. 38. Długość części nadziemnej i podziemnej sadzonek buka zwyczajnego w szkółce Nadl. Przasnysz potraktowanych preparatem Agrophos oraz kontrolnych

Część II – analiza różnorodności mykoryz po zastosowaniu nawożenia (stan na 2013r.)

Metodyka

Analizie poddano 3-letnie sadzonki buka zwyczajnego oraz dębu szypułkowego, które pochodziły ze szkółki leśnej podokapowej Żabieniec w Nadleśnictwie Chojnów. Do badań pobrano losowo z każdego wariantu po 25 sadzonek bukowych z wariantów zabiegowych oraz kontrolnych oraz po 15 sadzonek dębowych z wariantów zabiegowych oraz kontrolnych. Pozyskane z sadzonek próbki korzeni oczyszczono z drobin gleby oraz fragmentów organicznych na sitach pod bieżącą wodą. Do momentu rozpoczęcia analizy próbki korzeni umieszczono w kolbach Erlenmeyera z wodą destylowaną i przechowywano w chłodziarni w temperaturze +4°C.

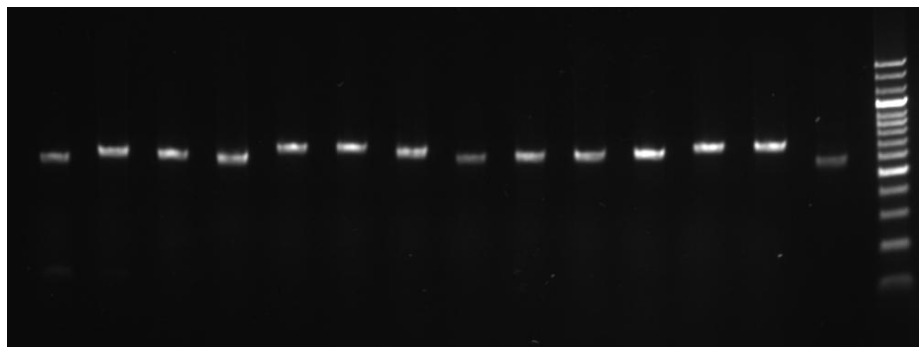
W celu przeprowadzenia analizy, korzenie po wyjęciu z kolb ponownie przepłukiwano na sitach pod bieżącą wodą a następnie wykładano na szalki Petriego wypełnione wodą destylowaną. Do bezpośredniej oceny mykoryz pobierano losowo od 5 do 10 fragmentów korzeni o długości od 2 do 5cm. Ocenie poddawano po 200 korzeni drobnych z każdej próby korzeniowej. Zliczano wszystkie wierzchołki mykoryzowe (żywe i zamierające) oraz korzenie autotroficzne. Korzenie z mykoryzami żywymi podlegały dodatkowo ocenie pod kątem morfotypów mykoryz na nich występujących. Określano także liczbę wierzchołków mykoryzowych należących do danego morfotypu.

Fragmenty korzeni lustrowano pod mikroskopem stereoskopowym (Zeiss Stemi 2000-C oraz Delta Optical IPOS-808) przy powiększeniu 10-80x połączonym z kamerą cyfrową. Korzenie będące w symbiozach mykoryzowych rozpoznawano po braku włosników, pogrubieniu, zabarwieniu, obecności mufki grzybniowej, ryzomorf oraz strzępek. Poszczególne morfotypy mykoryz wyróżniano w oparciu o cechy fenotypowe np. wygląd mufki, jej barwa, typ rozwidleń, wygląd grzybni esktramatrykalnej oraz obecność cystydiów, sklerot i ryzomorf. Wstępną identyfikację dokonano w oparciu o dostępną literaturę (Agerer 1987-1998; Ingelby i in. 1990). Najbardziej reprezentatywne dla każdego morfotypu wierzchołki mykoryzowe fotografowano oraz pobierano do dalszych analiz molekularnych (po 3 wierzchołki mykoryzowe dla każdego morfotypu). Wyróżnione morfotypy nie były w większości wypadków tożsame z konkretnymi gatunkami grzybów mykoryzowych,

spowodowane to było faktem, iż niewiele gatunków wykształca mykoryzy o cechach morfologicznych na tyle charakterystycznych i odrębnych, że odpowiadają jednemu morfotypowi (Leski i in 2008). W celu jednoznacznej identyfikacji mykoryzowych partnerów grzybowych wykonano analizy molekularne. Klasyfikacja morfotypów posłużyła do dalszych analiz jakościowych i ilościowych populacji mykoryz.

Zebrany materiał empiryczny poddano analizie statystycznej (STATAISTICA 10). Wykonano statystykę opisową zebranych danych, a następnie analizę wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Z powodu braku normalności rozkładu reszt w poszczególnych grupach zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji dla rang Kruskala-Walisa. W celu wyróżnienia grup jednorodnych przeprowadzono testy wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób. W celu obliczenia siły zależności pomiędzy parametrami biometrycznymi a stopniem zmykoryzowania zastosowano współczynnik korelacji rang Spearmana.

Analiza molekularna mykoryz zakładała porównanie sekwencji fragmentu genu małej podjednostki rybosomowej wybranych morfotypów z bazą sekwencji GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Prace laboratoryjne obejmowały amplifikację wybranych regionów zmiennych (ang. ITS) rDNA za pomocą starterów ITS1F/ITS4 (White i in. 1990; Gardes i Bruns, 1993), a następnie sekwencjonowanie otrzymanego w reakcji PCR produktu. Genomowe DNA wydzielono z wierzchołków mykoryzowych za pomocą zestawu odczynników DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, CA, USA). Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 25 μ l w mieszaninie o składzie: 1 x PCR Buffer; 1 x Q Buffer; 0,2 mM dNTP; 1 mM MgCl₂; 0,1 μ l Taq polimeraza (Qiagen); 0,5 μ M startera wiodącego; 0,5 μ M startera wstecznego i 1 μ l DNA. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze PTC-200™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) według następującego protokołu: wstępna denaturacja 5 min w 95°C a następnie 40 cykli amplifikacji (denaturacja - 25 s w 95°C; przyłączanie starterów 25 s w 55°C; wydłużanie produktu 50 s w 72°C) oraz końcowe wydłużanie produktu 10 min w 72°C. Ocenę jakościową produktu PCR określono elektroforetycznie w 1 % żelu agarozowym wybarwionym barwnikiem GelRed®. Elektroforegram wizualizowano w świetle lampy UV. Do dalszych analiz sekwencjonowania wybrano te próbki, dla których uzyskano pojedynczy i wyraźny produkt PCR (Ryc. 39). Identyfikację gatunkową mykoryz wykonano na podstawie uzyskanych sekwencji DNA.

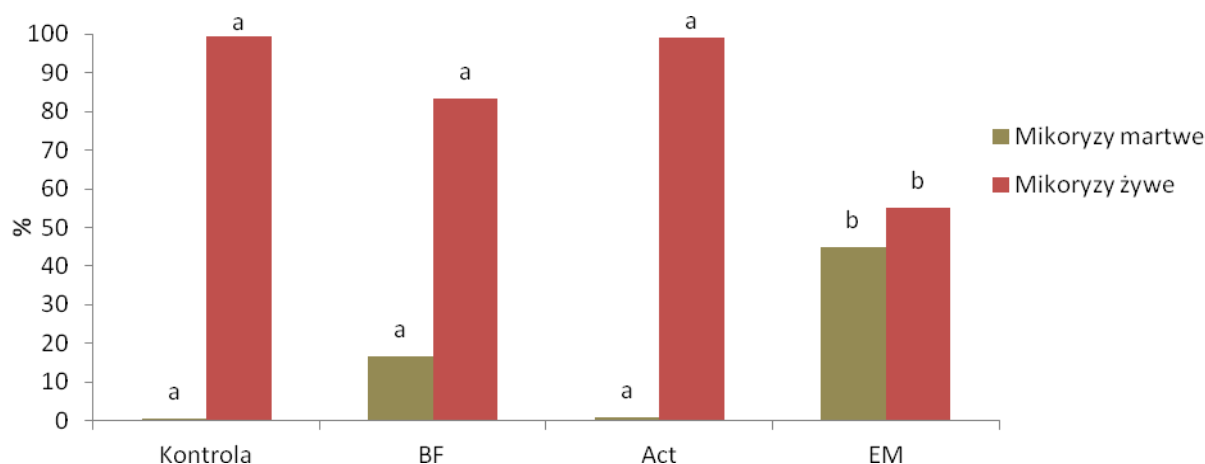


Ryc. 39. Przykładowy elektroforegram uzyskanych produktów PCR, świadczący o obecności DNA grzybów mykoryzowych.

Wyniki

Buk zwyczajny

W pierwszym etapie analizy wyróżniono 3 grupy korzeni: martwe, zmykoryzowane i autotroficzne. Ostatnia grupa korzeni nie została jednak stwierdzona. Stosunek ilościowy wierzchołków zmykoryzowanych i martwych został przedstawiony na rycinie 40. Stopień zmykoryzowania różnił się statystycznie w sadzonkach potraktowanych preparatem EM (najniższy).



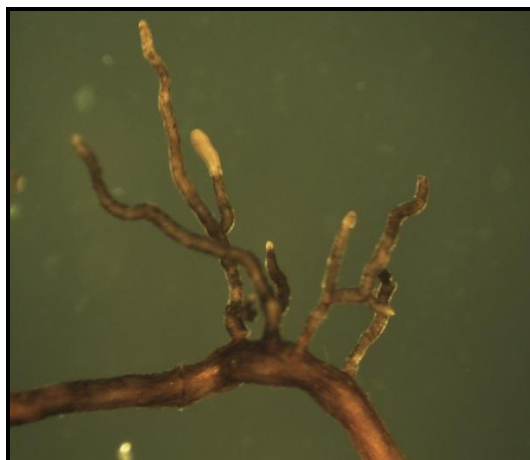
Ryc. 40. Udział % korzeni zmykoryzowanych i martwych u sadzonek buka zwyczajnego w poszczególnych wariantach. Wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami są istotne statystycznie na poziomie istotności $p \leq 0.05$.

Warianty: (BF) Busz Forte; (Act) Actifos; (EM) Efektywne Mikroorganizmy

Wynik analizy mikroskopowej pozwolił wyodrębnić 12 morfotypów. Każdy z nich udokumentowany został odpowiednią fotografią (Ryc. 41-55).



Ryc. 41. Morfotyp A *Pezizaceae*



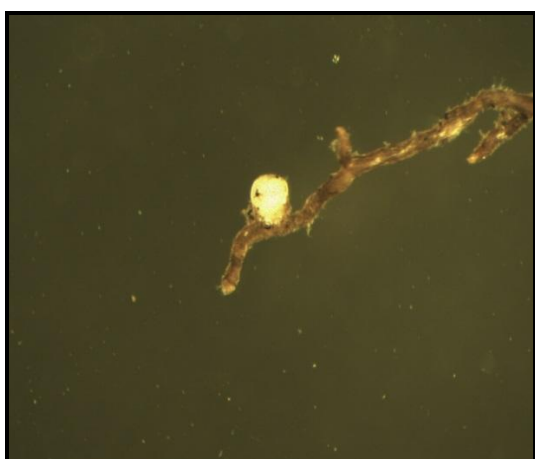
Ryc. 42. Morfotyp B *Tuber* sp.



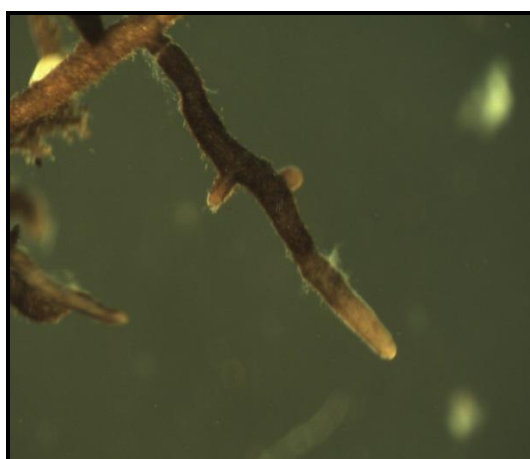
Ryc. 43. Morfotyp C *Tuber* sp.



Ryc. 44. Morfotyp D *Hebeloma sacchariolens*



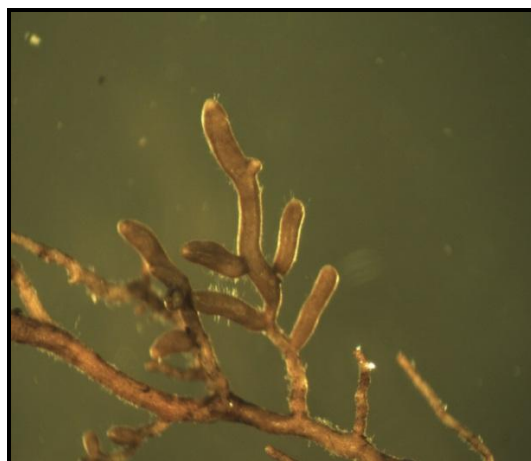
Ryc. 45. Morfotyp E *H. sacchariolens*



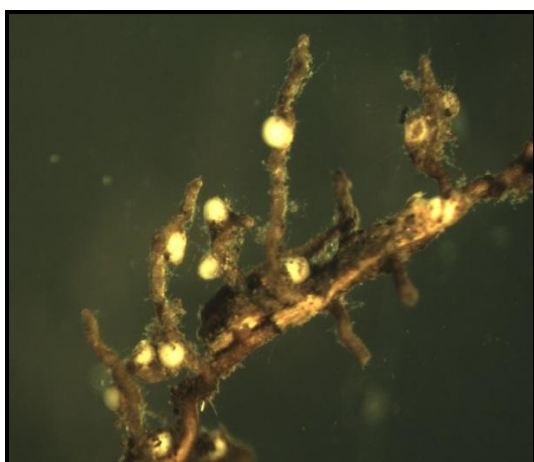
Ryc. 46. Morfotyp F *H. sacchariolens*



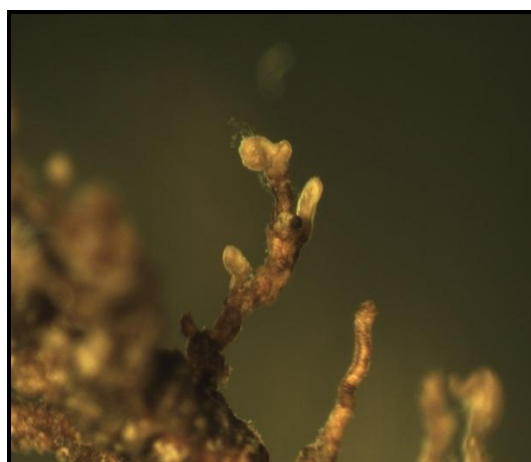
Ryc. 47. Morfotyp G *Cenococcum geophilum*



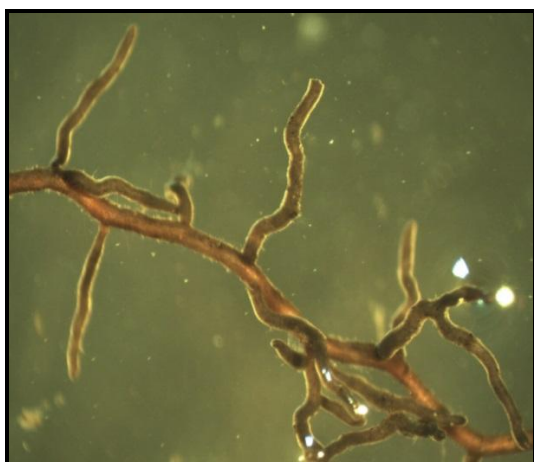
Ryc. 48. Morfotyp H *Tuber* sp.



Ryc. 49. Morfotyp I *H. sacchariolens*



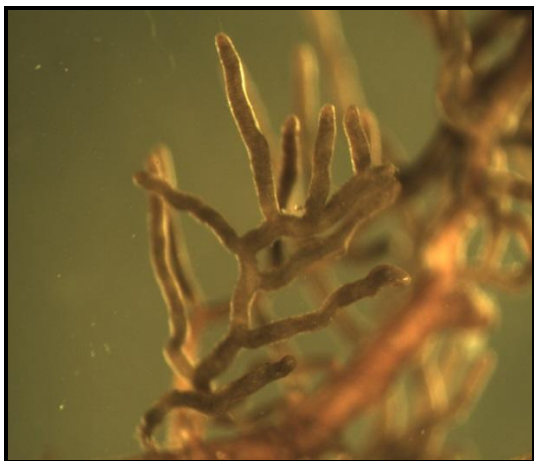
Ryc. 50. Morfotyp J *Clavulina* sp.



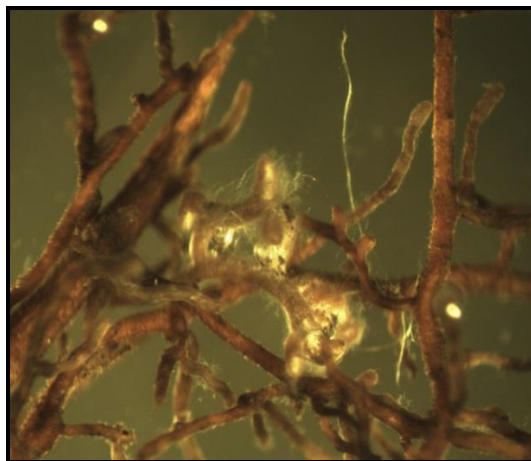
Ryc. 51. Morfotyp K *Pezizaceae*



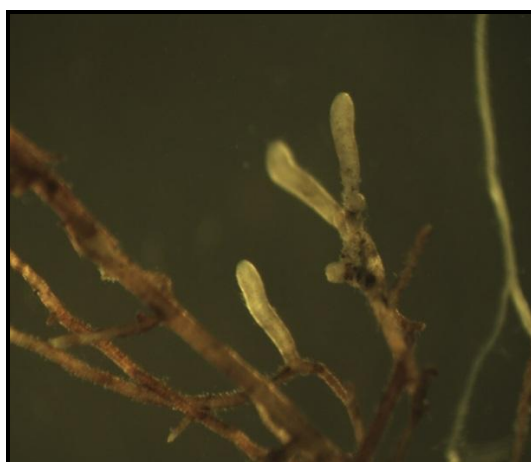
Ryc. 52. Morfotyp L *Peziza* sp.



Ryc. 53. Morfotyp M *Pezizaceae*

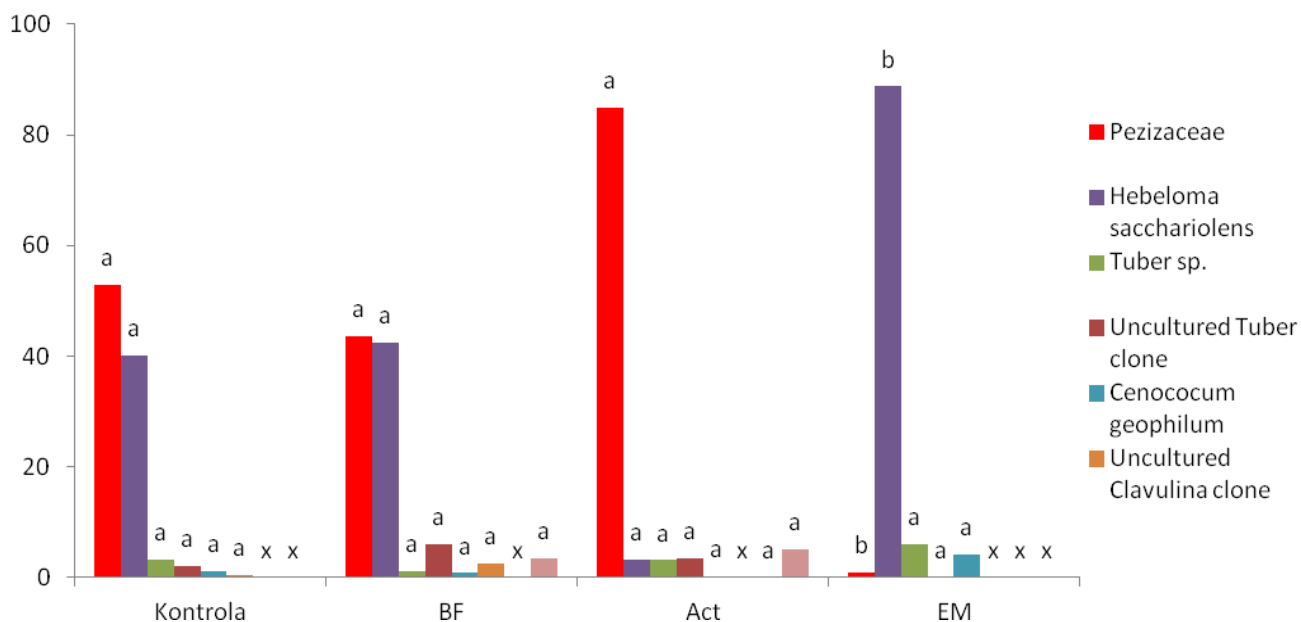


Ryc. 54. Morfotyp N *Scleroderma aerolatum*



Ryc. 55. Morfotyp O *Peziza* sp.

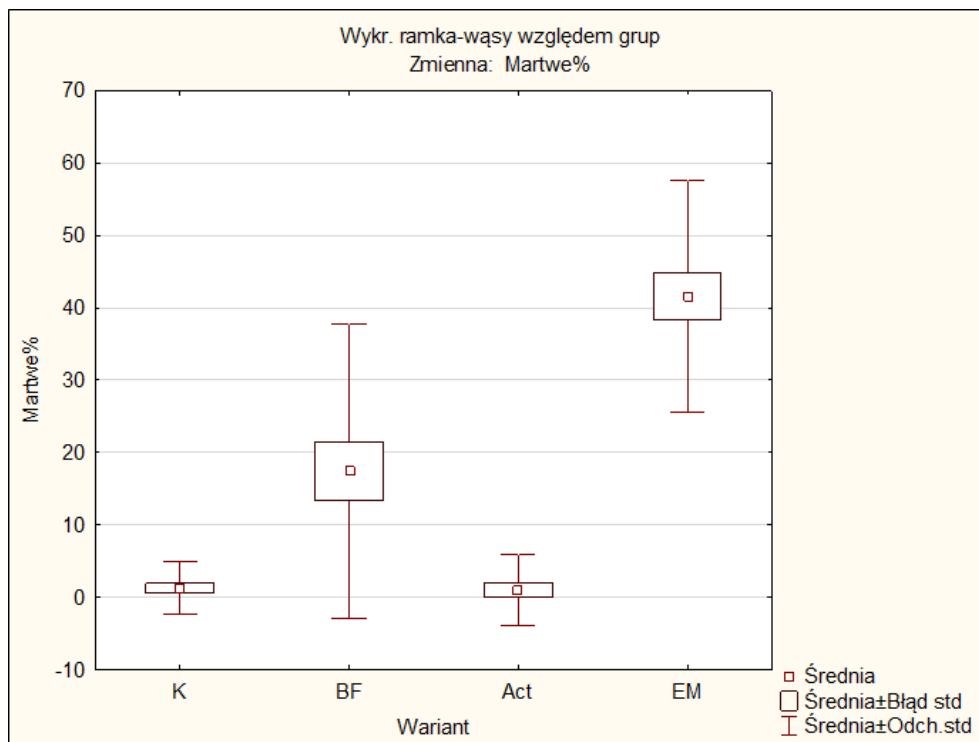
W oparciu o wyniki sekwencjonowania DNA wyróżnione morfotypy zaliczono do 8 taksonów grzybów mykoryzowych: *Pezizaceae* (A, K, M), *Hebeloma sacchariolens* (D, E, F, I), *Tuber* sp. 1 (B, C), *Tuber* sp. 2 (H), *Cenococum geophilum* (G), *Clavulina* sp. (J), *Scleroderma areolatum* (N) i *Peziza* sp. (L, O) (Ryc. 56).



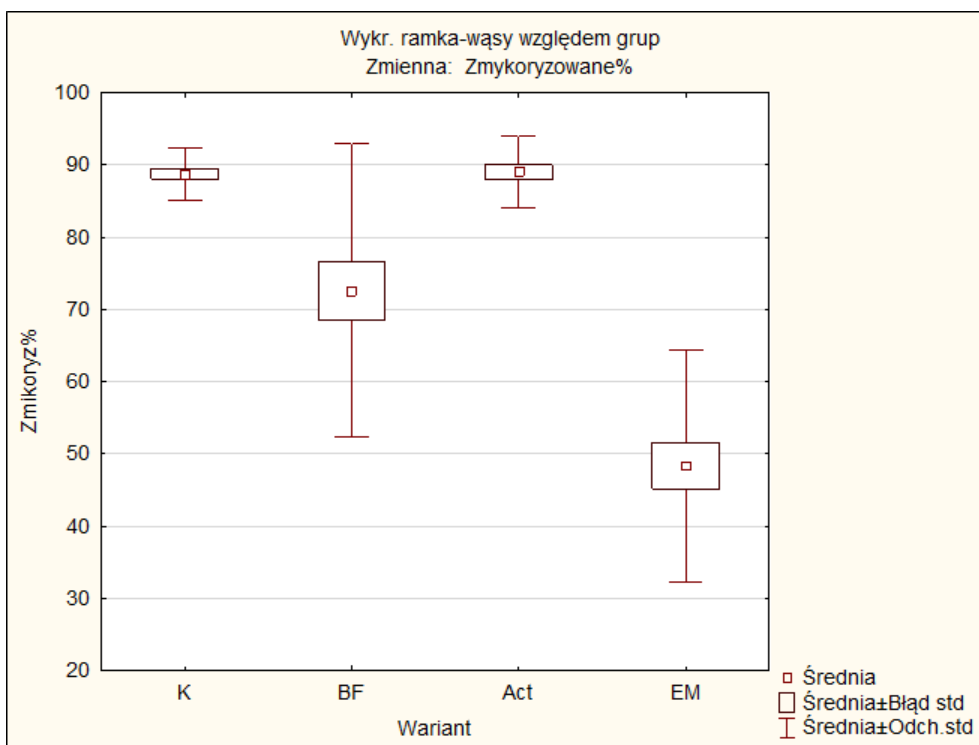
Ryc. 56. Udział [%] głównych taksonów grzybów mykoryzowych w poszczególnych wariantach doświadczenia. Wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami są istotne statystycznie na poziomie istotności $p \leq 0.05$. Warianty: (BF) Busz Forte; (Act) Actiphos; (EM) Efektywne Mikroorganizmy

Największym zróżnicowaniem morfotypów charakteryzowały się korzenie pochodzące z wariantu nawożonego preparatem Actifos, u których stwierdzono 8 różnych grzybów mykoryzowych. Dominowały tam grzyby z rodzaju *Pezizaceae* (85%), które cechowały się gładką mufką o średniej grubości, koloru beżowego do jasnopomarańczowego. Najmniejszą różnorodnością morfotypów charakteryzowały się próby korzeniowe z wariantu nawożonego preparatem EM (5 gatunków), w których w szczególności dominował grzyb *Hebeloma sacchariolens* (89%). Podobnie też, w wariacie opryskanym preparatem Busz Forte, jak i w kontroli największy udział stanowiły grzyby z rodzaju *Pezizaceae*.

Podstawowe statystyki opisowe zostały przedstawione na rycinach 57 i 58.



Ryc. 57. Udział % martwych wierzchołków mykoryzowych w poszczególnych wariantach doświadczenia: (BF) Busz Forte; (Act) Actiphos; (EM) Efektywne Mikroorganizmy



Ryc. 58. Udział korzeni zmykoryzowanych w poszczególnych wariantach doświadczenia. Warianty: (BF) Busz Forte; (Act) Actiphos; (EM) Efektywne Mikroorganizmy

Współczynnik korelacji rang Spearmana wykazał siłę związku pomiędzy szerokością w szyjce korzeniowej, wysokością pędu oraz długością korzenia, a procentem martwych wierzchołków mykoryzowych i stopniem zmykoryzowania dla wariantu sadzonek traktowanych preparatem Busz Forte. W pozostałych wariantach nie wykryto siły związku pomiędzy parametrami biometrycznymi, a stopniem zmykoryzowania sadzonek (Tab. 17).

Tabela 17. Korelacja porządku rang Spearmana dla sadzonek traktowanych preparatem Busz Forte (BF). Na czerwono oznaczono poziom istotności.

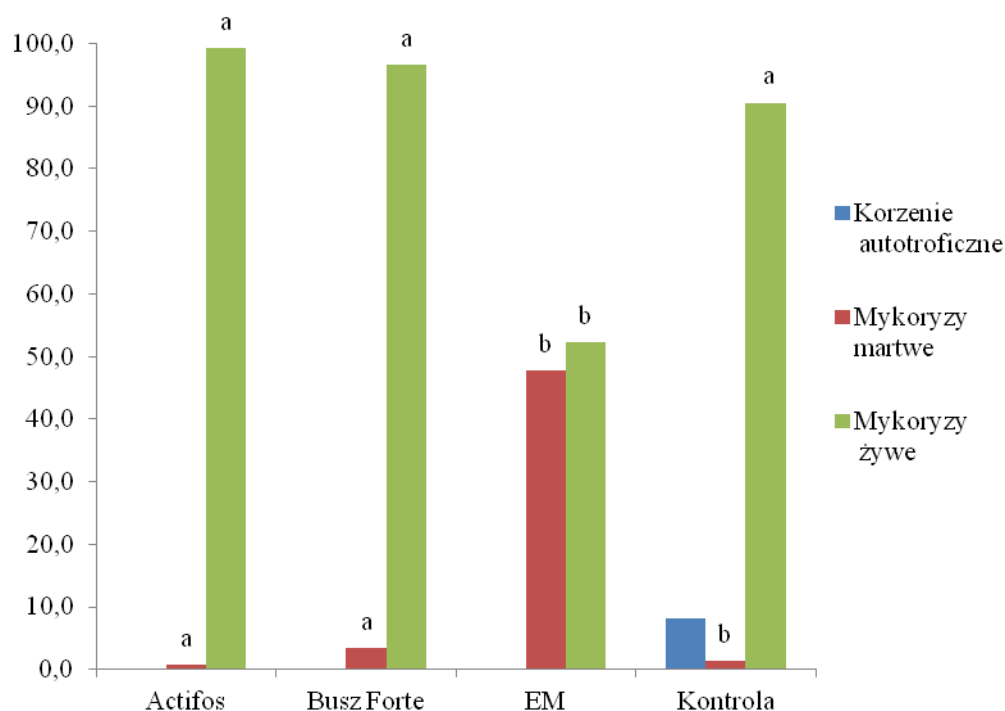
	Martwe	Zmykoryzowane
Szerokość w szyjce korzeniowej [mm]	-0,51977	0,51977
Wysokość pędu [cm]	-0,46277	0,46277
Długość korzenia [cm]	0,67636	-0,67636

Dąb szypulkowy

Rodzaj *Quercus* stanowi klasyczny przykład jednostki systematycznej, której przedstawiciele dla prawidłowego rozwoju wymagają obecności na korzeniach grzybów ektomykoryzowych (Leski i in. 2010). Szczególnie istotnym jest ten rodzaj symbiozy dla młodych dębów w szkółkach leśnych. Mykoryzy zasadniczo poprawiają wzrost, rozwój i przeżywalność siewek i sadzonek oraz pomagają przetrwać szok związany z przesadzeniem ich na uprawę i adaptacją w nowym miejscu (Aleksandrowicz-Trzcińska 2004; Leski i in. 2009). W chwili obecnej w oparciu o identyfikację morfologiczno-anatomiczną oraz molekularną, dębom w początkowych fazach rozwojowych przypisuje się 23 taksony grzybów, z którymi mogą wchodzić w związki mykoryzowe (Leski i in. 2010).

Podczas prac kameralnych badaniom i ocenie podlegały systemy korzeniowe pozyskanych sadzonek dwuletnich dębów. W efekcie zostały wyróżnione trzy grupy korzeni: autotroficzne, z mykoryzami żywymi oraz z mykoryzami martwymi.

W zależności od wariantu, z którego pochodziły dane próby korzeniowe stosunek ilościowy powyższych grup był zróżnicowany (Ryc. 59).



Ryc. 59. Udział (%) mykoryz i korzeni autotroficznych sadzonek dębu szypułkowego w poszczególnych wariantach. Tą samą literą nad kolumną oznacza brak różnic statystycznych ($p \leq 0,05$)

Największy procentowy udział stwierdzono w przypadku korzeni z mykoryzami żywymi, średnio w całym doświadczeniu wyniósł on 84,57% (odchylenie standardowe 23,71). Jednoczynnikowa analiza wariancji dla rang Kruskala-Walisa wykazała istotne statystycznie różnice w udziale mykoryz żywych w zależności od zastosowanego preparatu ($p=0,0010$). Po wykonaniu testu wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób stwierdzono, że istotnie statystycznie najmniej żywych mykoryz znajdowało się w próbach korzeniowych pochodzących z wariantu z wykorzystaniem środka EM. W pozostałych wariantach i kontroli udział mykoryz żywych był na podobnym poziomie i nie różnił się w sposób statystycznie istotny.

Obecność martwych mykoryz odnotowano we wszystkich wariantach i kontroli, przy czym istotnie statystycznie największy ich udział procentowy stwierdzono w wariantcie, gdzie zastosowano preparat EM (47,8%). W przypadku kontroli oraz pozostałych wariantów udział procentowy martwych mykoryz znajdował się na podobnym poziomie. Udział martwych mykoryz w całym doświadczeniu wynosił średnio 13,41% (odchylenie

standardowe 23,52). Test Kruskala-Walisa potwierdził istotne statystycznie różnice w udziale korzeni martwych ($p = 0,0000$).

Najmniejszy procentowy udział w całym doświadczeniu stwierdzono w przypadku korzeni autotroficznych, które zaobserwowano tylko w próbach korzeniowych pochodzących z kontroli (Tab. 18)

Tabela 18. Udział (%) korzeni autotroficznych i martwych w poszczególnych wariantach

Preparat	Korzenie autotroficzne	Mykoryzy martwe	Mykoryzy żywe
Actifos	0,0	0,7	99,3
Busz Forte	0,0	3,5	96,5
EM	0,0	47,8	52,2
Kontrola	8,1	1,4	90,5

W efekcie obserwacji mikroskopowych korzeni mykoryzowych wyróżniono 15 morfotypów, czyli mykoryz o typowym dla siebie zespole cech morfologicznych. Po uzyskaniu wyników analiz DNA, 15 wyróżnionych morfotypów zaliczono do 8 taksonów grzybów mykoryzowych. (Ryc.60 -74).



Ryc. 60. Morfotyp A *Tuber* sp.



Ryc. 61. Morfotyp B *Naucoria* sp.



Ryc. 62. Morfotyp C *Naucoria* sp.



Ryc. 63. Morfotyp D *Inocybe* sp.



Ryc. 64. Morfotyp E *Inocybe* sp.



Ryc. 65. Morfotyp F *Helotiales*



Ryc. 66. Morfotyp G *Naucoria* sp.



Ryc. 67. Morfotyp H *Tuber* sp.



Ryc. 68. Morfotyp I *Helotiales*



Ryc. 69. Morfotyp J *Scleroderma* sp.



Ryc. 70. Morfotyp J *Scleroderma* sp.



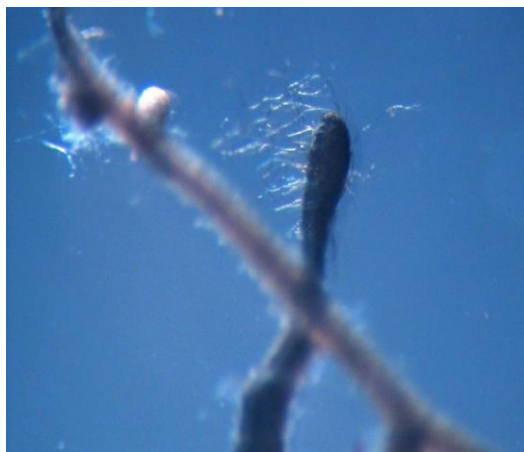
Ryc. 71. Morfotyp L *Laccaria* sp.



Ryc. 72. Morfotyp Ł *Peziza* sp.



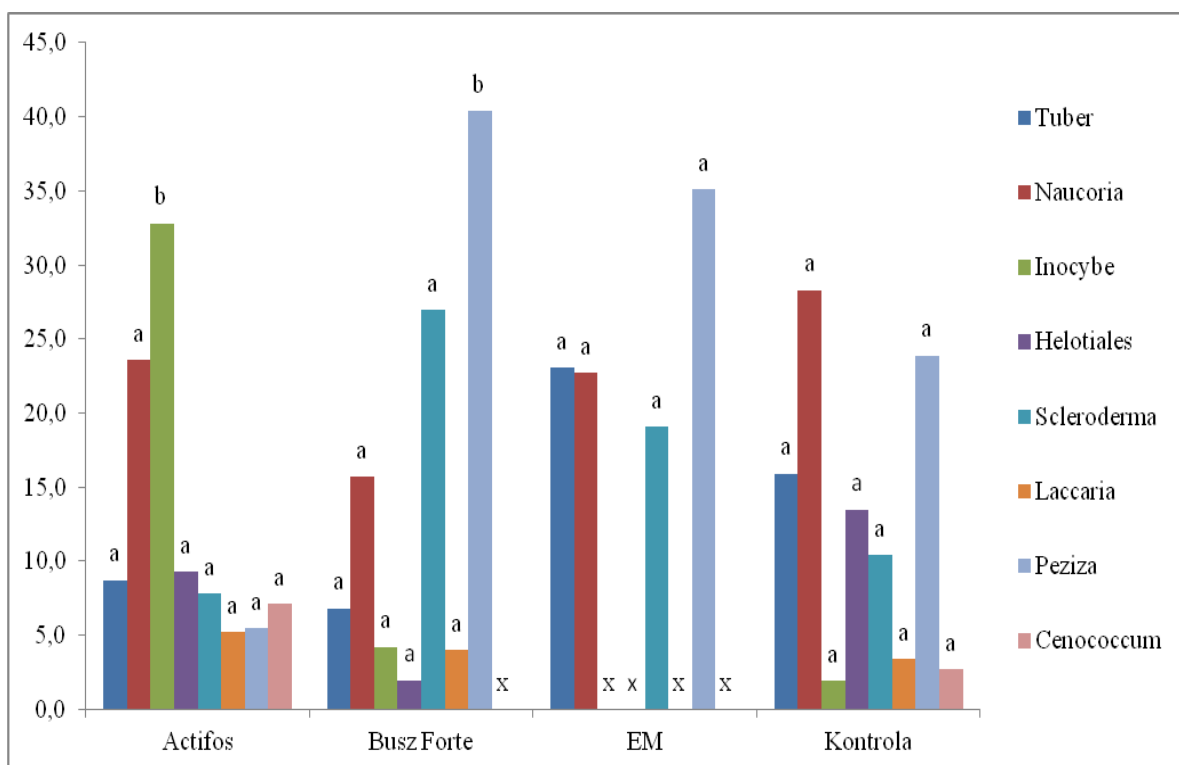
Ryc. 73. Morfotyp M *Peziza* sp.



Ryc. 74. Morfotyp N *Cenococcum geophilum*

Największą różnorodnością mykoryz charakteryzowały się korzenie pobrane z dębów pochodzące z wariantu z zastosowaniem preparatu Actifos oraz kontroli (Ryc. 75). Stwierdzono na nich występowanie mykoryz tworzonych przez 8 gatunków grzybów mykoryzowych. W przypadku wariantu Actifos dominowały mykoryzy tworzone przez grzyby z rodzaju *Inocybe* (32,8%), w kontroli były to mykoryzy tworzone przez grzyby z rodzaju *Naucoria* (28,3%). Najmniejszą różnorodnością mykoryz charakteryzowały się próby korzeniowe pochodzące z wariantu, w którym zastosowano preparat EM – 4 gatunki.

Największy udział w całym doświadczeniu wykazały mykoryzy tworzone przez grzyby z rodzaju *Pezizaceae* (24,9%) oraz *Naucoria* (22,5%). Mykoryzy *Pezizaceae* dominowały we wszystkich wariantach poza Actifos, gdzie przeważały mykoryzy tworzone przez *Inocybe*. Symbiozy mykoryzowe tworzone przez *Naucoria* zaobserwowano we wszystkich wariantach. W sposób istotny statystycznie udział mykoryz *Pezizaceae* różnił się w wariantcie Busz Forte (udział w wariantcie 40,4%; $p = 0,0005$), natomiast mykoryz *Inocybe* w wariantcie Actifos (udział w wariantcie 32,8%, $p = 0,000$).



Ryc. 75. Udział (%) głównych taksonów grzybów mykoryzowych w poszczególnych wariantach. Ta sama litera nad kolumną oznacza brak różnic statystycznych (test Kruskala – Walisa $p \leq 0,05$)

Dyskusja

Największe zróżnicowanie grzybów mykoryzowych u sadzonek buka zwyczajnego (7 taksonów) występowało w wariacie z preparatem Actifos, gdzie podwyższony poziom azotu i fosforu związany jest ze stosowaniem wyżej wymienionego preparatu. Podając za Pietras i in. (2013), w szkółkach nawożonych ściółką leśną (zwiększony poziom N i P) stosowaną w celu poprawy właściwości fizycznych gleby, która jest źródłem związków organicznych, notowano obfitsze inokulum grzybów ektomykoryzowych. W tym samym wariacie możemy zauważyć zahamowanie rozwoju grzybów z rodzaju *Hebeloma* (3,2 %) w porównaniu z kontrolą, gdzie udział tych workowców stanowił blisko 40%. Podobną zależność stwierdzono w badaniach prowadzonych przez Rolbiecki i in. (2009), gdzie ściółkowanie próchnicą nakładową zwiększyło udział grzybów z rodzaju *Hebeloma* do 25% w porównaniu do kontroli (brak ściółkowania), gdzie nie wystąpiły grzyby mykoryzowe tego rodzaju.

Doświadczenie z wykorzystaniem Busz Forte odzwierciedla strukturę grzybów w ryzosferze w podobnych proporcjach w stosunku do kontroli. W wariancie z wykorzystaniem efektywnych mikroorganizmów (EM) odnotowano fakt, że stymulują one rozwój *Hebeloma sacchariolens*, a zarazem silnie ograniczają grzyby z rodziny *Pezizaceae*. W wariancie tym stwierdzono również najmniejszą różnorodność gatunkową (5 taksonów).

W każdym wariancie doświadczenia, a także kontroli notowano głównie grzyby z taksonu *Pezizales*. Do takich grzybów należy między innymi *Wilcoxina*, często spotykana w szkółkach. Rudawska i in. (2006) donoszą, że grzyby należące do rodzaju *Wilcoxina* występują w szkółkach głównie na glebach bogatych w składniki odżywcze i dość obficie nawożonych azotem. Możemy to zaobserwować w wariancie z preparatem Actifos, gdzie grzyby z rodzaju *Pezizaceae* stanowią maksimum obfitości występowania (85%).

Grzyby z rodzaju *Tuber* sp. stanowiły ponad 6% wśród wszystkich grzybów mykoryzowych. Mimo, że były powszechne we wszystkich wariantach, to ich obfitość była znacznie mniejsza w porównaniu z innymi workowcami z rodzaju *Pezizaceae* (45,6%). Może to odzwierciedlać ograniczone inokulum *Tuber* sp. w warunkach szkółkarskich, bądź słabą konkurencyjność w stosunku do innych grzybów mykoryzowych.

Cenococcum geophilum, którego udział w wariantach Busz Forte i Actifos jest marginalny (0,8% i 0,2%), stanowi ponad 6% udział w wariancie EM. Piggot (1982) wykazał, że niska wilgotność podłoża determinuje wzrost udziału mykoryz tworzonych przez *Cenococcum geophilum*. Na podstawie tabeli 19 możemy stwierdzić znaczny udział korzeni martwych w wariancie EM w porównaniu z innymi preparatami użytymi w doświadczeniu.

Tabela 19. Udział (%) korzeni zmykoryzowanych i martwych sadzonek buka zwyczajnego w poszczególnych wariantach

	Mykoryzy martwe	Mykoryzy żywe
Actifos	0,79	99,21
Busz Forte	16,62	83,38
EM	44,84	55,16
Kontrola	0,58	99,42

Tak duży udział korzeni martwych może być wynikiem hamowania wzrostu korzeni przez roślinę gospodarza, bądź bezpośrednie działanie czynnika stresowego, jakim może być niska wilgotność podłoża. Czynniki te mogą mieć także wpływ na małe zróżnicowanie grzybów mykoryzowych w tym wariancie. Worley i Hackalyo (1959) zwracają uwagę na fakt, iż niska wilgotność podłoża może być czynnikiem, który kształtuje skład zbiorowiska grzybów mykoryzowych.

Wnioski

1. Związki ektomykoryzowe notowane w szkółce w Nadl. Chojnów charakteryzowały się różną względną obfitością taksonów mykoryzowych zależnie od wariantu nawożenia. Względna obfitość taksonów grzybów mykoryzowych była różna w zależności od zastosowanego preparatu.

2. Najczęściej spotykaną grupą były grzyby z rodziny *Pezizaceae*, wstępujące w związki mykoryzowe z roślinami pochodzącymi z hodowli szkółkarskiej.

3. Sadzonki traktowane efektywnymi mikroorganizmami cechowały się głównie występowaniem w związki mykoryzowe z grzybami z rodzaju *Hebeloma sacchariolens*.

4. Wykazano małą efektywność, a nawet szkodliwość preparatu EM na stopień mykoryzacji. Natomiast stosowanie fosforynów (Actifos) oraz preparatu Busz Forte nie miało wpływu na stopień mykoryzacji.

5. Sadzonki traktowane preparatem Actifos cechowały się występowaniem symbioz mykoryzowych z grzybem *Inocybe*.

6. Obecność mykoryz *Naucoria (Alnicola)* na korzeniach dębu szypułkowego, które są typowe dla drzew z rodzaju *Alnus*, wynikała prawdopodobnie z bliskiego położenia kwater z olszą.

3.3.3. Analizy chemiczne gleb

Metodyka

Analizy chemiczne gleby wykonano w Pracowni Chemii Środowiska Leśnego IBL na zawartość podstawowych pierwiastków (N, P, K, Ca i Mg), mikroelementów oraz odczynu kwasowości według standardowej metodyki stosowanej w akredytowanych laboratoriach. Zalecenia gleboznawczo-nawożeniowe wykonane zostały na podstawie wyników badania zbiorczych próbek gleby pochodzących ze szkółek w nadleśnictwach: Bielsk, Nowogród, Hajnówka, Chojnów i Jawor.

Wyniki

Analizy podstawowych składników pokarmowych w glebach nawożonych i kontrolnych, na których uprawiano podstawowe gatunki lasotwórcze zamieszczono w tabeli 18.

Tabela 18. Analizy chemiczne próbek gleby ze szkółek leśnych

Wariant doświadczenia	pH-H ₂ O ^{A)}	pH-KCl ^{A)}	Nog ^{A)}	Cog ^{A)}	C/N	P ₂ O ₅	Ca ⁺²	K ⁺	Mg ⁺²	Na ⁺
			%	%	-	mg/100g	mg/100g			
	PN-ISO 10390:1997		PN-ISO 13878:2002	PN-ISO 10694:2002	-	PB-20 ed.2, z dnia 01.01.2010	PB-05 ed.2, z dnia 01.01.2010			
Granica oznaczalności (LoQ)	-	-	0,01	0,01	-	0,5	0,1	0,5	0,1	0,2
Nadleśnictwo Bielsk, szkółka Czechy										
Nawóz zielony	5,8	4,7	0,172	2,466	14,3	14,9	109,1	8,5	2,5	0,12
Kontrola	5,8	4,8	0,160	2,459	15,4	13,6	108,7	5,6	2,4	0,21
Nadleśnictwo Nowogród, szkółka Gawrychy										
Nawóz zielony	6,0	4,9	0,113	2,278	20,2	5,0	101	4,1	4,3	0,34
Kontrola	5,6	4,5	0,150	3,221	21,4	7,6	138	4,6	6,5	0,56
Nadleśnictwo Hajnówka, szkółka Budy										
Dąb	5,8	4,8	0,221	3,185	14,4	8,8	173,8	6,5	3,5	0,59
Świerk	6,3	5,3	0,302	4,898	16,2	9,3	305,7	16	9,2	0,79
Nadleśnictwo Chojnów, szkółka Żabieniec										
Dąb	5,9	5,0	0,22	3,111	13,9	25,67	166	2,0	5,1	0,3
Buk	6,3	5,4	0,16	2,338	14,6	16,52	137	1,1	4,2	0,4
Olcha	7,4	7,0	0,10	1,311	13,0	25,37	151	1,6	3,8	0,4
Nadleśnictwo Jawor, szkółka Muchów										
Przed zabiegami	6,1	5,2	0,233	3,952	17,0	9,8	218,0	19,4	10,1	0,3
Kontrola	6,0	5,1	0,264	4,292	16,3	11,3	232,3	10,8	9,3	0,63
Mocznik + Bioekor	6,1	5,1	0,258	4,244	16,5	11,6	227,8	10,7	9,1	0,67
Mocznik + Florovit	6,0	5,1	0,247	4,056	16,5	9,1	221,5	10,5	8,9	0,66
Saletra + Bioekor	5,9	5,0	0,272	4,446	16,4	10,0	229,3	10,6	9,3	0,66
Saletra + Florovit	5,9	4,9	0,261	4,244	16,3	11,4	214,8	9,9	8,7	0,67
Mocznik + Saletra	6,1	5,1	0,262	4,343	16,6	12,8	247,8	10,0	9,5	0,61

Gleby nawożone nawozami zielonymi

Nadleśnictwo Bielsk

Odczyn

Gleby na których wysiana została gorczyca i utrzymywany jest ugór czarny charakteryzują się zbyt wysokim odczynem dla produkcji szkółkarskiej, w związku z czym przed rozpoczęciem najbliższego cyklu produkcyjnego rozważyć trzeba przeprowadzanie na niej zabiegu regulacji odczynu.

Materia organiczna

Gleba reprezentowana przez badane próbki zawiera wystarczającą ilość dobrze rozłożonej materii organicznej, w związku z czym przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego nie ma potrzeby nawożenia organicznego.

Nawożenie azotem

W okresie wegetacji zaleca się wykonywanie pogłównego nawożenia azotem w dwóch dawkach (terminach).

Dawki te we wszystkich badanych glebach powinny wynosić 2 razy po 20 kg N na hektar pod iglaste (oprócz So i Md), lub 2 razy po 25 kg N na hektar pod liściaste (plus So i Md). W drugim roku należy zwiększyć dawki azotu o 5 kg N na ha w obu terminach nawożenia pogłównego. W latach następnych stosować dawki 2 x 30 kg N na hektar pod iglaste, lub 2 x 35 kg N na hektar pod liściaste.

Nawożenie fosforem

Gleby na wszystkich badanych kwaterach charakteryzują się wystarczającą zawartością przyswajalnego fosforu. Dlatego też, w bieżącym cyklu produkcyjnym, nie ma konieczności nawożenia tym składnikiem.

Nawożenie potasem

Optymalna zawartość potasu w glebach przeznaczonych do produkcji szkółkarskiej wynosi co najmniej 10,0÷12,0 mg K na 100 g gleby. Tymczasem w badanych glebach zawartość tego składnika pokarmowego waha się w granicach 5,6÷8,5 mg K na 100 g gleby. Dlatego też, w celu poprawy zasobności gleb, zaleca się wykonanie nawożenia potasem w następujących dawkach:

1. na glebie reprezentowanej przez próbkę „nawóz zielony” – w dawce 45 kg K₂O na hektar pod iglaste (bez Md), lub 60 kg K₂O na hektar pod liściaste (plus Md),
2. na glebach reprezentowanych przez próbki „kontrola” – w dawce 60 kg K₂O na hektar pod iglaste (bez Md), lub 80 kg K₂O na hektar pod liściaste (plus Md),

Nawożenie magnezem

Zaleca się następujące dawki nawożenia magnezem na glebie reprezentowanej przez próbki „nawóz zielony” oraz „kontrola” – dawka 30 kg MgO/ha,

Należy pamiętać aby:

- nawożenie potasem i magnezem stosować zgodnie z podanymi dawkami, co dwa lata (na dwuletnie cykle produkcyjne) i pod szkółkowanie;
- na trzyletnie cykle produkcyjne dawki podwyższyć o 50 % w stosunku do podanych wyżej, pamiętając jednak aby nie przekroczyć maksymalnych dawek potasu (120 kg K₂O na ha pod iglaste, lub 140 kg K₂O na ha pod liściaste);
- na cykle jednoroczne dawki potasu i magnezu zmniejszyć o 30%.

Nadleśnictwo Nowogród

Odczyn

Gleba reprezentowana przez obie badane próbki charakteryzuje się odczynem odpowiednim do produkcji szkółkarskiej (pH_{KCl} 4,5 oraz 4,9, przy optimum wynoszącym od 4,3 do 5,7), w związku z czym w najbliższym cyklu produkcyjnym nie ma potrzeby przeprowadzania zabiegu regulacji odczynu.

Materia organiczna

Gleba reprezentowana przez obie badane próbki zawiera wystarczającą ilość dobrze rozłożonej materii organicznej, w związku z czym przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego nie ma potrzeby stosowania nawożenia organicznego.

Nawożenie azotem

W okresie wegetacji zaleca się wykonywanie pogłównego nawożenia azotem w dwóch dawkach (terminach). Dawki te powinny wynosić:

- dla gleby reprezentowanej przez próbkę „nawóz zielony” $\Rightarrow$ 2 razy po 20 kg N na hektar pod iglaste (oprócz So i Md), lub 2 razy po 25 kg N na hektar pod liściaste (plus So i Md). W drugim roku należy zwiększyć dawki azotu o 5 kg N na ha w obu terminach nawożenia pogłównego. W latach następnych stosować dawki 2 x 35 kg N na hektar pod iglaste, lub 2 x 40 kg N na hektar pod liściaste,
- dla gleby reprezentowanej przez próbkę „kontrola” $\Rightarrow$ 2 razy po 15 kg N na hektar pod iglaste (oprócz So i Md), lub 2 razy po 20 kg N na hektar pod liściaste (plus So i Md). W drugim roku należy zwiększyć dawki azotu o 5 kg N na ha w obu terminach nawożenia pogłównego. W latach następnych stosować dawki 2 x 30 kg N na hektar pod iglaste, lub 2 x 35 kg N na hektar pod liściaste.

Nawożenie fosforem

Gleby reprezentowane przez obie badane próbki charakteryzują się wystarczającą zawartością przyswajalnego fosforu. Dlatego też, w najbliższym cyklu produkcyjnym, nie ma konieczności nawożenia tym składnikiem.

Jednakże zawartość przyswajalnego fosforu w glebie reprezentowanej przez próbkę „nawóz zielony” zbliża się do granicy wystarczająca/niewystarczająca, w związku z czym na tej glebie celowe było by dostarczenie sadzonkom tzw. „świeżych” fosforanów, stosując dawkę 40 kg P_2O_5 na hektar. Zabieg ten jest wskazany zwłaszcza wtedy, gdy planowana jest produkcja wieloletek.

Nawożenie potasem

Gleba reprezentowana przez obie badane próbki charakteryzuje zbyt niską zasobnością w przyswajalny potas (4,1 oraz 4,6 mg K na 100 g gleby). W związku z tym, przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego, zaleca się wykonanie nawożenia potasem w jednakowej dawce, wynoszącej 80 kg K_2O na hektar pod iglaste (bez Md), lub 100 kg K_2O na hektar pod liściaste (plus Md).

Nawożenie magnezem

Gleba reprezentowana przez obie badane próbki zawiera wystarczającą ilość wymiennego magnezu, w związku z czym w najbliższym cyklu produkcyjnym nawożenie tym składnikiem nie jest wskazane.

Uwaga:

- nawożenie, fosforem i potasem zaleca się stosować zgodnie z podanymi dawkami co dwa lata (na dwuletnie cykle produkcyjne) i pod szkółkowanie;
- na trzyletnie cykle produkcyjne dawki należy podwyższyć o 50 % w stosunku do podanych wyżej, pamiętając jednak aby nie przekroczyć maksymalnych dawek potasu (120 kg K₂O na ha pod iglaste, lub 140 kg K₂O na ha pod liściaste);
- na cykle jednoroczne dawki potasu można zmniejszyć o 30%.

Nawozy fosforynowe i azotowe**Nadleśnictwo Hajnówka****Odczyn**

Gleby na których rośnie dąb i świerk (Nadleśnictwo Hajnówka) charakteryzują się zbyt wysokim odczynem dla produkcji szkółkarskiej, szczególnie dla świerka (odpowiednie pH_{KCl} powinno oscylować 4,7 – 5,3), w związku z czym przed rozpoczęciem najbliższego cyklu produkcyjnego rozważyć trzeba przeprowadzanie na niej zabiegu regulacji odczynu.

Materia organiczna

Gleba reprezentowana przez badane próbki zawiera wystarczającą ilość dobrze rozłożonej materii organicznej, w związku z czym przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego nie ma potrzeby nawożenia organicznego.

Nawożenie azotem

W okresie wegetacji zaleca się wykonywanie pogłównego nawożenia azotem w dwóch dawkach (terminach).

Dawki te na wszystkich badanych glebach powinny wynosić 2 razy po 20 kg N na hektar pod iglaste (oprócz So i Md), lub 2 razy po 25 kg N na hektar pod liściaste (plus So i Md). W drugim roku należy zwiększyć dawki azotu o 5 kg N na ha w obu terminach nawożenia pogłównego. W latach następnych stosować dawki 2 x 30 kg N na hektar pod iglaste, lub 2 x 35 kg N na hektar pod liściaste.

Nawożenie fosforem

Gleby na wszystkich badanych kwaterach charakteryzują się wystarczającą zawartością przyswajalnego fosforu. Dlatego też, w bieżącym cyklu produkcyjnym, nie ma konieczności nawożenia tym składnikiem.

Nawożenie potasem

Optymalna zawartość potasu w glebach przeznaczonych do produkcji szkółkarskiej wynosi co najmniej $10,0 \div 12,0$ mg K na 100 g gleby. Tymczasem w badanych glebach zawartość tego składnika pokarmowego waha się w granicach $6,5 \div 16$ mg K na 100 g gleby. Dlatego też, w celu poprawy zasobności gleb, zaleca się wykonanie nawożenia potasem w następujących dawkach:

1. na glebach reprezentowanych przez próbkę „Dąb” – w dawce 60 kg K_2O na hektar pod iglaste (bez Md), lub 80 kg K_2O na hektar pod liściaste (plus Md),
2. na glebie reprezentowanej przez próbkę „Świerk” nawożenie potasem w najbliższym cyklu produkcyjnym nie jest konieczne.

Nawożenie magnezem

Zaleca się następujące dawki nawożenia magnezem:

1. na glebie reprezentowanej przez próbkę „Dąb” – dawka 20 kg MgO/ha ,
2. na glebie reprezentowanej przez próbkę „Świerk” nawożenie magnezem przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego nie jest konieczne.

Należy pamiętać aby:

- nawożenie potasem i magnezem stosować zgodnie z podanymi dawkami, co dwa lata (na dwuletnie cykle produkcyjne) i pod szkółkowanie;
- na trzyletnie cykle produkcyjne dawki podwyższyć o 50 % w stosunku do podanych wyżej, pamiętając jednak aby nie przekroczyć maksymalnych dawek potasu (120 kg K_2O na ha pod iglaste, lub 140 kg K_2O na ha pod liściaste);

na cykle jednoroczne dawki potasu i magnezu zmniejszyć o 30%.

Nadleśnictwo Chojnów

Odczyn

W produkcji szkółkarskiej optymalne pH_{KCl} dla gleb lżejszych powinno zawierać się w granicach $4,3 \div 5,5$, a dla gleb cięższych – w granicach $4,5 \div 5,7$.

Zarówno niższe, jak i wyższe wartości pH gleb nie są wskazane, głównie ze względu na niekorzystne zmiany przyswajalności składników pokarmowych lub – przy zbyt wysokim pH – konkurencję między grzybami mykoryzowymi a bakteriami.

W związku z powyższym:

- w glebie reprezentowanej przez próbki „olcha” należy dążyć do obniżenia pH_{KCl} , które aktualnie ma wartość 7,0. Regulacja odczynu gleby, polegająca na jej zakwaszaniu poprzez dodawanie kwasu siarkowego, bądź siarki rodzimej, jest dosyć kłopotliwa i w tym przypadku nie jest konieczna. Zaleca się jedynie używanie nawozów azotowych fizjologicznie kwaśnych (np. siarczanu amonu), a w przyszłości stosowanie nawożenia organicznego odpowiednio kwaśnym kompostem (pH_{KCl} od 3,5 do 5,0),
- gleba z pozostałych kwater charakteryzuje się odczynem odpowiednim do produkcji szkółkarskiej (pH_{KCl} $5,0 \div 5,4$). Przed rozpoczęciem najbliższego cyklu produkcyjnego nie ma potrzeby przeprowadzania w niej zabiegu regulacji odczynu.

Materia organiczna

1. Gleba reprezentowana przez próbkę „olcha” zawiera niewystarczającą ilość materii organicznej (1,31 % C), dlatego też – przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego – należy zastosować na niej nawożenie organiczne kwaśnym kompostem (pH_{KCl} od 3,5 do 5,0) w dawce co najmniej $3,0 \text{ m}^3$ na ar.
2. Gleba reprezentowana przez pozostałe próbki zawiera wystarczającą ilość dobrze rozłożonej materii organicznej, w związku z czym przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego nie ma potrzeby nawożenia organicznego.

Nawożenie azotem

W okresie wegetacji zaleca się wykonanie pogłównego nawożenia azotem w dwóch dawkach (terminach). Dawki te powinny wynosić dla gleb reprezentowanych przez próbki „dąb”, „buk” oraz „olcha” 2 razy po 20 kg N na hektar pod iglaste (oprócz So i Md), lub 2 razy po 25 kg N na hektar pod liściaste (plus So i Md). W drugim roku należy zwiększyć dawki azotu o 5

kg N na ha w obu terminach nawożenia pogłównego. W latach następnych stosować dawki 2 x 35 kg N na hektar pod iglaste, lub 2 x 40 kg N na hektar pod liściaste. Jeżeli na glebie reprezentowanej przez próbkę „olcha” zastosowane zostanie nawożenie organiczne, dawki azotu w pierwszym roku można zmniejszyć o 20%,

Nawożenie fosforem

Gleba na wszystkich badanych kwaterach charakteryzuje się wystarczającą zawartością przyswajalnego fosforu. Dlatego też, w najbliższym cyklu produkcyjnym, nie ma konieczności nawożenia tym składnikiem.

Nawożenie potasem

Gleba reprezentowana przez badane próbki charakteryzuje zbyt niską zasobnością w przyswajalny potas (od 1,1 do 2,0 mg K na 100 g gleby). W związku z tym, przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego, zaleca się wykonanie nawożenia potasem w następujących dawkach:

- w glebie reprezentowanej przez próbki „dąb”, „buk” oraz „olcha” – w dawce 100 kg K₂O na hektar pod iglaste (bez Md), lub 120 kg K₂O na hektar pod liściaste (plus Md),

Nawożenie magnezem

1. Gleba reprezentowana przez próbki „buk” oraz „olcha” zawiera nieco zbyt mało wymiennych form Mg, w związku z czym zaleca się wykonanie na niej tym składnikiem w dawce 25 kg MgO na hektar.
2. Gleba reprezentowana próbkę „dąb” zawiera wystarczającą ilość wymiennego magnezu, w związku z czym w najbliższym cyklu produkcyjnym nawożenie tym składnikiem nie jest wskazane.

Uwaga:

- nawożenie potasem i magnezem zaleca się stosować zgodnie z podanymi dawkami co dwa lata (na dwuletnie cykle produkcyjne) i pod szkółkowanie;
- na trzyletnie cykle produkcyjne dawki należy podwyższyć o 50 % w stosunku do podanych wyżej, pamiętając jednak aby nie przekroczyć maksymalnych dawek potasu (120 kg K₂O na ha pod iglaste, lub 140 kg K₂O na ha pod liściaste);
- na cykle jednoroczne dawki potasu i magnezu można zmniejszyć o 30%.

Nadleśnictwo Jawor

Szkółka Muchów (Nadl. Jawor) w momencie rozpoczęcia doświadczenia posiadała aktualne „Zalecenia gleboznawczo – nawożeniowe” wykonane w kwietniu 2012 roku w Pracowni Chemii Środowiska Leśnego IBL (tabela 1). Wyniki analizy pozwoliły na sformułowanie zaleceń nawożeniowych dla tego fragmentu kwatery. Ograniczały się one do zalecenia zastosowania dawki czystego azotu w ilości 50 kg N/ha w dwóch dawkach po 25 kg N/ha dla gatunków liściastych w pierwszym roku życia i 60 kg N/ha w dwóch dawkach po 30 kg N/ha dla gatunków liściastych w drugim roku życia.

Po zakończeniu doświadczenia gleba pochodząca ze szkółki, charakteryzuje się właściwościami optymalnymi dla produkcji szkółkarskiej. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w chemizmie gleby, spowodowanych stosowaniem różnych wariantów nawożenia. Niezbędne są w niej tylko nieliczne, opisane niżej, korekty zawartości potasu. Poniżej przedstawiono uwagi szczegółowe dotyczące poszczególnych właściwości gleby wraz z zaleceniami nawożeniowymi:

Odczyn

Gleby reprezentowane przez wszystkie badane próbki charakteryzują się odczynem odpowiednim do produkcji szkółkarskiej (pH_{KCl} 4,7÷6,0, przy optimum wynoszącym od 4,3 do 5,7), w związku z czym w najbliższym cyklu produkcyjnym nie ma potrzeby przeprowadzania zabiegu regulacji odczynu.

Materia organiczna

Gleby reprezentowane przez wszystkie badane próbki zawierają wystarczającą ilość dobrze rozłożonej materii organicznej, w związku z czym przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego nie ma potrzeby stosowania nawożenia organicznego.

Nawożenie azotem

W okresie wegetacji zaleca się wykonywanie pogłównego nawożenia azotem w dwóch dawkach (terminach). Dawki te powinny wynosić:

- dla gleby reprezentowanej przez próbkę D3 (blok D, wariant Mocznik + Florovit) $\Rightarrow$ 2 razy po 20 kg N na hektar pod iglaste (oprócz So i Md), lub 2 razy po 25 kg N na hektar pod liściaste (plus So i Md). W drugim roku należy zwiększyć dawki azotu o 5 kg N na

ha w obu terminach nawożenia pogłównego. W latach następnych stosować dawki 2 x 35 kg N na hektar pod iglaste, lub 2 x 40 kg N na hektar pod liściaste,

- dla gleb reprezentowanych przez pozostałe próbki $\Rightarrow$ 2 razy po 15 kg N na hektar pod iglaste (oprócz So i Md), lub 2 razy po 20 kg N na hektar pod liściaste (plus So i Md). W drugim roku należy zwiększyć dawki azotu o 5 kg N na ha w obu terminach nawożenia pogłównego. W latach następnych stosować dawki 2 x 30 kg N na hektar pod iglaste, lub 2 x 35 kg N na hektar pod liściaste.

Nawożenie fosforem

Gleby reprezentowane przez wszystkie badane próbki charakteryzują się wystarczającą zawartością przyswajalnego fosforu. Dlatego też, w najbliższym cyklu produkcyjnym, nie ma konieczności nawożenia tym składnikiem.

Nawożenie potasem

Gleba reprezentowana przez wszystkie badane próbki charakteryzuje nieco zbyt niską zasobnością w przyswajalny potas (od 8,4 do 12,3 mg K na 100 g gleby). W związku z tym, przed rozpoczęciem następnego cyklu produkcyjnego, zaleca się wykonanie nawożenia potasem w jednakowej dawce, wynoszącej 40 kg K₂O na hektar pod iglaste (bez Md), lub 60 kg K₂O na hektar pod liściaste (plus Md)

Nawożenie magnezem

Gleba reprezentowana przez wszystkie badane próbki zawiera wystarczającą ilość wymiennego magnezu, w związku z czym w najbliższym cyklu produkcyjnym nawożenie tym składnikiem nie jest wskazane.

Uwaga:

- nawożenie, potasem zaleca się stosować zgodnie z podanymi dawkami co dwa lata (na dwuletnie cykle produkcyjne) i pod szkółkowanie;
- na trzyletnie cykle produkcyjne dawki należy podwyższyć o 50 % w stosunku do podanych wyżej, pamiętając jednak aby **nie przekroczyć maksymalnych dawek potasu** (120 kg K₂O na ha pod iglaste, lub 140 kg K₂O na ha pod liściaste);
- na cykle jednoroczne dawki potasu można zmniejszyć o 30%.

Wnioski

1. Analizy chemiczne gleb umożliwiły ustalenie szczegółowych potrzeb nawożenia w badanych szkółkach leśnych.
2. W badanych próbkach gleb nie stwierdzono drastycznego braku podstawowych składników pokarmowych, mogących wywołać problemy w rozwoju hodowanych sadzonek. Chociaż, aby gleby w poszczególnych szkółkach leśnych charakteryzowały się właściwościami optymalnymi dla produkcji szkółkarskiej potrzebne są dodatkowe zabiegi nawożenia azotem, potasem, a czasami i magnezem. Zawartość fosforu jest w większości przypadków wystarczająca, podobnie jak i ilość rozłożonej materii organicznej.
3. Odczyn kwasowości gleb mieści się granicach dopuszczalnych dla hodowanych gatunków drzew. Gleby reprezentowane przez wszystkie badane próbki (po nawożeniu zielonym i mineralnym) charakteryzują się odczynem odpowiednim do produkcji szkółkarskiej (pH_{KCl} 4,7÷6,0, przy optimum wynoszącym od 4,3 do 5,7), w związku z czym w najbliższych cyklach produkcyjnych nie ma potrzeby przeprowadzania zabiegu regulacji odczynu. Jedynie w Nadl. Hajnówka należy obniżyć pH.
4. Zastosowanie nawozów zielonych zwiększyło zawartość w glebie azotu (N ogólny) i węgla (C ogólny) oraz fosforu (P_2O_5), wapnia (Ca) i potasu (K).

ROZDZIAŁ 4. IDENTYFIKACJA ORAZ OCENA SZKÓD POWODOWANYCH PRZEZ WYBRANE PATOGENY

4.1. Opracowanie starterów do reakcji PCR i molekularna analiza gleby pod kątem występowania najważniejszych rodzajów patogenów glebowych

Tradycyjnie techniki wykrywania i identyfikacji wykorzystywane w diagnostyce chorób takie jak wychwytywanie gatunków *Phytophthora* za pomocą np. pułapek z liści różanecznika lub bezpośrednia izolacja patogenów na podłoża hodowlane, są bardzo czasochłonne i nieefektywne. Zastosowanie technik opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy tzw. PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) pozwala na osiągnięcie lepszej wydajności w identyfikacji patogenów oraz stanowi uzupełnienie analiz morfologicznych. Techniki molekularne wykorzystujące reakcję PCR, lecz oparte na rozdziale elektroforetycznym powstałych produktów amplifikacji DNA, takie jak SSCP (Kong i in. 2004) lub RFLP (Martin i Tooley 2004) są stosowane do identyfikacji gatunków *Phytophthora*. Ich niedogodnością jest przede wszystkim niska wydajność w przypadku testowania wielu prób jednocześnie. Techniki PCR wykorzystujące odczyt wyniku w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR) charakteryzują się wyższą specyficznością i czułością, ale przede wszystkim zajmują mniej czasu niż techniki oparte na elektroforezie. Podstawą metod real-time PCR jest odczyt fluorescencji barwnika, najczęściej SYBR Green, przyłączającego się w trakcie reakcji do dwuniciowej struktury DNA. Inne barwniki, oznaczane skrótowo HEX, JOE, TET czy 6FAM, wbudowane są do sond molekularnych i wykazują fluorescencję w momencie przyłączania się tychże sond do fragmentów DNA. Dodatkową zaletą technik PCR w czasie rzeczywistym jest możliwość całkowitej automatyzacji reakcji oraz mniejsza podatność na zanieczyszczenie dzięki prowadzeniu reakcji w jednej probówce. Dzięki swoim zaletom techniki real-time PCR wykorzystywane są do jakościowej i ilościowej detekcji patogenów roślin, w tym z rodzaju *Phytophthora*. Dotychczas opracowano wiele reakcji specyficznie rozpoznających wybrane gatunki *Phytophthora*: *P. citricola* (Boehm i in. 1999; Schena i in. 2006); *P. citrophthora* (Ippolito i in. 2004; Schena i in. 2004); *P. ramorum* i *P. pseudosyringae* (Tooley i in. 2006; Schena i in. 2006) *P. citricola* i *P. quercina* (Schena i in. 2006), jednakże nie istniały jeszcze opracowania dla gatunków *P. alni*, *P. cactorum* i *P. plurivora*.

W celu identyfikacji podstawowych patogenicznych gatunków drobnych korzeni występujących w szkółkach leśnych jak: *Phytophthora plurivora*, *P. cactorum*, *P. alni*,

P. lacustris, *P. hungarica*, *P. megasperma*, *P. pseudosyringae* i *P. quercina* opracowano zestawy molekularnych markerów za pomocą techniki łańcuchowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR).

Metodyka

Cząsteczki genomowego DNA zostały wydzielone z czystych kultur gatunków *Phytophthora* (wyizolowanych ze szkółek), za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji DNA: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, CA, USA). Genowe DNA z próbek gleby o masie 0,5 g każda, zostało wydzielone za pomocą zestawu do izolacji DNA PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio, CA, USA). Dla każdego gatunku, określono stężenie wydzielonego DNA, które np. dla *P. alni* wynosiło 10,4 µg/ml, dla *P. cactorum* 7,8 µg/ml, a dla *P. plurivora* 9,3 µg/ml. Stężenie DNA wydzielonego z próbek gleby było niższe niż w przypadku DNA z czystych kultur *Phytophthora*. Wydzielone DNA przechowywano do czasu analiz w temperaturze -20°C.

Odpowiednie sekwencje wzorcowe analizowanych gatunków *Phytophthora* pobrano z bazy danych NCBI oraz CBS (Tab. 19). Proces projektowania starterów i sond przeprowadzono w programie ALLELE ID7 (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA). Startery i sondy specyficzne dla wybranych gatunków *Phytophthora* zaprojektowano do fragmentu DNA kodującego małą podjednostkę rybosomową. Fragment ten zawiera sekwencje kodujące 18S, 5,8S i 28S rRNA rozdzielone sekwencjami niekodującymi tzw. ITS (ang. *Internal Transcribed Spacer*). Startery i sondy dla najczęściej spotykanych w szkółkach patogenów *P. plurivora*, *P. cactorum* i *P. alni* zostały zaprojektowane na podstawie sekwencji regionu ITS1, natomiast startery i sondy dla nowo stwierdzonych w Polsce gatunków *P. lacustris*, *P. hungarica*, *P. megasperma* oraz *P. quercina* i *P. pseudosyringae* zaprojektowano na podstawie sekwencji regionu ITS2 (Tab. 20). Sondy wyznakowano na 5' końcu specyficznymi barwnikami fluorescencyjnymi: JOE (6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein), TET (5-tetrachlorofluorescein), HEX (5-hexachlorofluorescein), FAM (6-carboxy-fluorescein) oraz wygaszaczem fluorescencji BHQ1 na końcu 3' (Sigma-Aldrich, Niemcy).

Profil termiczny reakcji PCR zaprojektowano następująco: denaturacja wstępna 94°C przez 3 min, 40 cykli (denaturacja 94°C przez 30 sek; przyłączanie starterów i sond 55°C przez 30 sek, synteza 72°C, 30 sek.). Detekcja fluorescencji miała miejsce podczas przyłączania sond: sondy do *P. alni*, *P. quercina* i *P. pseudosyringae* znakowane HEX –

kanal żółty, sonda do *P. cactorum* znakowana TET – kanał żółty, sonda do *P. plurivora* znakowana 6-FAM – kanał zielony, sondy do *P. lacustris*, *P. hungarica*, *P. megasperma* znakowane JOE – kanał żółty. Skład mieszaniny reakcyjnej, umożliwiającej detekcję patogenów w próbach: 10 µl mieszaniny LuminoCt, 2 µl mieszaniny starterów (każdy 10 mM), 2 µl sondy (*P. alni*, *P. quercina* i *P. pseudosyringae* – 5 mM; *P. cactorum* – 10 mM; *P. plurivora*, *P. lacustris*, *P. hungarica*, *P. megasperma* – 1 mM), 2 µl DNA matrycy (w przybliżeniu 20 ng). Amplifikację real-time PCR wykonano w termocyklerze RotorGene 6000 (Qiagen, Niemcy).

Dla procesu standaryzacji reakcji real-time PCR, produkty reakcji PCR zostały wytrącone etanolem w obecności 0.3 M octanu sodu i rozpuszczone w 100 µl wody. Stężenie produktów zostało oszacowane za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-1000, a ilość kopii w 1 mg produktu została obliczona według standardowego algorytmu.

Tabela 19. Wzorcowe izolaty i sekwencje gatunków *Phytophthora*

Wzorcowe gatunki <i>Phytophthora</i>	Numer GenBank/Q-bank	Produkt PCR (nt)
<i>Phytophthora alni</i>	JF300250	109
<i>Phytophthora cactorum</i>	JF300214	71
<i>Phytophthora plurivora</i>	HQ643312	125
<i>Phytophthora lacustris</i>	JX271790	123
<i>Phytophthora megasperma</i>	JX274423	123
<i>Phytophthora hungarica</i>	JX274428	124
<i>Phytophthora quercina</i>	CBS 689.79	112
<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	JN542830	105

Wyniki

Udowodniono *in silico* specyficzność każdej z testowanych sond i starterów, porównując ich sekwencje do sekwencji *Phytophthora* zdeponowanych w bazie GenBank. Pomędzy najbardziej spokrewnionymi gatunkami istniały minimum 2 nukleotydy różnicy w sekwencji starterów oraz sond. Podczas testów laboratoryjnych z użyciem DNA pochodzącym ze wzorcowych izolatów *Phytophthora* zaobserwowano, że sondy i startery charakterystyczne dla *P. lacustris*, *P. megasperma* i *P. hungarica* reagują krzyżowo. Niska specyficzność tych sond jest wynikiem bardzo wysokiego (ponad 97%) pokrewieństwa pomiędzy tymi gatunkami *Phytophthora*. Pozostałe sondy i startery wykazały się pełną

specyficznością w rozpoznawaniu DNA odpowiadających im gatunków *Phytophthora* (Ryc. 76). Nie zaobserwowano żadnych niespecyficznych reakcji w próbach „ślepych”, zawierających wodę zamiast DNA. Wyznaczone na podstawie DNA wzorcowego krzywe standardowe, służące wyznaczaniu ilości materiału genetycznego patogenów w próbkach środowiskowych, charakteryzowały się wysokim współczynnikiem dopasowania R^2 wynoszącym od 0,994 (*P. alni*) do 0,998 (*P. plurivora*) (Ryc. 77). Wydajność reakcji amplifikacji wahała się w granicach od 93,7% (*P. cactorum*) do 103,2% (*P. quercina*).

Tabela 20. Startery i sondy zaprojektowane do wybranych gatunków *Phytophthora*

Gatunek	Starter 5'	Starter 3'	Sonda
<i>P. alni</i>	ctgtcgatgtcaaagttg	atgggttttaaagataaggg	acccaaacgctcgccatgata
<i>P. cactorum</i>	acgtgaaccggttcaaac	cagccgccaacaataaag	cagccgccaccagacaagac
<i>P. plurivora</i>	ccgtatcaacccttttag	gcagtataatcagtattgtaga	cccagaccgaagtccaaacat
<i>P. lacustris</i>	tggaggagtgttcgattc	gggtcaaaagccaagcac	caccagttcataccgctgca
<i>P. megasperma</i>	tggaggagtgttcgattc	gggtcaaaagccaagcac	tcaccagttcataccgcatg
<i>P. hungarica</i>	tggaggagtgttcgattc	gggtcaaaagccaagcac	cgtaccgccaatgacaggaa
<i>P. quercina</i>	cttggttttcttcttcc	gggtttgtctgctgtgc	cgtggcgttgctaattgtgg
<i>P. pseudosyringae</i>	tggaggagtgttcgattc	cacacatagctacggttc	atcacgccacagcaagaagaa

Poniżej, przedstawiono miejsca przyłączania się starterów oraz sond do łańcuchów DNA poszczególnych patogenów. Czcionką pogrubioną zaznaczono kodujące fragmenty DNA (kolejno geny 18S rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA).

Phytophthora alni:

CATTACCACACCTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCACTTAGTTGGGGGCCTGTCCTGGC
GGCTGG**CTGT**CGATGTCAAAGTTGACGGCTGCTGCTGTGTGTCGGGCC**TATCAT**GGCGAGCGTTTGG
GTCCCTCTCGGGGGAAGTCTCTGCTTTTAAGTAGATAG**CAACTTT**CAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACAT
CGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTT
GAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTG
GCTCTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGACGCCAGACGTGAGGTGTCTTGCGGGAGGTCTTTCG
GGCTGCCTGCGAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGTT
GGTTGTGGAGGCTGCCTGTGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAGGAGT
GTTTCGATTGCGGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCGCTTATTGGACGTTCTTCTGCTGTGGCG
GTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCGAGGCTTGGCCTTTGAACCGGCGGTGTTGGTCGCGAAGTAG
GGTGGCGGCTTCGGCTGTGCGAGGGGTGATCCATTTGGGAACCTGTGTCTCTGCGGCGCGCTTCGGTG
TGCTGCGGGTGG**CATCTCAA**

Phytophthora cactorum:

CATTACCACACCTAAAAACTTTCC**ACGTGA**ACCGTTTCAAACCAAATAGTTGGGG**GTCTT**GTCTGGTG
GCGGCTGCTGA**CTTTATT**GTGTGGCGGCTGCTGCTGGACGAGCCCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTC

GGCCTGAGCTAGTAGCTTTTCTTTTAAACCCATTCCTTAATACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTC
 CTTGCTTTTAACTAGATAG**CAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTG**
CGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCAC
TTCCGGGTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACTTGGCTTTCTTCCTTCCG
 TGTAGTCGGTGGAGGAGATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGGTTTTCGGACCGACTGCGAGTCC
 TTTTAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGGCGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCT
 ATTGTAGCAAGTTGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAGAGTGTTTCGATTCGCGGTATG
 GTTGGCTTCGGCTGAACAATGCGCTTATTGGATGTTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGACCGGTGAACC
 ATAGCTCAGTGGCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCTG
 AGGGTCGATCCATTTGGGAAATGTGTGTGTACTTCGGTATG**CATCTCAA**

Phytophthora plurivora:

CATTACCACACCTAAAAAACTTTTCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGTCTTG
 CTTTTTTTGGCAGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTTG
 TTTTAAACCCAT**TCTACAATACTGATTATACTGC**GGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAG
 ATAG**CAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCG**
ATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTC
CGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAACTTGGCTTTCTTCCTT
 CCGTGTAGTCGGTGGAGGATGTGCCAGACGTGAAGTGTCTTGCGGGTGTCTTCGGGTCTGTC
 TGCGAGTCCTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGGTGTGCTG
 GTTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGGA
 GGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCC
 TGCTGTGGCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTTTTGAATCGGCTTT
 GCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACTTTGTG
 TGCACCTCGGTGCG**CATCTCAA**

Phytophthora megasperma:

CATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCTTAAATTTGGGGGCTTG
 CTCGGCGGCGTGCGTGCTGGCCTGTAATGGGTGCGCGTGCTGCTGCTGGGCGGGCTCTATCA
 TGGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGCTCGAGCTAGTAGCTATCAATTTTAAACCCCTTCTTAAAT
 ACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAG**CAACTTTCAGCAGTGG**
ATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAG
GATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCGGGGTTAGTCCTGGGAGTAT
GCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAACTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAT
 ATGCCAGACGTGAAGTGTCTTGCTAGCGGTCTTTCGAGTCTGCCGGTGAGTCCTTTTAAATG
 TACTGAACTGTACTCTCTCTTTGCGCGAAAAGCGTGGCGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCCG
 TGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTGTAGCTGTGGCGTT**TGGAGGAGTGTTTCGATT**CGCGTA
 TGGTTGGCTTCGGCTGAACAATCTGCTTATTGGGTGCTTTTCCTGT**CATGGCGGTATGAACT**
GGTGAACCGTAGCTGTGTG**GTGCTTGGCTTTTGAACC**GGCTTTGCTTTGCGAAGTAGTGTGG
 CGGCTTCGGCTGTCGAGGGGTCGATCCATTTTGGGAACTTTGTGTGTGCGGCTTCGTGCTG
 CGCG**CATCTCAA**

Phytophthora hungarica:

CATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCTTAAATTTGGGGGCTTT
 CTCGGCGGCGTGCGTGCTGGCCTGTAATGGGTGCGCGTGCTGCTGCTGGGCGGGCTCTATCA
 TGGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGCTCGAGCTAGTAGCTATCAATTTTAAACCCCTTCTTAAAT
 ACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAG**CAACTTTCAGCAGTGG**
ATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAG
GATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCGGGGTTAGTCCTGGGAGTAT
GCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAACTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAT
 ATGCCAGACGTGAAGTGTCTTGCTGGCGGTCTTTCGAGTCTGCCGGTGAGTCCTTTGAAATG

TACTGAACTGTACTCTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGCGGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCCG
TGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTGTAGCTGTGGCGTTTAA**TGGAGGAGTGTTCGATTG**GCG
GTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATCTGCTTATTGGGTGCTT**TTCCTGTCAATTGGCGGTACG**
AACTGGTGAACCGTAGCTGTGTG**GTGCTTGGCTTTTGAACC**GGCTTTGCTGTTTGCGAAGTA
GAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGGTCGATCCATTTTGGGAACTTTGTGTGTGCGGCTTC
GTGCTGCGCG**CATCTCAA**

Phytophthora lacustris:

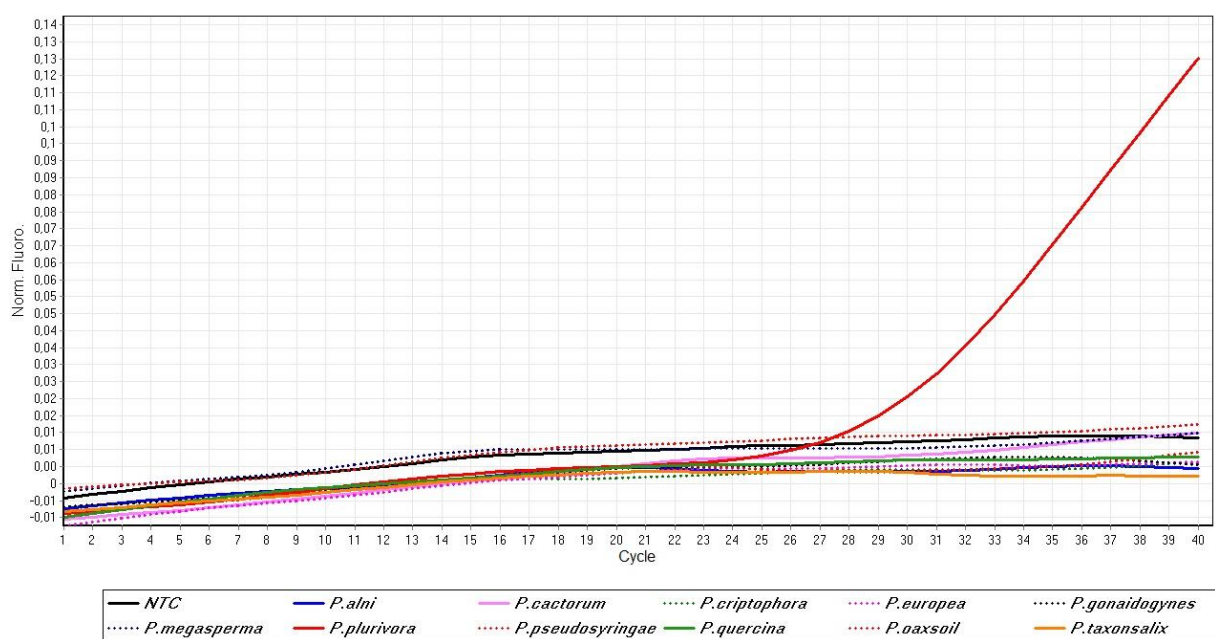
CATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCTATAATTCGGGGGCTTG
CTCGGCGGCGTGCCTGCTGGCCTGTAATGGGTGCGCGTGCTGCTGCTGGGCGGGCTCTATCA
TGGGCGAGCGCTTGGGCTTCGGCTCGAGCTAGTAGCTTTTTCTTTTAAACCCATTCTTTAAA
TACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAG**CAACTTTTCAGCAGTG**
GATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCA
GGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTA
TGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAACCTTGGTTTTCTTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGA
TATGCCAGACGTGAAGTGTCTTGCTGGCGGTCTTTTCGAGTCTGCCGGTGAGTCCTTTGAAAT
GTACTGAACTGTACTCTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGCGGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCC
GTGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTCGTTAGCTGTGGCGTTTAA**TGGAGGAGTGTTCGATTG**GC
GGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATCTGCTTATTGGGTGCTTTTCTGCT**TGCAGCGGTATG**
AACTGGTGAACCGTAGCTGTGTG**GTGCTTGGCTTTTGAACC**GGCTTTGCTTTGCGAAGTAGA
GTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGGTCGATCCATTTTGGGAACTTTGTGTGTGCGGCTTCGT
GCTGCGCG**CATCTCAA**

Phytophthora quercina:

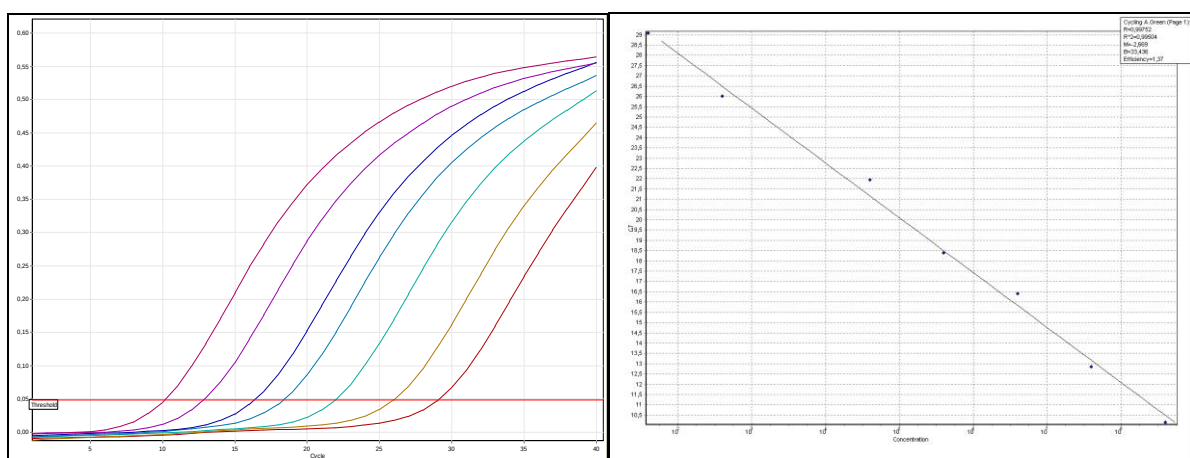
CATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCAAATATTTTGGGGGTCTTGTCTGG
CGTATGGCTGCTGCTGTAAAAGGCGGCGGCTGTTGCTGGGTGAGCCCTATCATGGCGAACGTTTGGGC
TTCGGTCTGAACAAGTAGCTCTTTTTTAAACCATTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGT
CTCTGCTTTTAACTAGATAG**CAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCT**
GCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCA
CTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA**CTTGGCTTTCTTCCTTCC**
GTGTAGTCGGTGGAGGAGACGCCAGACGTGAAGTGTCTTGCGACTGGTTTTTCGGACCGGATGTGAGTC
CTTTGAAATGTACTTTACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAG**CGTGGCGTTGCTAATTGTGG**AGGCTGC
CAGTGTGGCCAGTCGGCGACC**GGTTTTGTCTGCTGTAGC**GTTTAATGGAGGAGTGTGTGATTGCGGGT
ATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCGCTTATTGGACGTTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGA
ACCGTAGCTGTGCATGGCTTGGCCTTTGAATTGGCTTTTGTGCTGTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGG
CTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAAATTTGTGTTGGTAGCTTCGGTTGCTGG**CATCTCAA**

Phytophthora pseudosyringae:

CATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACGTATCGAACAACCTAGTTGGGGGTCTTGT
TTGGCGTGCGGCTGCTTCGGTAGCTGCTGCTAGGCGAGCCCTATCACGGCGAGCGTTTGGAC
TTCGGTCTGAGCTAGTAGCTATTTTTTAAACCCATTTTTTAACTGATTATACTGTGGGGA
CGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAG**CAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATC**
GATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAA
ATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGT
CATCAAACCTTGGCTTTCTTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAGACGCCAGACGTGAAGTGTC
TTGCGGCGAATTTTCAATTTGCTGTGAGTCCTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTT
GCTCGAAAAGCGTGCGGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCCGCTGGCCTGTGCGCGACCGGTT
TGTCTGCTGTGGCGTTAA**TGGAGGAGTGTTCGATTG**GCGGTATGGTTAGCTTCGGCTGAACA
AGCGCTTATTGGATG**TTCTTCTGCTGTGGCGTGAT**GGACTGGT**GAACCGTAGCTATGTGTG**
GCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGT
CGATCCATTTGGGAAATTTGTGTGTATGACTTCGGTTGTATG**CATCTCAA**



Ryc. 76. Identyfikacja DNA *P. plurivora* za pomocą specyficznego zestawu sond i starterów



Ryc. 77. Krzywe amplifikacji wzorców dla *P. plurivora* oraz krzywa standardowa ($R^2=0.998$)

Analiza obecności patogenów z rodzaju *Phytophthora* w próbach gleby pobranych spod zamierających sadzonek (szkółka leśna Kiejsze, Nadl. Koło) i dębów (Nadl. Karczma Borowa, Krotoszyn i Piaski) za pomocą specyficznych sond i starterów w reakcji real-time PCR wykazała obecność przede wszystkim *P. plurivora* oraz *P. cactorum*. Na 87 analizowanych próbek gleby jedynie 5 było wolnych od patogenów z rodzaju *Phytophthora*. W 33 (38%) zidentyfikowano obecność DNA *P. cactorum*, natomiast w 81 (93%)

zidentyfikowano obecność DNA *P. plurivora*. Aż w 31 próbkach gleby stwierdzono obecność DNA tych dwóch patogenów korzeni drobnych jednocześnie.

Dyskusja

Projektowanie sond stwarza nowe możliwości wykrywania patogenów w próbkach środowiskowych. Dzięki nim możliwe jest selektywne wykrywanie obcych, inwazyjnych organizmów, do których niewątpliwie należą patogeny z rodzaju *Phytophthora*. Zaletą sond jest możliwość wyboru kilku/kilkunastu gatunków najbardziej uciążliwych w szkółkach leśnych i uruchomienia szerokiego programu ich wykrywania w próbkach gleby lub wody, podobnie jak to robi SANEPID. Monitorowanie poszczególnych kwater w szkółkach umożliwi podejmowanie skutecznych działań prewencyjnych (unikania infekcji siewek). Połączenie wiedzy, gdzie występuje dany patogen z listą potencjalnych roślin żywicieli pozwala na zmianę uprawianych gatunków (płodozmian) pod kątem ich odporności na infekcje.

Dodatkowo, monitoring szkółek może skutkować wydawaniem odpowiednich paszportów zaświadczających, że materiał rozmnożeniowy jest wolny od szkodliwych organizmów. Jest to zgodne z Dyrektywą Unii Europejskiej, potrzeba tylko stworzyć listę organizmów, które uważane są w Polsce za szkodliwe. Weryfikacja zdrowotności sadzonek wysadzanych na uprawy leśne ma zasadnicze znaczenie dla trwałości i różnorodności biologicznej przyszłych lasów. Rocznie w Polsce produkuje się ponad 500 000 sadzonek (z których duży odsetek może być chory) i które wysadzone do lasu przeniosą ze sobą patogeny. O ile w szkółkach jesteśmy w stanie przeciwdziałać (nawet zupełnie wyeliminować patogeny), o tyle w lesie rozwój chorób zależy wyłącznie od siły natury. W szkółkach stosowanie odpowiedniego reżimu wodnego, nawozów i pestycydów często maskuje chorobę, która ujawnia się dopiero po wysadzeniu w niekontrolowane warunki (np. na terenach okresowo zalewanych wodą).

Wnioski

1. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zaprojektowane gatunkowo-specyficzne startery i sondy dla ośmiu gatunków *Phytophthora* (*P. alni*, *P. cactorum*, *P. plurivora*, *P. lacustris*, *P. hungarica*, *P. megasperma*, *P. quercina*, *P. pseudosyringae*) są przydatne do identyfikacji ww. gatunków obecnych w ryzosferze roślin hodowanych w szkółkach leśnych.

2. Opracowana metodyka umożliwiła precyzyjną identyfikację patogenów z rodzaju *Phytophthora* przez laboratoria IBL.

4.2. Ocena występowania patogenów z rodzaju *Phytophthora* i *Pythium* w szkółkach leśnych - analizy laboratoryjne

Metodyka

Materiał roślinny pobierany ze szkółek leśnych analizowany był pod kątem obecności patogenów z grupy lęgniowców (*Phytophthora*, *Pythium*). Przeglądano pędy, szyje korzeniowe i drobne korzenie w celu stwierdzenia objawów chorobowych. Do testów wykorzystywano kawałki łyka i drewna ok. (1-2 cm), które po rozdrobnieniu umieszczano w buforze i poddawano maceracji. Zebrany przesącz komórkowy poddawano testom na obecność patogenów z rodzaju *Phytophthora* i *Pythium* za pomocą testów ELISA (Neogen Ltd.) (Tab. 22). Badaniom poddano także glebę pobraną ze strefy ryzosferowej sadzonek.

W badaniach prowadzono obserwacje nad morfologią i fizjologią uzyskanych izolatów *Phytophthora* (m.in. *P. plurivora*, *P. quercina*, *P. cactorum*, *P. pseudosyringae*, *P. cambivora*, *P. megasperma*, *P. hungarica*, *P. europea* i inne).

Temperatury kardynalne - wykonano pasaż izolatów *Phytophthora* z wyjściowych szalek Petriego na szalki z agarem marchwiowym (100 ml soku marchwiowego, 2g CaCO₃, 16g agaru, 900 ml wody destylowanej). Hodowle inkubowano przez 3-5 dni w temperaturze 20 °C. Z uzyskanych kultur wycinano fragmenty o wymiarach 0,5 x 0,5 cm i umieszczano centralnie na szalkach z agarem marchwiowym. Szalki inkubowano przez 24 godziny w 20 °C w celu zainicjowania wzrostu *Phytophthora*. Następnie przenoszono je do inkubatorów o temperaturze 10, 15, 20, 25, 30, 32, 35 °C. Dla każdego izolatu (w każdym wariancie temperatury) wykonano trzy powtórzenia (Hall, 1993). Wykonywano pomiary przyrostu dobowego grzybni wzdłuż wykonanych na szalkach linii, przecinających się pod kątem prostym. Wyniki zebrano w tabelach (Tab. 24). Pomiary prowadzono przez 5 kolejnych dni, lub do zaobserwowania braku wzrostu grzybni, lub do zajęcia całej powierzchni podłoża. Wyliczono średni dobowy przyrost grzybni, określono temperatury maksymalne i optymalne dla wzrostu grzybni izolatów *Phytophthora*.

Stymulacja produkcji sporangiów - szalki inkubowano w 20°C przez 3 do 5 dni. Z uzyskanych hodowli pobierano fragmenty 1,5x 1,5 cm, umieszczano w szalkach Petriego

(śr. 9cm) i zalewano niesterylnym wyciągiem glebowym. Obserwacje wykonywano po 24 – 36 godzinach (Jung i Burges, 2009). Mierzono 25 losowo wybranych sporangiów. Wykonano zdjęcia w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 400x (Zeiss, AXioskop2). W przypadku braku sporangiów w próbce doświadczenie powtarzano, wykorzystując hodowle uzyskane na podłożach: agar słodowy i agar ziemniaczany. Zamiennie do wyciągu glebowego stosowano wyjałowioną wodę ze stawu.

Obserwacje lęgni i plemni - z uzyskanych hodowli w 14 – 21 dniu pobierano fragmenty o wymiarach 1,5 x 1,5 cm. Analizowano 25 losowo wybranych lęgów. Wykonano zdjęcia w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 400x (Zeiss, AXioskop2). W przypadku braku żądanych struktur w próbce doświadczenie powtarzano, wykorzystując hodowle uzyskane na podłożach: agar słodowy i agar ziemniaczany.

Wyniki

Wykonane testy serologiczne z symptomatycznych tkanek potwierdziły obecność patogenicznych lęgniowców w przypadku korzeni w Nadleśnictwie Augustów, Nadleśnictwie Borki i Nadleśnictwie Koło (Tab. 22).

Tabela 22. Wynik testów serologicznych ELISA w materiale ze szkółek leśnych

Nadleśnictwo	Szkółka	Gatunek	Materiał	Wynik ELISA
Augustów	Budy	Ol cz	pędy	-
			korzenie	+
			gleba	-
Borki	Zielonka	Db s	pędy	-
			korzenie	+
			gleba	-
Koło	Kiejsze	Ol cz	pędy	-
			korzenie	+
			gleba	-

(-) Wynik negatywny - brak obecności *Phytophthora/Pythium*

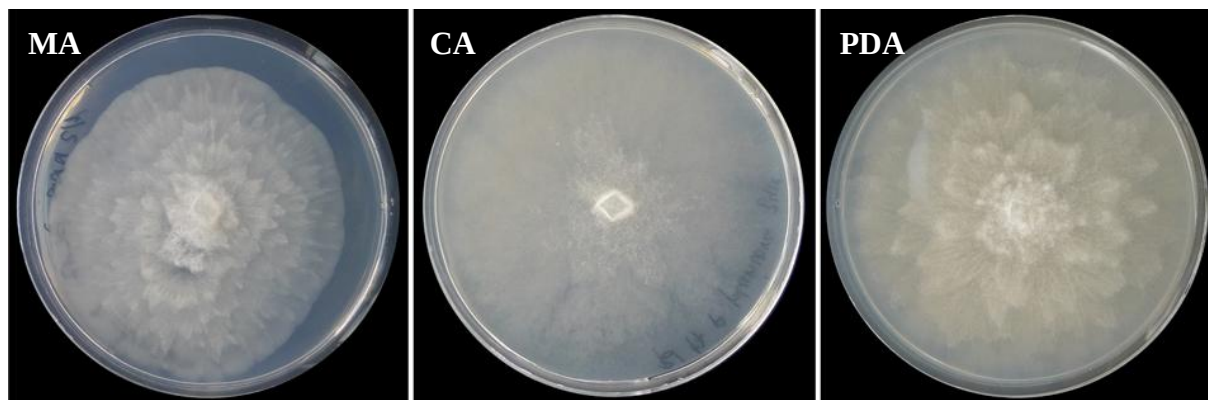
(+) Wynik pozytywny - obecność *Phytophthora/Pythium*

Zastosowanie metody pułapkowania (ang. baiting) według protokołu opisanego przez Jung (2009) pozwoliło na wyizolowanie z gleby pobranej ze szkółek patogenów z rodzaju *Phytophthora* (Tab. 23)

Tabela 23. Występowanie *Phytophthora* w glebie w szkółkach leśnych

Nadleśnictwo	Szkółka	Identyfikacja <i>Phytophthora</i>
Cewice	Okalice	<i>Phytophthora</i> sp.
Toruń	Janowo	<i>P. alni</i>
Koło	Kiejsze	<i>P. plurivora</i>
Przasnysz	Karwacz	<i>P. plurivora</i>
Nowy Targ	Beskid	<i>Phytophthora</i> sp.
Żednia	Podozierany	<i>P. alni</i>
Augustów	Budy	<i>Phytophthora</i> sp.
Chojnów	Żabieniec	<i>P. alni</i>
Borki	Zielonka	<i>P. plurivora</i>

Najczęściej występującym w szkółkach gatunkiem okazał się patogen *P. plurivora*, dlatego poniżej wybrano go jako przykład prowadzonych badań na morfologią. Wszystkie izolaty przygotowano do obserwacji morfologii na stałych pożywkach maltozowych lub warzywnych V8, tworzyły one wzór wzrostu podobny do chryzantemy (Ryc. 78).



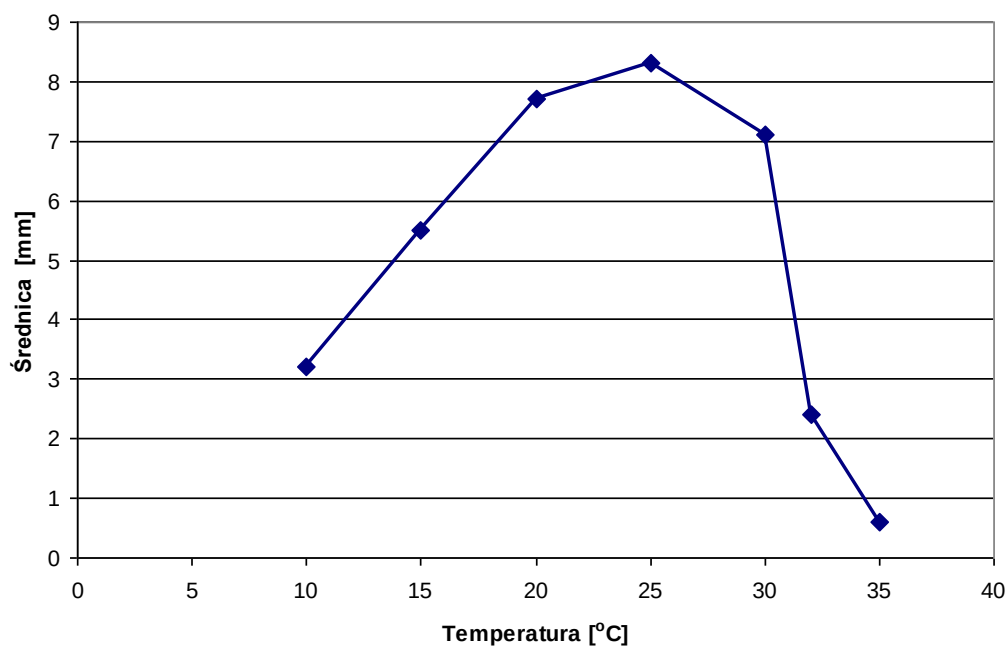
Ryc. 78. Kolonia *P. plurivora* po 7 dniach wzrostu w temp. 22°C w ciemności na pożywce maltozowej (MA), marchwiowej (CA) i ziemniaczanej (PDA).

Optymalna temperatura dla wzrostu *P. plurivora* wynosiła około 25°C, podczas gdy temperatura minimalna wynosi <10°C, a maksymalna wynosiła 35°C. Promieniowy wzrost kolonii przy temperaturze optymalnej (25°C) wyniósł średnio ponad 8 mm / dzień (Ryc. 79).

Tabela. 24. Temperatury kardynalne i optymalne dla wybranych izolatów *Phytophthora* oraz średni dobowy przyrost w optymalnych warunkach temperatury

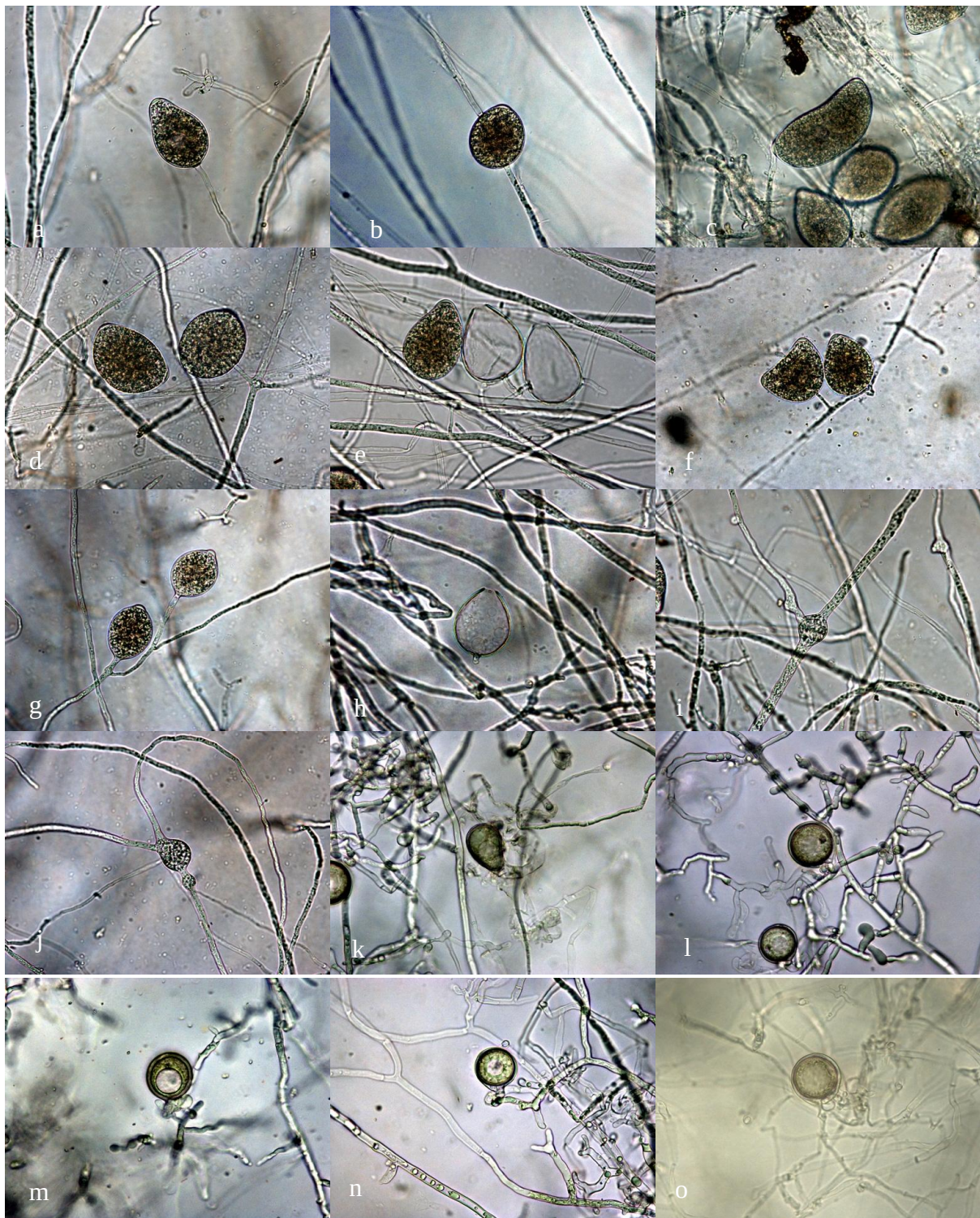
	IBL239 <i>P. alni</i>	IBL221 <i>P. cactorum</i>	IBL224 <i>P. cactorum</i>	IBL213 <i>P. plurivora</i>	IBL219 <i>P. plurivora</i>	IBL215 <i>P. pseudosyringae</i>	IBL209 <i>P. quercina</i>	IBL211 <i>P. quercina</i>	IBL207 <i>Pythium sp.</i>
Temp. optymalna [°C]	30	25	25	25	25	20	25	25	30
Temp. maksymalna [°C]	35	32	32	35	35	32	32	32	35
Temp. minimalna [°C]	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
średni wzrost [mm/dzień]	3,9	8,1	8,7	8,3	8,0	5,8	2,3	2,8	15,3
max wzrost [mm/dzień]	3,3	8,3	8,4	8,4	9,1	6,1	2,4	4,4	16,5
min wzrost [mm/dzień]	2,8	4,8	5,4	6,5	6,4	5,2	1,8	1,8	12,6

Zarodnie znajdowano głównie pojedynczo na prostych konidioforach (Ryc. 80). Zarodnie były trwałe, o dużej zmienności kształtu (owalne, elipsoidalne). Wygląd takich zmiennych zarodni *P. plurivora* opisali Jung i Burgess (2009). W ich badaniach zarodnie również wykazały dużą zmienność wielkości, i wykonane pomiary 50 losowo wybranych dojrzałych zarodni mieściły się w przedziałach 20.2-62.5 x 14.7-43.8 mikrometrów, z wartościami średnimi 48,6 x 31,4 mikrometrów. Stosunek długości do szerokości wynosił 1,5. Średnia wartość 28 pustych otworów zarodni wynosiła ok. 8,5 mikrometrów.



Ryc. 79. Wzrost promieniowy *P. plurivora* IBL213 na pożywce marchwiowo-agarowej.

Lęgnie (Oogonia) były gładkie, bezbarwne lub brązowe, przeważnie kuliste, lub bardzo rzadko o wydłużonym kształcie lub prawie kuliste (Ryc. 80), o wymiarach 20,9 - 37,3 mikrometrów, przy średniej wartości 30,2 mikrometrów. Zarodniki (oospory) mierzyły 15,3 - 35,2 mikrometrów, przy średniej średnicy 24,9 mikrometrów. Ich grubość ścian wynosiła 1.1-3.8 mikrometrów. Przyległe do nich plemniki (antheridia) były raczej nieregularnego kształtu i mierzyły 5.3-16.6 x 4.1-13.5 mikrometrów, średnio 12,4 x 7,6 mikrometrów.



Ryc. 80. Różne kształty zarodni *P. plurivora* i typowe lęgnie (oogonia) z zarodnikami oosporami i plemniami (antheridia): a i e) regularne w kształcie; b) jajowate; c i d) ampuliformiczne; f) z podwójnymi wierzchołkami; g) z simpodialnymi rozgałęzieniami; h) puste zarodnie (sporangia) z wąskim otworem wyjściowym, i) obrzęki strzępek; j) kielkujące zarodnie, z małym obrzękiem; k) wydłużone, nieregularne w kształcie lęgnie; l, m, n, o) kuliste lęgnie z przyległymi plemniami.

4.3. Testy patogeniczności izolowanych organizmów wobec podstawowych gatunków lasotwórczych drzew

W szklarni IBL założono doświadczenia wazonowe z siewkami dębu (*Quercus robur* L.) i buka (*Fagus sylvatica* L.) wyhodowanymi z nasion (wolne od patogenów). Rosły one w wysterylizowanym podłożu (ziemia ogrodnicza z dodatkiem perlitu). Inokulacji roślin dokonano doglebowo oraz poprzez nacięcia pędów i przyłożenie inokulum, które zabezpieczono wilgotną watką, folią aluminiową i parafilmem. Jako inokulum testowano czyste izolaty *P. plurivora*, *P. quercina* i *P. cactorum*. W wariancie kontrolnym wykonano tylko nacięcia i przyłożono sterylną pożywkę. W wariancie doglebowym, umieszczono pożywkę przerośniętą patogenami z rodzaju *Phytophthora* w otworach i okresowo zalewano wodą (symulacja powodzi).

Wpływ nawożenia preparatem Actifos na zdrowotność dębów szypułkowych *Quercus robur* L. zainfekowanych patogenami z rodzaju *Phytophthora*

Metodyka

Celem doświadczenia było określenie podatności sadzonek dębów oraz buków na infekcję patogenami z rodzaju *Phytophthora* oraz określenie patogeniczności badanych izolatów lęgniowców względem sadzonek drzew.

Do doświadczeń wykorzystano 1-roczone siewki dębu szypułkowego, wyhodowanego z nasion dostarczonych przez ZGiHDL IBL. Siewki rosły w doniczkach o pojemności 7 l wypełnionych mieszanką ziemi ogrodowej i wermikulitu (2:1). Wzrost roślin prowadzony był w kontrolowanych warunkach w szklarni IBL (temperatura 21°C, oświetlenie 12h fotoperiod) oraz stężeniach CO₂: normalnym - 400 ppm i dwukrotnie podwyższonym - 800 ppm. Siewki dębu zostały sztucznie zainfekowane patogenem *Phytophthora quercina* (izolaty IBL209 i IBL211) według metodyki Jung'a (2009; Jung i in. 1996, 2000) (Ryc. 81).

W doświadczeniu przyjęto następujące warianty:

1. kontrola bez zabiegów;
2. infekcja sadzonek patogenem *Phytophthora quercina*;
3. dolistne nawożenie sadzonek preparatem Actifos (0,6%)
4. infekcja sadzonek patogenem *P. quercina* + nawożenie preparatem Actifos (0,6%)

Nawożenie preparatem Actifos wykonano dwukrotnie: dwa dni przed (zapobiegawczo) sztuczną inokulacją *P. quercina* oraz dwa tygodnie po infekcji (lecznico).



Ryc. 81. Stymulacja tworzenia się zoosporangiów z zoosporami w glebie poprzez sztuczne podtapianie roślin przez okres 72 godzin

Po czterech miesiącach od infekcji, sadzonki (15 sztuk) wyjęto z doniczek i poddano je pomiarom parametrów biometrycznych (długość części nadziemnej i podziemnej sadzonek). Dodatkowo system korzeniowy poddano analizie na skanerze EPSON Perfection V700 Photo z oprogramowaniem WinRHIZO® biorąc pod uwagę takie parametry jak całkowita długość korzeni (TRL), powierzchnia (FRSA) i stosunek długości drobnych korzeni do długości korzeni matecznych (FRL/MRL). Analizy statystyczne wykonano za pomocą testu Kruskala-Wallisa (STATISTICA v. 10).

Wyniki

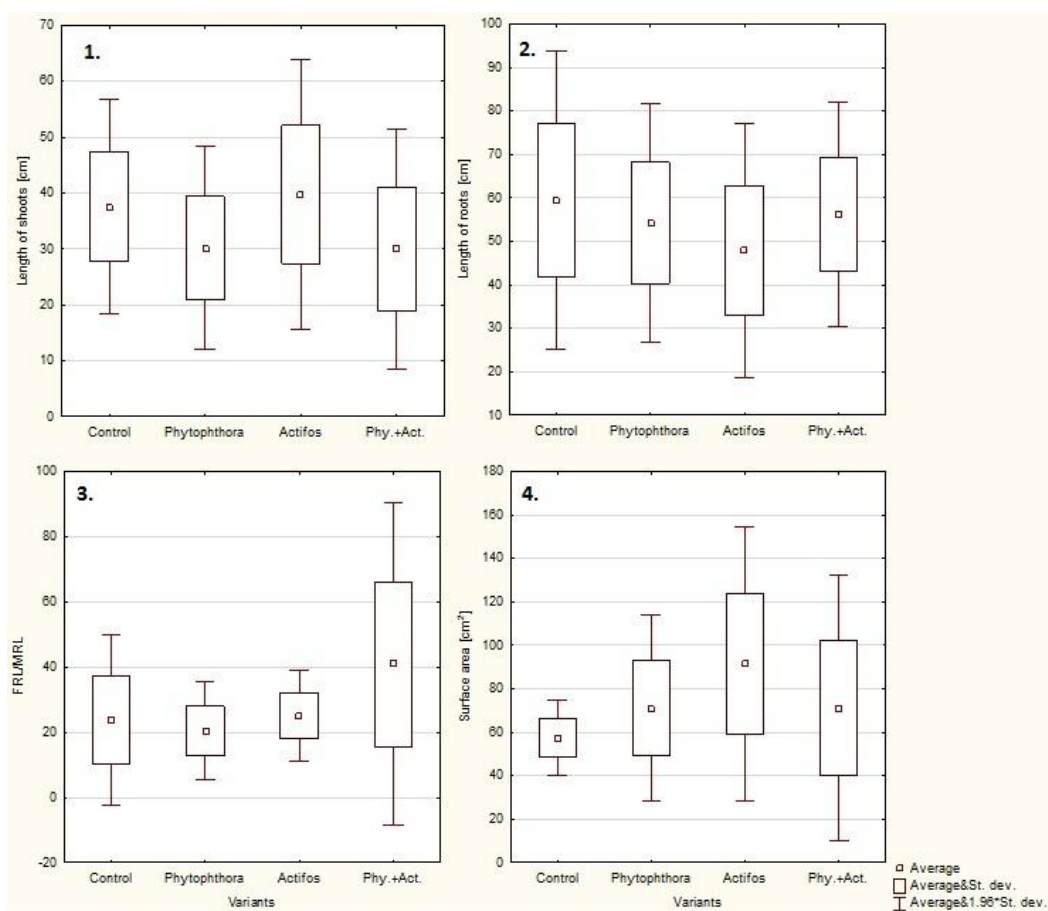
Postępując zgodnie z postulatami Kocha, po czterech miesiącach od sztucznej inokulacji z sadzonek reizolowano wprowadzony wcześniej patogen *P. quercina*.

Stężenie atmosferyczne CO₂ (400 ppm)

Analizując długość pędów sadzonek rosnących w różnych wariantach doświadczenia nie zaobserwowano wpływu infekcji na długość części nadziemnych ($p=0,2373$). Dodatek nawozu Actifos nie spowodował znaczącego przyrostu części nadziemnej u sadzonek infekowanych, jednakże działanie nawozu w przypadku sadzonek zdrowych spowodowało nieznaczny wzrost długości pędów (Ryc. 82.1). Było to prawdopodobnie spowodowane dostarczeniem dawki azotu ($N=10\%$).

Podobnie, jak w przypadku analizy długości pędów, nie zauważono statystycznie istotnych różnic w długości systemów korzeniowych u sadzonek poddanych zabiegowi ($p=0,4974$). Nie zaobserwowano też wpływu nawozu Actifos na długość systemów korzeniowych siewek zdrowych czy zainfekowanych (Ryc. 82.2).

Analizując wskaźnik drobnych korzeni (FRL/MRL), będący ilorazem długości korzeni drobnych (<2 mm) do korzeni matecznych nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic ($p=0,1454$). Jednakże, najniższe wartości wskaźnika FRL/MRL zaobserwowano w wariancie z infekcją siewek *Phytophthora*, podczas gdy największe wartości obserwowano w przypadku sadzonek zainfekowanych, lecz potraktowanych preparatem Actifos (Ryc. 82.3). Świadczy to o korzystnym, większym udziale drobnych korzeni w całkowitej masie korzeni. Powierzchnia zajmowana przez korzenie drobne nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi wariantami, $p=0,1829$ (Ryc. 82.4).

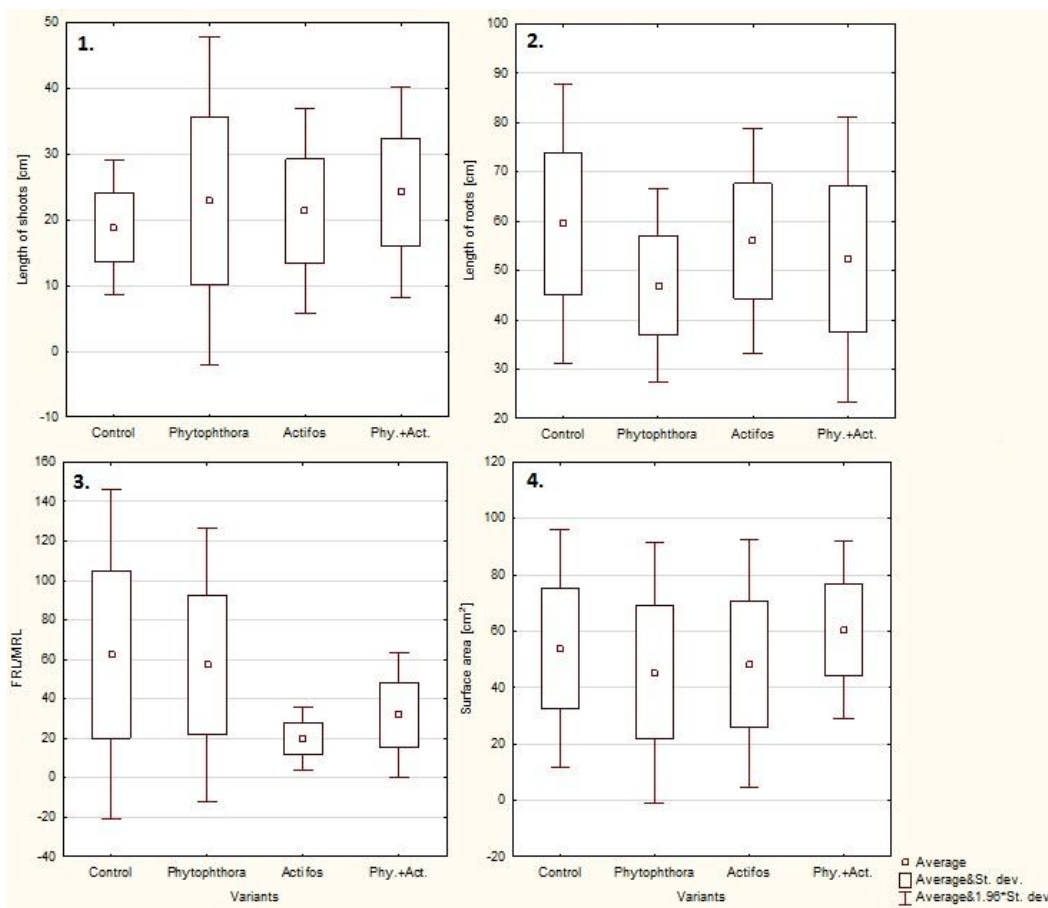


Ryc. 82. Długość pędów (1), systemów korzeniowych (2), FRL/MRL (3) i FRSA (4) u siewek dębu szypułkowego rosnących w stężeniu 400 ppm CO₂

Stężenie podwyższone CO₂ (800 ppm)

Podobnie jak w wariancie poprzednim, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w długości części nadziemnej i podziemnej siewek zainfekowanych patogenem *P. quercina* i traktowanych preparatem Actifos (Ryc. 83.1 i 83.2).

Analizując wskaźnik drobnych korzeni FRL/MRL zaobserwowano statystycznie istotne różnice pomiędzy wariantami zabiegowymi ($p=0,0277$). Znacząco więcej wartości długości drobnych korzeni posiadały siewki kontrolne oraz zainfekowane, podczas gdy w wariancie z dodatkiem preparatu Actifos stosunek długości drobnych korzeni był mniejszy od pozostałych wariantów (Ryc. 83.3). Powierzchnia zajmowana przez drobne korzenie (FRSA) nie była zależna od wariantu doświadczenia ($p=0,5819$).



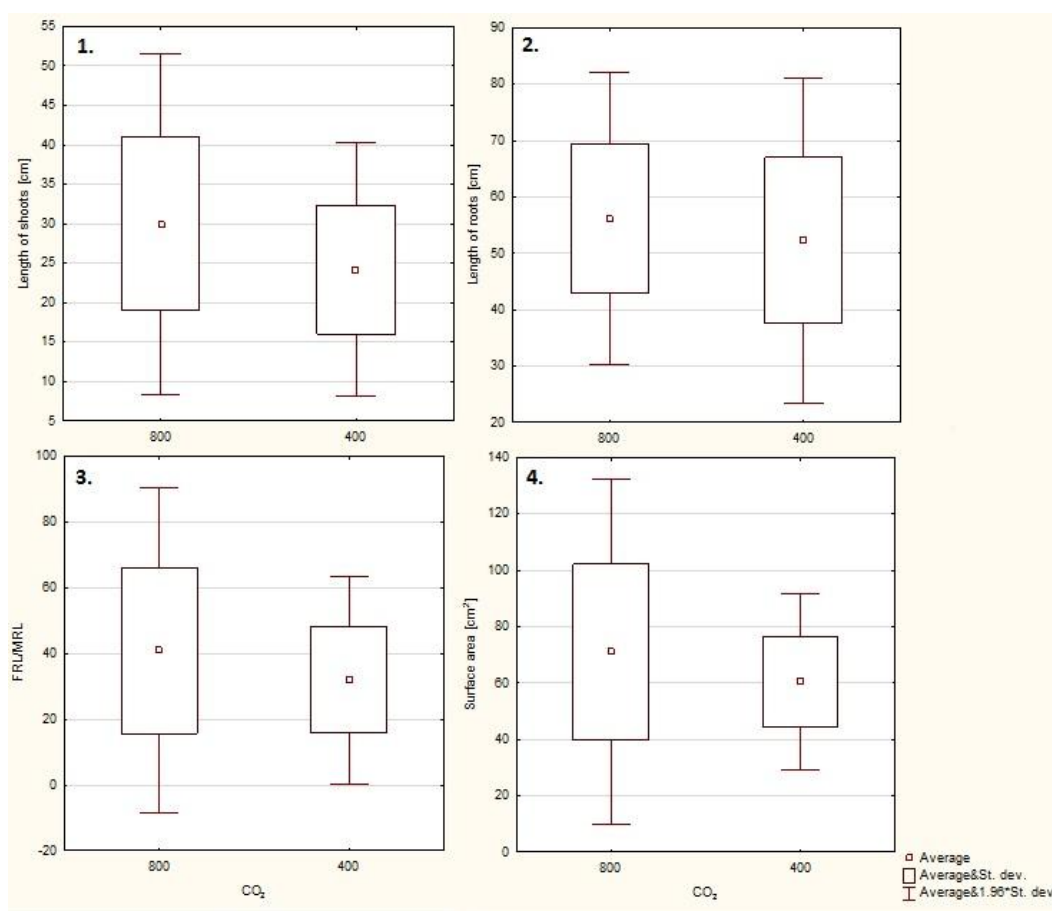
Ryc. 83. Długość pędów (1), systemów korzeniowych (2), wskaźnik FRL/MRL (3) i powierzchni drobnych korzeni FRSA (4) u siewek dębu szypułkowego rosnącego w stężeniu 800 ppm CO₂

Analizując wpływ podwyższonego stężenia CO₂ w atmosferze na parametry biometryczne siewek dębu szypułkowego zaobserwowano, iż znacząco zmniejszył się udział długości drobnych korzeni w stosunku do długości korzeni matecznych u sadzonek rosnących w podwyższonym (800 ppm) stężeniu CO₂ (p=0,0128) (Ryc. 84). Stężenie CO₂ nie miało natomiast istotnego wpływu na długości pędów (p=0,1642) oraz korzeni (p=0,2707), choć siewki rosnące w uzdatnionej w CO₂ atmosferze osiągały większe przyrosty.

Zaobserwowano, że skuteczność preparatu Actifos zmieniała się w zależności od stężenia CO₂. U sadzonek rosnących w podwyższonym stężeniu CO₂ nawożenie pozytywnie wpłynęło na przyrost pędów (p=0,0054) oraz na powierzchnię zajmowaną przez drobne korzenie (p=0,0323). Wskaźnik długości drobnych korzeni (<2mm) w stosunku do długości

korzeni matecznych był również większy u siewek poddanych nawożeniu i rosnących w podwyższonym stężeniu CO₂, choć te różnice nie były statystycznie istotne.

Nie zanotowano statystycznie istotnego wpływu nawożenia preparatem Actifos a infekcją *P. quercina* na wartości parametrów biometrycznych u sadzonek rosnących w różnych stężeniach CO₂. Zauważono jedynie nieznaczne zwiększenie wszystkich omawianych parametrów w przypadku sadzonek rosnących w podwyższonym stężeniu CO₂ (Ryc. 84).



Ryc. 84. Długość pędów (1), systemów korzeniowych (2), FRL/MRL (3) i FRSA (4) sadzonek dębu szypułkowego zainfekowanych *P. quercina* i nawożonych Actifos w zależności od stężenia CO₂

Dyskusja

Ogólnie rzecz biorąc, dęby (wariant kontrolny) rosły lepiej w podwyższonym (800 ppm) stężeniu CO₂, co zostało potwierdzone statystycznie istotnymi różnicami w długości pędów. Jednakże nie stwierdzono różnicy w rozwoju systemu korzeniowego. Wysokie stężenie CO₂ lepiej stymuluje rozwój korzeni macierzystych u dębów kontrolnych w porównaniu z sadzonkami rosnącymi w naturalnym (400 ppm) stężeniu CO₂. Dowodem na to jest znacznie wyższy wskaźnik długości korzeni drobnych do długości korzeni matecznych (FRL/MRL) w stężeniu 800 ppm CO₂. Pod względem powierzchni korzeni drobnych (FRSA) nie stwierdzono statystycznie znaczącej różnicy pomiędzy wariantem kontrolnym w różnych warunkach stężenia CO₂ (800 i 400 ppm), chociaż nieco wyższe wartości stwierdzono w przypadku wariantu z podwyższonym CO₂. Inokulacja dębów *P. quercina* nie miała znaczącego wpływu na rozwój pędów i korzeni, jednakże były one lepiej rozwinięte w atmosferze o wyższej koncentracji CO₂. Potwierdzono to w odniesieniu do średniej wartości długości korzeni i wartości wskaźnika FRL/MRL, jak również FRSA w obu wariantach CO₂. Zastosowanie preparatu Actifos miało znaczący wpływ na rozwój pędów i powierzchni drobnych korzeni (FRSA) w podwyższonym (800 ppm) stężeniu CO₂, jednakże nie odnotowano statystycznie znaczących różnic w przypadku parametrów FRL/MRL oraz długości systemu korzeniowego. Niemniej jednak, średnią wartość wskaźnika FRL/MRL była większa w przypadku większego stężenia CO₂, co świadczy o zwiększonym udziale drobnych korzeni w takich warunkach. Zastosowanie preparatu Actifos poprzez wpływ na lepszy rozwój siewek i ochronę części systemów korzeniowych maskuje objawy choroby. Nie wiadomo czy siewki o stymulowanym wzroście są zupełnie zdrowe, co utrudnia ich wzrokową selekcję w szkółkach. Istnieje ryzyko, że z pozoru zdrowe sadzonki po wysadzeniu w sprzyjające dla rozwoju patogena warunki wilgotnościowe ujawnią symptomy uszkodzenia, na skutek rozpoczętych w szkółce procesów chorobowych. To zagadnienie wymagać będzie dalszych badań. Dodatkowo, trzeba wziąć pod uwagę fakt, że patogen *P. quercina* charakteryzował się powolnym wzrostem. Wyniki te sugerują, że być może eksperyment wazonowy trwał zbyt krótko (4 miesiące), albo też użyte w doświadczeniu szczepy patogena nie były szczególnie zjadliwe w stosunku do już zdrewniałych tkanek roślinnych. Ucierpiały przede wszystkim najdrobniejsze korzonki, które po obumarciu odpadły i stanowiły podłoże na którym patogen mógł się rozwijać poza żywicielem i atakować ponownie w okresach sprzyjającej wilgotności gleby (okresach

w których zalewano rośliny). Ten fakt jest zgodny z obserwacjami Junga (1999), który zauważył, że patogen *P. quercina* atakuje i uszkadza tylko drobne korzenie natomiast nie rozwija się w tkankach szyi korzeniowych czy podstawy pędów.

Wnioski

1. Sztuczna infekcja patogenem *Phytophthora quercina* nie spowodowała śmiertelności wśród 12-miesięcznych sadzonek dębu, a jedynie zmniejszenie długości i powierzchni systemów korzeniowych (zarówno głównych jak i korzeni drobnych).

2. Po czterech miesiącach od wprowadzenia inoculum *P. quercina* do gleby, patogen nadal był z niej reizolowany. Oznacza to iż zainfekowana gleba jest źródłem choroby, a patogen może być roznoszony ze szkółek na uprawy i do drzewostanów leśnych nie tylko w chorych tkankach ale przede wszystkim wraz z bryłą korzeniową.

3. Zastosowanie preparatu Actifos polepszało parametry wzrostu siewek (powierzchnię i długość korzeni) w porównaniu z siewkami rosnącymi w zainfekowanym podłożu patogenem *Phytophthora quercina*.

4. Wysokie wartości błędu standardowego i odchylenia dla mierzonych parametrów (m. in. wysokości pędów, długości korzeni itp.) wskazują na małą przydatność tych parametrów w ocenie zdrowotności jednorocznych siewek dębu.

Patogeniczność wybranych gatunków *Phytophthora* względem siewek dębu szypułkowego *Quercus robur* L., dębu burgundzkiego *Quercus cerris* L. oraz buka zwyczajnego *Fagus sylvatica* L.

Metodyka

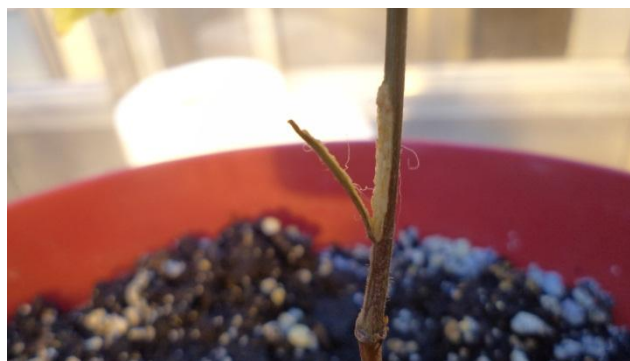
Celem doświadczenia było określenie podatności sadzonek dębów oraz buków na infekcję patogenami z rodzaju *Phytophthora* oraz określenie patogeniczności badanych izolatów lęgniowców względem sadzonek drzew.

Do doświadczeń wykorzystano 5 miesięczne siewki dębu szypułkowego oraz buka zwyczajnego, wyhodowanego z nasion dostarczonych przez ZGiHDL IBL. W testach wykorzystano także 3 miesięczne siewki dębu burgundzkiego (*Quercus cerris* L.) wyhodowanego z nasion pochodzących z Bułgarii. Rośliny rosły w osobnych doniczkach, każda o pojemności 1,8 l, wypełnionych mieszanką sterylnej ziemi ogrodowej i piasku. Wzrost roślin oraz eksperyment prowadzone były w kontrolowanych warunkach temperatury (21°C) i oświetlenia (12h fotoperiod) w szklarni IBL.

Do testów użyto następujące izolaty *Phytophthora*:

- 1) testy na sadzonkach dębów *Q. robur* i *Q. cerris*
 - a) *Phytophthora quercina* (izolat IBL211, kolekcja IBL)
 - b) *Phytophthora quercina* (izolat P 290, kolekcja American Type Culture Collection)
- 2) testy na sadzonkach buka zwyczajnego
 - a) *Phytophthora plurivora* (izolat IBL219, kolekcja IBL)
 - b) *Phytophthora cactorum* (izolat IBL221, kolekcja IBL)
 - c) *Phytophthora cactorum* (izolat P 163, kolekcja American Type Culture Collection)
- 3) testy na wszystkich gatunkach roślin (izolaty z Bułgarii)
 - a) *Phytophthora cryptogea* (izolat Belasica10/3)
 - b) *Phytophthora plurivora* (izolat Velingrad1/1)
 - c) *Phytophthora plurivora* (izolat Tulovo4/1)
 - d) *Phytophthora cambivora* (izolat Vitosha 4/1)
 - e) *Phytophthora plurivora* (izolat Tulovo7/3)
 - f) *Phytophthora rosacearum* (izolat Tulovo8/2)
 - g) *Phytophthora cryptogea* (izolat Bankya1/1)
 - h) *Phytophthora plurivora* (izolat Tran2/1)

Sadzonki zostały sztucznie zainfekowane badanymi gatunkami *Phytophthora* według metody opisanej przez Jung'a (2009). Kora pędów została nacięta i podważona sterylnym skalpelem na długości 6 mm, a następnie do tak powstałej rany przykładano fragmentu agaru (5x5 mm) przerośniętego grzybnią lęgniowców (Ryc. 85). Miejsce inokulacji owijano wilgotną sterylną watą, owijano parafilmem i zabezpieczano folią aluminiową.



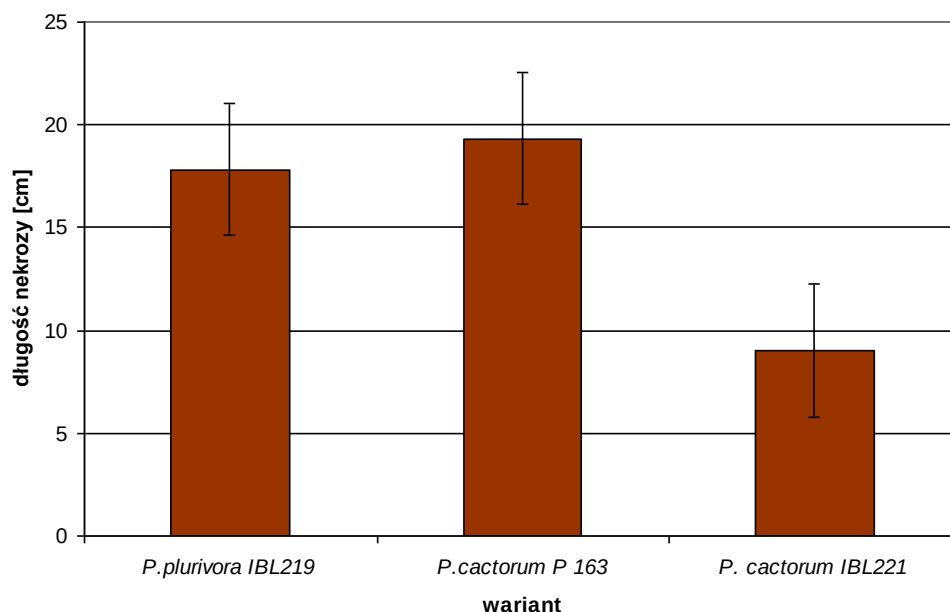
Ryc. 85. Przygotowanie sadzonki do sztucznej inokulacji patogenami *Phytophthora*

W doświadczeniu wykorzystano układ z dwoma wariantami kontrolnymi – w pierwszym sadzonki nie były uszkodzane, w drugim pędy sadzonek nacinano i przykładano fragment sterylnego agaru. Po upływie trzech tygodni oceniano zmiany w tkankach sadzonek (pomiar długości nekrozy) oraz reizolowano wprowadzone patogeny w myśl reguły Kocha (N=15).

Wyniki

W sadzonkach kontrolnych nie zaobserwowano zmian nekrotycznych tkanek oraz nastąpiło zabliznianie się ran po nacięciach.

Wybrane do testowania izolaty *P. quercina* (IBL211 i P 209) nie wykazały znacznego stopnia patogeniczności w stosunku do sadzonek dębu szypułkowego. Obserwowano jedynie nieznaczną strefę nekrozy w miejscu inokulacji, natomiast brak było strefy rozszerzania nekrozy wzdłuż pędu świadczącej o transmisji patogena. Z tkanek nie reizolowano wprowadzanych szczepów *P. quercina*. Izolaty *P. quercina* były jednak patogeniczne względem sadzonek dębu burgundzkiego, powodując powstawanie nekroz na pędach średnio na długości 28,4 cm (izolat P 290) i 3,8 cm (izolat IBL211).



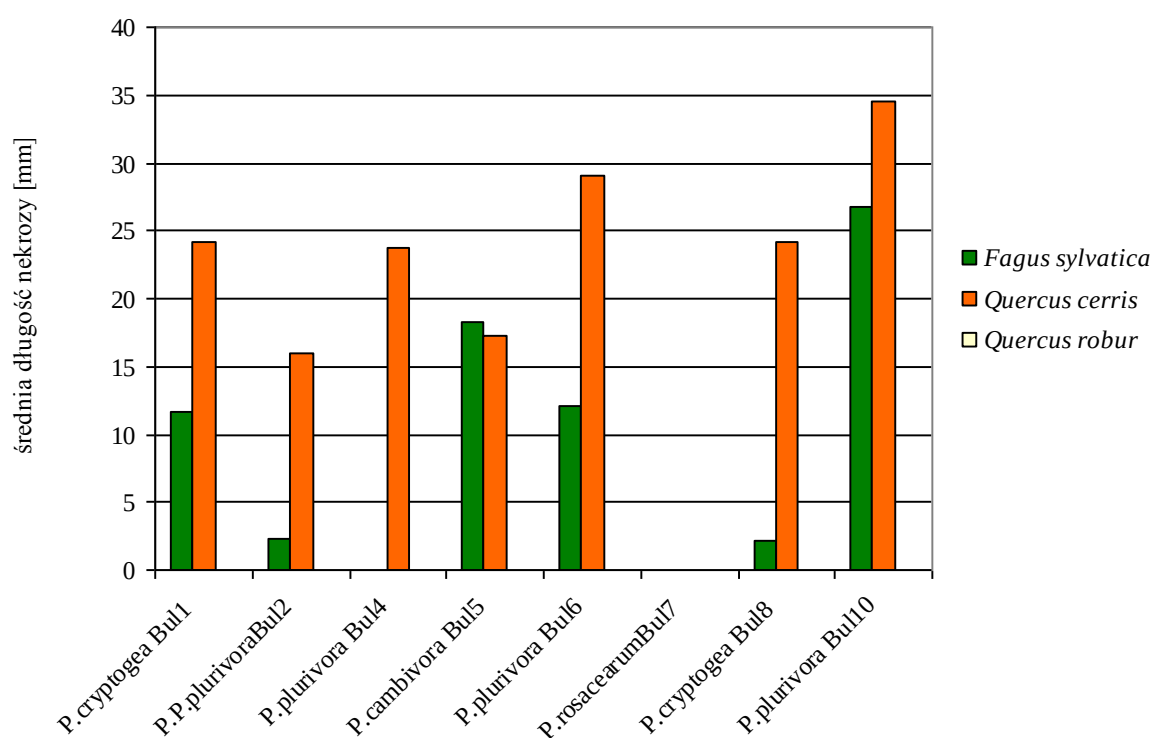
Ryc. 86. Wrażliwość sadzonek buka zwyczajnego na infekcje *Phytophthora*

W przypadku sadzonek buka, we wszystkich wariantach doświadczenia zaobserwowano przebarwienia tkanek pędu, świadczące o nekrozie wywołanej patogenami *Phytophthora*. Nekroza rozwijała się zarówno powyżej jak i poniżej miejsca zranienia. Zjadliwość patogenów *P. plurivora* IBL219 i *P. cactorum* P163 nie różniła się znacząco od siebie, natomiast izolat *P. cactorum* IBL221 wykazywał znacznie niższą patogeniczność w stosunku do sadzonek buka niż pozostałe dwa izolaty (Ryc. 86). Z tkanek przejawiających infekcję reizolowano wprowadzony patogen (Ryc. 87).



Ryc. 87. Grzybnia *P. plurivora* IBL219 wyizolowana z zainfekowanych tkanek buka

Analizując patogeniczność izolatów *Phytophthora* pochodzących z Bułgarii (Ryc.88) zaobserwowano całkowity brak symptomów chorobowych w tkankach dębu szypułkowego infekowanych patogenami pochodzącymi spoza granicy Polski. Nie mniej jednak dokonano reizolacji patogenów Bul1, Bul2, Bul4, Bul5, Bul6 i Bul8 z niesymptomatycznych tkanek, co sugeruje możliwość rozwoju choroby bez widocznych objawów ze strony rośliny. W przypadku sadzonek buka zwyczajnego 6 izolatów pochodzenia bałkańskiego spowodowało wystąpienie nekrozy. Izolaty *P. plurivora* Bul4 i *P. rosacearum* Bul7 nie wykazały żadnej patogeniczności w stosunku do sadzonek buka. Sadzonki buka burgundzkiego, pochodzące podobnie jak badane patogeny z terenu Bułgarii, okazały się bardziej wrażliwe niż sadzonki polskie. Jeden izolat, *P. rosacearum* Bul7, nie wywołał widocznych symptomów chorobowych u żadnego z trzech testowanych gatunków drzew, jednak został reizolowany z tkanek dębu burgundzkiego i buka zwyczajnego.



Ryc. 88. Patogeniczność izolatów *Phytophthora* względem siewek buka zwyczajnego oraz dębu szypułkowego i burgundzkiego

Dyskusja

Zauważalne jest, że sadzonki *Quercus robur* w bardzo zbliżony sposób reagowały na infekcję patogenami z rodzaju *Phytophthora*. Wokół miejsca wprowadzenia każdorazowo obserwowano niewielki obszar martwiczych tkanek, który przypominał reakcję nadwrażliwości. Niemniej jednak patogen zdolny był do infekowania dalej położonych tkanek, co potwierdzono przez reizolację patogenu z bezobjawowych tkanek roślinnych. W odpowiedzi na infekcję *Phytophthora* spp. u sadzonek *Fagus sylvatica* obserwowano brązowe przebarwienia łodygi, który rozprzestrzeniały się zazwyczaj w obu kierunkach od miejsca wprowadzenia. U sadzonek *Quercus cerris* obserwowano natomiast wyraźne czarne przebarwienia łodygi.

W przypadku infekcji *Q. robur* patogenami *P. quercina* ponowna izolacja patogenu z tkanek roślinnych nie powiodła się, co może być do pewnego stopnia wyjaśnione powolnym wzrostem patogenu. Innym możliwym wyjaśnieniem jest to, że *P. quercina* jest bardziej zjadliwa w stosunku do korzeni drobnych niż innych tkanek roślinnych. Wykazano natomiast, że testowany izolat *P. plurivora* jest chorobotwórczy dla sadzonek buka zwyczajnego oraz że izolat IBL221 *P. cactorum* jest mniej patogeniczny niż izolat *P. cactorum* P163. W przypadku izolatów bułgarskich testowano 2 izolaty *P. cryptogea* (Bul1 i Bul8); 4 izolaty *P. plurivora* (Bul6, Bul10, Bul2 i Bul4); 1 izolat *P. cambivora* (Bul5) oraz 1 izolat *P. rosacearum* (Bul7). Zarówno *P. cryptogea* izolat Bul1 jak i Bul8 wykazują podobną chorobotwórczość, jednak są bardziej zjadliwe w stosunku do dębu *Q. cerris* niż dla buka *F. sylvatica*. Siewki dębu *Q. robur* nie wykazywały rozszerzającej się nekrozy tkanek, które pozostawały ograniczone do niewielkiego obszaru wokół punktu szczepienia. Na podstawie pomiarów długości odbarwienia obserwowanego na łodygach *Q. cerris* i *F. sylvatica* wydaje się, że izolat *P. plurivora* Bul10 (izolowany z tkanek *A. glutinosa*) jest bardziej zjadliwy względem siewek *Q. cerris* i *F. sylvatica* niż izolat *P. plurivora* Bul6 izolowany z tkanek *Q. robur*. Izolat *P. plurivora* Bul10 nie został pomyślnie reizolowany z tkanek *Q. cerris* i *Q. robur* w przeciwieństwie do izolatu *P. plurivora* Bul6, który z powodzeniem ponownie wyizolowano ze wszystkich trzech testowanych gatunków roślin (w myśl postulatów Kocha). Izolaty *P. plurivora* Bul2 i Bul4 powodowały poważniejsze obrażenia u siewek *Q. cerris* niż u siewek *F. sylvatica* i *Q. robur*. W przypadku *F. sylvatica* i *Q. robur* nekroza tkanek ograniczona była jedynie do obrzeża ran po zabiegu inokulacji. Nie stwierdzono widocznych objawów świadczących, że patogeny rozwijały się w tkankach roślin, chociaż z powodzeniem

reizolowano je z asymptomatycznych tkanek pędów. Izolat *P. cambivora* Bul5 okazał się bardziej zjadliwy dla siewek *F. sylvatica* niż *Q. cerris* i *Q. robur*. Patogen ten ponownie reizolowano jedynie z 1 na 8 zaszczepionych siewek *Q. robur* i z 3 na 8 siewek *Q. cerris*. Siewki wszystkich trzech gatunków roślin zainfekowanych izolatem *Phytophthora rosaceraum* Bul7 wykazały jedynie zmiany nekrotyczne wokół miejsc inokulacji. Nie zaobserwowano żadnych innych widocznych symptomów sugerujących trwający proces chorobowy. Patogen ponownie jednak izolowano z tkanek *Q. cerris* i *F. sylvatica*, natomiast reizolacja nie powiodła się w przypadku tkanek *Q. robur*.

Wnioski

1. Patogeny *Phytophthora* mogą rozwijać się w tkankach roślin, nie powodując widocznych objawów.
2. Patogen *P. quercina*, który uważano dotychczas, że może się rozwijać wyłącznie w tkankach drobnych korzeni, reizolowano ze sztucznie inokulowanych pędów w odległości kilkunastu centymetrów od miejsca wprowadzenia go w tkanki dębów.
3. Wśród izolatów jednego gatunku *Phytophthora* istnieje wysoka zmienność patogeniczności.
4. Mimo izolacji geograficznej, izolaty *Phytophthora* pochodzące z południa Europy są w stanie zainfekować i wywołać symptomy chorobowe u roślin pochodzących z Polski.

ROZDZIAŁ 5. PODSUMOWANIE

Obowiązek stosowania zasad integrowanej ochrony roślin przez wszystkich profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin począwszy od dnia 1 stycznia 2014 r. wynika z postanowień art. 14 dyrektywy 2009/128/WE oraz rozporządzenia nr 1107/2009. Artykuł 55 rozporządzenia nr 1107/2009/WE stanowi, że środki ochrony roślin muszą być stosowane właściwie. Właściwe stosowanie środków ochrony roślin obejmuje m.in. zgodność z postanowieniami dyrektywy 2009/128/WE, a od dnia 1 stycznia 2014 r. zgodność z ogólnymi zasadami integrowanej ochrony roślin, o których mowa w art. 14 oraz załączniku III do tej dyrektywy. Obowiązek stosowania integrowanej ochrony roślin regulują także przepisy krajowe - ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin (Dz. U. poz. 455) oraz rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 kwietnia 2013 r. w sprawie wymagań integrowanej ochrony roślin (Dz. U. poz. 505). Jej idea polega na komplementarnym stosowaniu wielu (lub wszystkich) możliwych metod ochrony roślin, a w szczególności metod niechemicznych, w sposób minimalizujący zagrożenie dla zdrowia ludzi, zwierząt oraz dla środowiska. W związku z powyższym, w Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi opracowano projekt krajowego planu działania na rzecz ograniczania ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślin na lata 2013–2017.

Konieczność zastosowania integrowanej ochrony szkółek powoduje, że poszukiwane są alternatywne metody pozwalające uzyskać wysoką jakość materiału szkółkarskiego. Ważnym elementem projektu były testy dostępnych na rynku preparatów poprawiających zdrowotność roślin. Analizowane dane literaturowe wskazują na szeroką możliwość wykorzystania w szkółkarstwie leśnym nawozów - stymulatorów odporności roślin do ograniczania chorób, zarówno w zakresie bezpośredniego działania na patogeny jak również poprzez działanie prozdrowotne na rośliny poprawiające ich stan fizjologiczny oraz poprzez indukcję mechanizmów obronnych roślin SAR/ISR. Przeprowadzone badania potwierdziły skuteczność niektórych z nich i będą mogły być one zastosowane w ramach obowiązującej od tego roku integrowanej ochrony szkółek leśnych. Stosowane w rolnictwie preparaty na bazie efektywnych mikroorganizmów oraz zielone nawozy w celu zwiększenia produktywności upraw, oraz poprawy właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych gleb (szczególnie poprzez zwiększenie dostępności składników mineralnych, powiększenie udziału materii organicznej oraz ograniczenie występowania czynników chorobotwórczych) nie potwierdziły

swoich właściwości w badanych szkółkach leśnych, stąd też nie zostały rekomendowane do szerokiego stosowania w leśnictwie. Preparaty oparte na bazie efektywnych mikroorganizmów (EM) nie dały jednoznacznych wyników badań. W przypadku dwuletnich dębów rosnących na tej samej szkółce (w Nadl. Chojnów) i w tych samych warunkach środowiskowych wpłynęły one korzystnie na rozwój mykoryz (ilość i jakość morfolotypów), natomiast u sadzonek bukowych odwrotnie. W szkółce leśnej Budy (Nadleśnictwo Hajnówka) jednoroczne siewki dębowe i świerkowe, u których zastosowano preparat EM nie różniły się statystycznie istotnie od siewek kontrolnych pod względem przyrostu części nadziemnych i korzeni oraz ich suchej biomasy. Stosowanie stymulatorów wzrostu opartych na bazie Efektywnych Mikroorganizmów (EM) negatywnie wpływa na stan badanych sadzonek, ograniczając liczbę mykoryz i powodując wzrost udziału korzeni martwych. Natomiast badane nawozy na bazie fosforynów jak np. Actifos (in. Agrophos) pozwoliły na ograniczenie uszkodzania drobnych korzeni przez patogeny glebowe w badanych szkółkach leśnych. Stwierdzono korzystne działanie nawozów zawierających fosforyny na wzrost roślin oraz ich zwiększoną odporność na mączniaka prawdziwego liści dębu *Erisiphe alphitoides* oraz patogeny drobnych korzeni z rodzaju *Phytophthora*. Obecnie, na rynku można kupić nawozy na bazie fosforynu amonu (Actifos – dawniej Agrophos), fosforynu potasu (Kalex) lub ich mieszanki Phos 60. W testach przeprowadzonych na siewkach gatunków lasotwórczych rosnących w szkółkach i uprawie wazonowej w szklarni najlepsze efekty uzyskano w przypadku preparatu Actifos. Chronił on ok. 60-80% drobnych korzeni w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Preparat Phos 60 zwiększał przyrosty pędów, natomiast hamował wzrost korzeni, co może być wykorzystywane przy gatunkach głęboko ukorzeniających się jak dąb. Krótsze cykle produkcyjne i zaniechanie podcinania korzeni wpływają korzystnie na zdrowotność sadzonek. Podcinanie korzeni nie tylko silnie ograniczało biomasę systemów korzeniowych ale i powstałe rany stanowiły bramy infekcji dla patogenicznych organizmów. Nawozy fosforynowe dodatkowo zwiększały grubość szyjek korzeniowych sadzonek, co należy uznać za zjawisko korzystne, bowiem stwierdzono, że ta cecha jest dodatnio skorelowana ze zdrowotnością roślin. Preparat Zielony Busz wykazał w kilku przypadkach korzystny wpływ na grubość szyjek korzeniowych (np. w Nadleśnictwie Borki) oraz właściwości fungistatyczne, prawdopodobnie ze względu na zawartość w swoim składzie miedzi. Ulepszona forma preparatu Zielony Busz Forte (z dodatkiem fosforynu) dodatkowo chroniła drobne korzenie siewek, jednak preparat nie jest jeszcze dostępny w sprzedaży. Stosowane preparaty fosforynowe (Actifos i Busz Forte) nie miały wpływu na

stan ilościowy mykoryz badanych sadzonek, natomiast spowodowały wzrost liczby mykoryz żywych.

Ważnym osiągnięciem projektu jest opracowanie metody szybkiej diagnostyki molekularnej patogenów z rodzaju *Phytophthora*, powodujących choroby drobnych korzeni wielu gatunków lasotwórczych. Opiera się ona na technice analizy DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR) z wykorzystaniem sond molekularnych. Zaprojektowane sondy należą obecnie do najbardziej czułych i jednocześnie najbardziej wiarygodnych metod diagnostycznych służących wykrywaniu patogenów, w tym powodujących choroby zgorzelowe występujących na siewkach podstawowych gatunków drzew leśnych. Diagnostyka patogenów roślin z wykorzystaniem metod biologii molekularnej jest obecnie uważana za najbardziej wiarygodne i szeroko stosowane narzędzie badawcze rekomendowane przez międzynarodowe organizacje jak EPPO czy EFSA oraz Komisję Europejską (DG SANCO). Metody identyfikacji patogenów w oparciu o DNA są szybkie oraz niezwykle precyzyjne, a co najważniejsze powtarzalne. Ich stosowanie pozwala na pominięcie niezwykle trudnej i czasochłonnej izolacji patogenów z tkanek roślinnych oraz identyfikacji w oparciu o cechy morfologiczne. Identyfikacja patogenów w oparciu o mikroskopowe cechy morfologiczne jest bardzo trudna ze względu na: podobieństwo w opisach gatunków (Garzon i in. 2007), brak struktur morfologicznych umożliwiających mikroskopową ocenę, ewentualnie konieczność zastosowania specyficznych warunków wzrostu w celu uzyskania specyficznych, charakterystycznych struktur morfologicznych (Paulitz i Adams 2003). Ponadto, tradycyjne metody izolacji ujawniają jedynie tylko część całkowitej populacji mikroorganizmów, które są hodowlane na sztucznych pożywkach (Kwaśna i Bateman 2009). Metody oparte na analizie DNA umożliwiają identyfikację o wiele większej liczby gatunków obecnych w środowisku glebowym. Metody molekularne pozwalają także na rozróżnienie wysoce patogenicznych form grzybów od izolatów niepatogenicznych (Donaldson i in. 1995, Stewart i in. 2006). Dotychczas opracowano wiele zestawów do detekcji PCR wyżej wymienionych patogenów, jednak ze względu na bardzo dużą zmienność genotypową w obrębie gatunków (*F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *C. destructans* oraz lęgniowców: *Phytophthora* i *Pythium*) zestawy te wymagają weryfikacji, zarówno w doświadczeniach laboratoryjnych, jak i warunkach produkcji szkółkarskiej.

Wykorzystanie metod biologii molekularnej w produkcji szkółkarskiej może ułatwić identyfikację patogenów będących przyczyną wielu chorób. Poznanie czynników chorobotwórczych z zastosowaniem metody PCR jest możliwe zarówno z zainfekowanych

tkanek roślin jak i bezpośrednio z gleby lub wody. Z tego też względu metoda PCR jest idealnym rozwiązaniem w identyfikacji patogenów w szkółkarstwie, pozwala bowiem na ominięcie trudności związanych ze skomplikowanymi, a ponadto czasochłonnymi tradycyjnymi metodami izolacji patogenów. Identyfikacja patogena za pomocą reakcji PCR umożliwia bardzo szybką (około 24-godzinna) i niezwykle precyzyjną diagnostykę patogenów roślin, może być także wykorzystana do testowania materiału sadzeniowego w celu wyeliminowania chorych egzemplarzy roślin, które mogą stanowić źródło wtórnych infekcji roślin. Analizy prowadzone w różnych rejonach Polski pozwoliły na przetestowanie metod diagnostycznych na różnorodnym materiale szkółkarskim.

W trakcie projektu pracownicy IBL nabyli doświadczenie w wykonywaniu analiz molekularnych, a Instytut Badawczy Leśnictwa wszedł w posiadanie niezbędnej, nowoczesnej aparatury badawczej (termocyklery, sekwenatory kapilarne DNA, aparaty do elektroforezy, systemy dokumentacji żeli) oraz drobnego sprzętu laboratoryjnego (wirówki, vortexy, termomiksery, autoklawy), jak również specjalistycznego oprogramowania komputerowego do obróbki statystycznej danych molekularnych.

Metody wykrywania i identyfikacji patogenów oraz wykonane testy nawozów stymulujących wzrost i odporność roślin wpisują się w ramy obowiązującej od tego roku integrowanej metody ochrony roślin. Opracowane wytyczne zmierzają do poprawy stanu zdrowotnego i fitosanitarnego siewek w szkółkach leśnych. Efektem końcowym badań jest opracowanie szczegółowych zaleceń dla praktyki leśnej.

BIBLIOGRAFIA

- Abo-Elyousr K.A.M., Hashem M., Ali E.H.** 2009. Sategrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. *Crop Protection*. 28:295–301.
- Adams P., De-Leij F.A., Lynch J.M.** 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of Crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microb Ecol* 54: 306–313.
- Agerer R.** (1987-1998) *Colour Atlas of ectomycorrhizae*. Einhorn, Schwäbisch Gmünd, Germany
- Agerer R.** (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C.** 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology* 114, 329–341.
- Aleksandrowicz-Trzcińska, M.** 2004. Kolonizacja mikoryzowa i wzrost sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w uprawie założonej z sadzonek w różnym stopniu zmikoryzowanych. *Acta Scientiarum Polonorum Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria* 3.1: 5-15.
- Angeles Diaz Borrás M., Vila Aguilar R.** 1988. In-vitro resistance of *Phytophthora citrophthora* to metalaxyl and fosetyl-Al. *Alimentaria*. 8:71-73.
- Angeli D., Maurhofer M., Gessler C., Pertot I.** 2012. Existence of different physiological forms within genetically diverse strains of *Ampelomyces quisqualis*. *Phytoparasitica*. 40(1):37-51.
- Azcón-Aguilar C., Barea J.M.** 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*. 6(6):457–464.
- Bae H., Roberts D.P., Lim H., Strem M.D., Park S., Ryu C., Bailey B.A.** 2011. Endophytic *Trichoderma* Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance Against *Phytophthora capsici* in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms. 24(3):336–351.
- Baker K.F., Cook R.J.** 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. Amer Phytopathol Soc, St. Paul, MN. pp 35–50.
- Barak E., Edgington L.V.** 1984. Cross resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil and related fungicides. *Canadian Journal of Plant Pathology*.6:318-320.
- Bard M., Lees N.D., Burrows L.S., Kleinhans F.W.** 1978. Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *J. Bacteriol.* 135:1146–1148.
- Barnes A. D., Kelley W. D.** 1992. Effects of a triazole, uniconazol, on shoot elongation and root growth in loblolly pine. *Canadian J. Forest Research*. 22(1):1-4.
- Bell M.J., Garside A.L., Magarey R.C.** 2000. Effect of breaks on sugarcane growth: relations between glasshouse and field studies. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.*, 22:68–76.
- Benhamou N.** 2004. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* 94:693–705.

- Benhamou N., Gagné S., Quéré D.L., Dehbi L.** 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90: 45–56.
- Bent E., Tuzun S., Chanway C.P., Enebak S.** 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can J Microbiol* 47:793–800.
- Berdy J.** 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1–26.
- Blein J.P., Coutos-Thevenot P., Marion D., Ponchet M.** 2002. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science*. 7: 293–296.
- Bienapfl J.C., Malvick D.K., Percich J.A.** 2011. Specific molecular detection of *Phytophthora sojae* using conventional and real-time PCR. *Fungal Biol.* 115 (8): 733-40
- Blum M., Waldner M., Gisi U.** 2010. A single point mutation in the novel *PvCesA3* gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genet. Biol.* 47: 499–510.
- Boehm J., Hahn A., Schubert R., Bahnweg G., Adler N., Nechwatal J., Oehlmann R., Osswald W.** 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *J. Phytopathol.* 147: 409-416.
- Branzanti M.B., Rocca E., Pisi A.** 1999. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9:103–109.
- Brent K. J.** 1982. Case study 4: Powdery mildews of barley and cucumber. In: *Fungicide Resistance in Crop Protection*, Dekker, J and Georgopoulos, S G eds. Pudoc, Wageningen, 219- 230.
- Brent K. J., Hollomon D.W.** 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph No. 1. Pp. 60.
- Brown S., Koike S.T., Ochoa O.E., Laemmle F., Michelmore R.W.** 2004. Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. *Plant Disease*. 88:502–8.
- Budi S.W., van Tuinen D., Arnould C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S.** 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain b2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology* 15: 191– 199.
- Campagnac E., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A.** 2009. Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza*. 19(6): 365-374
- Campagnac E., Fontaine J., Sahraoui A.L., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A.** 2008. Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry*. 69(17):2912-2919.

- Cardenas-Flores A., Cranenbrouck S., Draye X., Guillet A., Govaerts B., Declerck S.** 2011. The sterol biosynthesis inhibitor molecule fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. *Mycorrhiza*. 21(5):443-449.
- Chakravarty P., Hwang S.F.** 1991. Effects of ectomycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*, on Fusarium damping-off in *Pinus banksiana* seedlings. *European Journal of Forest Pathology* 21: 97-106.
- Chen G.** 2010. Laboratory evaluation of borate amine borate derivatives in wood for fungal decay. The International Research Group on Wood Protection, (Biarritz - France), IRG/WP 10-30543, 20 p.
- Chen J., Jacobson L.M., Handelsman J., Goodman R.M.** 1996. Compatibility of systemic acquired resistance and microbial biocontrol for suppression of plant disease in a laboratory assay. *Mol Ecol* 5:73–80.
- Chen L., Zhu S., Lu X., Pang Z., Cai M., Liu X.** 2012. Assessing the Risk That *Phytophthora melonis* Can Develop a Point Mutation (V1109L) in Cesa3 Conferring Resistance to Carboxylic Acid Amide Fungicides. *PLoS ONE* 7(7): e42069.
- Choi S.M., Ruddick J.N.R., Morris P.I.** 2001. The possible role of mobile CCA components in preventing spore germination in checked surfaces, in treated wood exposed above ground. The International Research Group on Wood Preservation. (Nara– Japan). IRG/WP 01-30263, 16 p.
- Cobon G.S. Haslam J.M.** 1973. The effect of altered membrane sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 52: 320–326.
- Cohen Y., Coffey M.D.** 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:311-338.
- Cook R. J.** 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 53-80.
- Coolbaugh R.C., Swanson D.I., West C.A.** 1982. Comparative Effects of Ancymidol and Its Analogs on Growth of Peas and Ent-Kaurene Oxidation in Cell-Free Extracts of Immature *Marah Macrocarpus* Endosperm. *Plant Physiology* 69(3):707-711.
- Cordier C., Pozo M.J., Barea J.M., Gianinazzi S.** 1998. Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.11(10):1017–1028.
- Coventry H.S., Dubery I.A.,** 2001, Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotianae tabacum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:149-158.
- Cristani C., Gambogi P.** 1993. Laboratory isolation of *Microdochium (Fusarium) nivale* mutants showing reduced sensitivity to sterol biosynthesis inhibitors. *Rivista di Patologia Vegetale* 3: 49 – 57.
- Daniel R. Guest D.** 2005. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:194–201.

- Daniel R., Wilson B.A., Cahill D.M.** 2005. Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology*.34:541–558.
- de Boer M., Boom P., Kindt F., Keurentjes J.J.B., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M.** 2003. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93:626–632.
- de Boer W., Folman L.B., Summerbell R.C., Boddy L.** 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* 29:795–811
- de Boer M., Van der Sluis I., vanLoon L.C., Bakker P.A.H.M.** 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 201-210.
- Deberdt P., Mfegue C.V., Tondje P.R., Bon M.C., Ducamp M., Hurard C., Begoude B.A.D., Ndoumbe-Nkeng M., Hebbbar P.K., Cilas C.** 2008. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *Biol. Control.* 44:149–159.
- Debieu D., Bach J., Lasseran A., Arnold A., Brousset S., Gredt M., Taton M., Rahier A., Malosse C., Leroux P.** 2000. Inhibition of ergosterol biosynthesis by morpholine, piperidine, and spiroketalamine fungicides in *Microdochium nivale*: effect on sterol composition and sterol $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67, 85–94.
- Delye C., Laigret F., Corio-Costet M.-F.** 1997. A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2966–2970.
- Dercks W., Creasy L.** 1989. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 34(3): 203–213.
- Dereviagina M.K., Elansky S.N., Diakov Y.T.** 1999. Resistance of *Phytophthora infestans* to the dimethorphan fungicide. *Mikologiya Fitopatologiya* 33(3):208-213.
- Devaki N.S., Bhat S.S., Bhat S.G., Manjunatha K.R.** 1992. Antagonistic activities of *Trichoderma harzianum* against *Phythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* on tobacco. *J. Phytopathol.* 136:82–87.
- Dobrowolski M., Duda B., Kolk A., Sierpińska A., Skrzecz I., Żółciak A.** Bezpieczne dla środowiska metody ochrony lasu, IBL, Warszawa, 2001.
- Dobrowolski M.P., Shearer B.L., Colquhoun I.J., O'Brien P.A. Hardy G.E.St.J** 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57:928–936.
- Domenech J., Ramos-Solano B., Probanza A., Lucas-Garcia J.A., Colon J.J., Gutierrez-Manero F.J.** 2004. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. ballot: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *For Ecol Manage* 194:293– 303.
- Domenech J., Reddy M.S., Kloepper J.W., Ramos B.** 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl.* 51(2):245–258.

- Donaldson, G. C., Ball, L. A., Axelrood, P. E., Glass, N. L.** 1995. Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1331-1340.
- Duchesne L.C., Peterson, R.L., Ellis B.E.** 1989. The time-course of disease suppression and antibiosis by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist*.111(4):693–698.
- Duda B.** Wykorzystanie metod biologicznych i technicznych do rewitalizacji gleb w szkółkach leśnych zagrożonych przez pasożytniczą zgorzel siewek, IBL, Warszawa, 1999.
- Duffy B., Schouten A., Raaijmakers J.M.** 2003. Pathogen self- defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:501–538.
- Dunne C., Moenne-Loccoz Y., McCarthy J., Higgins P., Powell J., Dowling D.N., O’Gara F.** 1998. Combining proteolytic and phloroglucino producing bacteria for improved control of *Pythium* mediated damping off of sugar beet. *Plant Pathol.* 47:299–307.
- Edgington L. V.** 1981. Structural Requirements of Systemic Fungicides. *Annual Review of Phytopathology.* 19:107-124.
- Eggers, J., Juzwik J., Bernick S., Mordaunt L.** 2005. Evaluation of propiconazole operational treatments of oaks for oak wilt control. Research Note NC-390. United States Department of Agriculture-Forest Service, North Central Research Station. 6 p.
- Elliott M., Shamoun S.F., Summampong G., James D., Masri S., Varga A.** 2009. Evaluation of several commercial biocontrol products on European and North American population of *Phytophthora ramorum*. *Biocontrol Sc. Technol.* 19(10):1007–1021.
- Elliott M.L.** 1999. Effect of Demethylation Inhibiting Fungicides on ‘Tifgreen’ Bermudagrass Quality. *Horttechnology* 9(2):195-197.
- El-Tarabily K.A., Hardy G.E.St.J., Sivasithamparam K.** 2010. Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. *Eur. J Plant Pathol.* 128:527–539.
- El-Tarabily K.A., Sykes M.L., Kurtboke I.D., Hardy G.E.ST.J., Barbosa A.M., Dekker R.F.H.** 1996. Synergistic effects of a cellulase producing *Micromonospora carbonacea* and a antibiotic producing *Streptomyces violaceus* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. *Can. J. Bot.* 74: 618-624.
- Englander L., Merlino J.A., McGuire J.J.** 1980. Efficacy of two new systemic fungicides and ethazole for control of *Phytophthora* root rot of rhododendron, and spread of *Phytophthora cinnamomi* in propagation benches. *Phytopathology.* 70:1175-1179.
- Ezziyyani M, Requena M.E., Egea Gilabert C., Lamarti A. Candela M.E.** 2009. Biological control of *Phytophthora capsici* root rot of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants using *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Applied BioSciences.* 13: 745-754.
- Ezziyyani M., Requena M. E., Egea-Gilabert C., & Candela M. E.** 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology.* 155(6):342–349.
- Felsenstein F.G., Steden C., Speich J.** 1994. Shifts in morpholine sensitivity of the wheat powdery mildew pathogen, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* and their influence on disease

control. Proceedings of the Brighton Crop Protection. Conference - Pests & Diseases, 475-480.

Figueiredo M.V.B., Seldin L., Araujo F.F., Mariano R.L.R. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari DK (ed) Plant growth and health promoting bacteria, microbiology monographs 18. Springer, Berlin.448p.

Fravel D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 43:337–359.

Fritsche K., Leveau J.H.J., Gerards S., Ogawa S., De Boer W., and van Veen J.A. 2006. *Collimonas fungivorans* and bacterial mycophagy. IOBC/WPRS Bull 29:27–30.

Fukui R., Schroth M.N., Henderson M. Hancock J.G. 1994. Interaction between strains of pseudomonads in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. Phytopathology. 84: 1322–1330.

Gams W. 2007. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. Biodiversity and Conservation. 16(1), 69–72.

Garbelotto M., Harnik T.Y., Schmidt D.J. 2009. Efficacy of phosphonic acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* *in vitro* and *in planta*. Plant Pathology 58, 111–119.

Garzon, C. D., Yanez, J. M., Moorman, G. W. 2007. *Pythium cryptoirregulare*, a new species within the *P. irregulare* complex. Mycologia. 99: 291-301.

Gibson I. A. S. 1958. Phytotoxic effects of copper fungicides on acid soils. East African Agric. J. 24:2.

Gilbert G.S., Handelsman J., Parke J.L. 1990. Role of ammonia and calcium in lysis of zoospores of *Phytophthora cactorum* by *Bacillus cereus* strain UW85. Exp Mycol 14:1–8.

Gisi U., Lamberth C., Mehl A., Seitz T. 2007. Carboxylic acid amide (CAA) fungicides. Modern crop protection compounds. Second Edition. Wiley-VCH Verlag. pp. 651–674.

Głowacka B. Kolk A., Janiszewski W., Rosa-Gruszecka A., Pudelko M., Łukaszewicz J., Krajewski S. 2013. Środki ochrony roślin oraz produkty do rozkładu pni drzew leśnych zalecane do stosowania w leśnictwie w roku 2014. Instytut Badawczy Leśnictwa Analizy i Raporty-21. Wyd. IBL. 78 p.

Gohar Y., Beshay U., Daba A., Hafez E. 2006. Bioactive compounds from *Streptomyces nasri* and its mutants with special reference to proteopolysaccharides. Polish Journal of Microbiology 55: 179–187.

Golińska P., Dahm H. 2013. Antagonistic properties of *Streptomyces* isolated from forest soils against fungal pathogens of pine seedlings, 69:87–97.

Gorzela A. Łukaszewicz J. 1993. Płodozmian w leśnych szkółkach otwartych. Post. Tech. Leś. 53: 40-41

Görtz A., Oerke E.C., Puhl T., Steiner U. 2008. Effect of environmental conditions on plant growth regulator activity of fungicidal seed treatments of barley. Journal of Applied Botany and Food Quality 82, 60 – 68.

Graham J.H. 2001. What do root pathogens see in mycorrhizas? New Phytologist 149: 357-359.

- Grant B.R., Dunstan R.H., Griffith J.M., Niere J.O. Smillie R.H.** 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. Australasian Plant Pathology .19:115.
- Guest D.I. Grant B.** 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biological Reviews. 66:159–187.
- Grodnitskaya I.D. Sorokin N.D.** 2007. Application of microbes to the soils of Siberian tree nurseries. Eurasian. Soil Science 40(3): 329–334.
- Gullino M.L., Tinivella F., Garibaldi A., Kemmitt G.M., Bacci L., Sheppard B.** 2010. Mancozeb past, present and future. Plant Dis. 94(9):1076-1087.
- Gutierrez-Manero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J. Tadeo F. R., Talon M.,** 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiological active gibberellins. Physiol. Plantarum. 111:206-211.
- Hall G.** 1993. An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and redescription of the species. Mycological Research 97: 559 – 574
- Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Lee Y. J., Makizumi Y., Akutsu K., Hibi T.** 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14₂-demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. Appl. Environ. Microbiol. 66:3421–3426.
- Handelsman J., Raffel S., Mester E.H., Wunderlich L., Grau C.R.** 1990; Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 56:713–718.
- Handelsman J., Nesmith W.C., Raffel S.J.** 1991. Microassay for biological and chemical control of infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Curr. Microbiol. 22:317-319.
- Hardy G.E.St.J., Barrett S., Shearer B.L.** 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. Australasian Plant Pathology. 30, 133–139.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M.** 2004. *Trichoderma* species – opportunistic avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2:43–56.
- Harrier L.A., Watson C.A.** 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. Pest Manage. Sci. 60:149–157.
- Härtner H., Barth V.** 1996. Effectiveness and synergistic effects between copper and polymer betaine. The International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP 96-30097.
- Hastrup A., Ch.S., Green I.I.I.F., Clausen C., Jensen B.** 2005. *Serpula lacrymans* – the dry rot fungus tolerance towards copper-based wood preservatives. The International Research Group on Wood Protection, (Bangalore - India), IRG/WP 05-10555, 7 p
- Haugen L., Stennes M.** 1999. Fungicide injection to control Dutch elm disease: Understanding the options. Plant Diagnosticians Quarterly. 20:29-38.
- Hawksworth D.L.** 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycol. Res. 105:1422–1432.

- Heydari A., Pessarakli M.** 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *J. Biol. Sci.* 10:273–290.
- Hill R.A., Paderes D.E., Wigley P.J., Broadwell A.H.** 2007. Growth of *Pinus radiata* seedlings in the nursery with novel microbial formulations. *New Zealand Plant Protection* 60: 305.
- Hohmann P., Jones E.E., Hill R.A., Stewart A.** 2011. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings. *Fungal Biology*, 115:759–767.
- Hollomon D. W.** 1979. Evidence that ethirimol may interfere with adenine metabolism during primary infection of barley powdery mildew. *Pestic. Biochem. Physiol.* 10:181-189.
- Hollomon D. W., Chamberlain K.** 1981. Hydroxypyrimidine fungicides inhibit adenosine deaminase in barley powdery mildew. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16:158-169.
- Hollomon D.W., Schmidt H.H.** 1987. Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action. Longman Scientific & Technical Uniwersytet Cornell. pp.383.
- Hu J., Hong C.** 2007. Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Dis.* 91(4): 414-420.
- Hwang S.F., Chakravarty P., Chang K.-F.** 1995. The effect of two ectomycorrhizal fungi, *Paxillus involutus* and *Suillus tomentosus*, and of *Bacillus subtilis* on Fusarium damping-off in jack pine seedlings. *Phytoprotection.* 76:(2)57-66.
- Ingleby K., Mason P.A., Last F.T., Fleming L.V.** 1990. Identification of ectomycorrhizas. Research publication no.5. Institute of Terrestrial Ecology. London, HMSO
- Ippolito A., Schena L., Nigro F., Ligorio V.-S., Yaseen T.** 2004. Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soil. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 833-843.
- Janisiewicz W.J., Covey R.P.** 1983. Biological control of collar rot caused by *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology* 73:822.
- Jeger M.J., Jeffries P., Elad Y., Xu X.M.** 2009. A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *J. Theoretical Biology.* 256:201–214.
- Jetiyanon K., Kloepper J.W.** 2002. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control* 24:285–291.
- Joffrion T.M., Cushion M.T.** 2010. Sterol biosynthesis and sterol uptake in the fungal pathogen *Pneumocystis carinii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 311:1–9.
- Junaid J. M., Dar N.A., Bhat T.A., Bhat A.H., Bhat A.** 2013. Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences.* 1(2):39–57.
- Jung H.K., Kim S.D.** 2005. An antifungal antibiotic purified from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-pepper *Phytophthora* blight disease. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 1001–1010.
- Jung T.** 2009. Beech decline in Central Europe driven by the Interactions between *Phytophthora* infections and climatic extremes. *Forest Pathology* 39: 73-94

- Jung T., Blaschke H., Neumann P.** 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology*. 26 (5): 253-272
- Jung T., Blaschke H., Osswald W.** 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in central European oak decline and the effect of site factors on the diseases. *Plant Pathology* 49 (6): 706-718
- Jung T., Burgess T.I.** 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia* 22: 95-110
- Jung W.J., Jin Y.L., Kim K.Y., Park R.D., Kim T.H.** 2005. Changes in pathogenesis-related proteins in pepper plants with regard to biological control of phytophthora blight with *Paenibacillus illinoisensis*. *BioControl*. 50(1):165–178.
- Jung W.J., Jin Y.L., Park R.D., Kim K.Y., Lim K.T., Kim T.H.** 2006. Treatment of *Paenibacillus illinoisensis* suppresses the activities of antioxidative enzymes in pepper roots caused by *Phytophthora capsici* infection. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22(9):901–907.
- Kalamarakis A.E., De Waard M.A., Ziogas B.N., Georgopoulos S.G.** 1991. Resistance to fenarimol in *Nectria haematococca* var *cucurbitae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 40, 212 – 220.
- Kapoor R.** 2008. Induced Resistance in Mycorrhizal Tomato is correlated to Concentration of Jasmonic Acid. *OnLine J. of Biological Sciences*. 8(3):49–56.
- Kavatagi K.P., Lakshaman H.C.** 2012. Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi for their symbiotic efficiency on two varieties of *Solanum lycopersicum* L. *Int.J. Pharm. Bio. Sci.*3(3):B1007-1017.
- Kelley W.D.** 1976. Evaluation of *Trichoderma harzianum* impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamomi* causing damping off in pine seedlings. *Phytopathology* 66, 1023–1027.
- Kerkenaar A.** 1995. Mechanism of action of cyclic amine fungicides: morpholines and piperidines, in *Modern Selective Fungicides*. Lyr, H., Editor. Gustav Fischer Verlag: New York. p. 185-204.
- Kessel G.J.T., De Hass B.H., van der Werf W., Köhl J.** 2002. Competitive substrate colonisation by *Botrytis cinerea* and *Ulocladium atrum* in relation to biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Mycol. Res.* 106:716–728.
- Khamna S., Yokota A., Lumyong S.** 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:649–655.
- Khan J., Ooka J.J., Miller S.A., Madden L.V., Hoitink H.A.J.** 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. *Plant Dis.* 88:280–286.
- Kim H.S., Sang M.K., Jeun Y.C., Hwang B.K., Kim K.D.** 2008. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling *Phytophthora* blight of pepper. *Crop Protection*. 27(3-5):436–443.
- Kim Y.C., Jung H., Kim K.Y., Park S.K.** 2007. An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic

bacteria under different field conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 120(4):373–382.

Kong P., Hong C. X., Tooley P. W., Ivors K., Garbelotto M., Richardson P. A. 2004. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 433-439

Kowalski S., Wojnowski L. 2009. Armillaria root rot dynamics in the experimental plantation with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings non mycorrhized and mycorrhized with the fungi *Hebeloma crustuliniforme* and *Laccaria bicolor*. *Sylvan*. 153(1):31-38.

Kuc T., Aleksandrowicz-Trzcńska M. 2012. Wpływ fungicydów stosowanych w ochronie przed mączniakiem prawdziwym na wzrost i kolonizację mikoryzową hodowanych w kontenerach sadzonek dębu. *Sylvan* 156(9):672–683.

Kumar N., Thirumalai V., Gunasekaran P. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Sci. India*. 82:1463-1466.

Kwaśna H., Bateman G.L. 2009. Microbial communities in roots of *Pinus sylvestris* seedlings with damping-off symptoms in two forest nurseries as determined by ITS1/2 rDNA sequencing. *For. Path.* 39: 239–248.

Laatikainen T., Heinonen-Tanski H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microbiol. Res.* 157, 127–137.

Lasseron-De Falandre A., Debieu D., Bach J., Malosse C., Leroux P. 1999. Mechanisms of resistance to fenpropimorph and terbinafine, two sterol biosynthesis inhibitors, in *Nectria haematococca*, a phytopathogenic fungus. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 64:167-184.

Lasseron-De Falandre A., Debieu D., Bach J., Malosse C., Leroux P. 1999. Mechanisms of resistance to fenpropimorph and terbinafine, two sterol biosynthesis inhibitors, in *Nectria haematococca*, a phytopathogenic fungus. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 64, 167-184.

Leeman M., Ouden E.M., Van Den Pelt J. A., Cornelissen C., Bakker P.A.H.M., Schippers, B. 1996. Suppression of fusarium wilt of radish by co inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root colonizing fungi. *Eu. J. Plant Pathol.* 102:21–31.

Lees N.D., Bard M., Kemple M.D., Haak R.A. Kleinhans F.W. 1979. ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 553: 469–475.

Lefort F., Pralon T., Nowakowska J., Oszako T. 2013. Screening of bacteria and fungi antagonist to *Phytophthora* and *Pythium* species pathogenic of forest trees. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. IOBC-WPRS Bulletin Vol.* 86:185-186.

Lehr N.A., Schrey S.D., Hampp R., Tarkka M.T. 2008. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol.* 177:965–976.

Leroux P., Chapeland F., Desbrosses D., Gredt M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*. 18:687-697.

Leski T., Mleczko P., Rudawska M., Kieliszewska - Rokicka B. 2008. Metody badań ilościowych i jakościowych ektomikoryz drzew leśnych. W: *Mykologiczne badania terenowe*

– przewodnik metodyczny. Mułenko W. (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej, Lublin: 108-131.

Leski, T., Pietras M., Rudawska M. 2010. Ectomycorrhizal fungal communities of pedunculate and sessile oak seedlings from bare-root forest nurseries. *Mycorrhiza* 20.3 179-190.

Leski, T., Rudawska, M., Aucina, A., Skridaila, A., Riepsas, E., i Pietras, M. 2009. Wpływ ściółki sosnowej i dębowej na wzrost sadzonek sosny i zbiorowiska grzybow mikoryzowych w warunkach szkółki lesnej. *Sylvan*, 153(10), 675-683..

Li M., Inada M., Watanabe H., Suga H., Kageyama K. 2013. Simultaneous detection and quantification of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and distribution analyses in strawberry greenhouses by duplex real-time PCR. *Microbes Environ.* 28 (2), 195–203

Lilja A. 1994. The occurrence and pathogenicity of uniand binucleate Rhizoctonia and Pythiaceae fungi among conifer seedlings in Finnish forest nurseries. *European Journal of Forest Pathology* 24: 181–192.

Logeshwaran P., Thangaraju M., Rajasundari K. 2011. *In Vitro* Suppression of Soil Borne Pathogenic Fungi and Pyoluteorin Production by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J. Basic. Appl. Sci. Res.*, 1(3) 150-156.

Lourenco J.V, Maffia L.A., Romeiro R.D., Mizubuti E.S.G. 2006 Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. *Biol Control* 38:331–340.

Łukaszewicz J., Duda B. 2002a. Biologiczna walka z chorobami zgorzelowymi. *Głos Lasu* 1: 13-15

Łukaszewicz J., Duda B. 2002b. Uprawa sosny zwyczajnej w płodozmianach szkółki leśnej z zastosowaniem różnych ugorów zielonych. *Leśne Prace Badawcze* 4 (945): 21-42

Ma Z., Michailides T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop. Prot.* 24:853-863.

Ma W., Berkowitz G.A. 2007. The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell Microbiol.* 9:2571–2585.

Ma Y., Chang Z., Zhao J., Zhou M. 2008. Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper. *Biological Control.* 44(1):24–31.

Machón, P., Pajares, J.A., Diez, J.J., Alves-Santos, F.M., 2009. Influence of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* on pre-emergence, postemergence and late damping-off by *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* on Stone pine seedlings. *Symbiosis*.49:101–109.

Manninen A.M., Laatikainen T., Holopainen T. 1998. Condition of Scots pine fine roots and mycorrhiza after fungicide application and low-level ozone exposure in a 2- year field experiment. *Trees* 12, 347–355.

Mańka, M., 1993: Damping-off of the Forest Trees [Zgorzele siewek drzew leśnych]. Poznań. Wydawnictwo Acarus, pp. 1–32

Marshall J.A., Dennis A.L., Kumazawa T., Haynes A.M., Nes W.D. 2001. Soybean sterol composition and utilization by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* 58: 423–428.

- Martin F. N., Tooley P. W.** 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94: 983-991.
- Marx D.H.** 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59:153-163.
- May L. L., Kimati H.** 2000. Controle de *Phytophthora parasitica* com fungicidas e efeito desses produtos no crescimento micelial de *Trichoderma*. *Sum. Phytopathol.* 26:52-57.
- McGrath M. T.** 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew, experiences and challenges. *Plant Dis.* 85:236-245.
- Mellado E., Diaz-Guerra T.M., Cuenca-Esterella M., Rodriguez-Tudela J.L.** 2001. Identification of two different 14- sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 39:2431–2438.
- Meng Q.X., Cui X .L., Bi Y , Wang Q., Hao J.J.** 2011. Biological and genetic characterization of *Phytophthora capsici* mutants resistant to flumorph. *Plant Pathol.* 60:957–966.
- Milenkovski S., Baath E., Lindgren P. E., Berglund O.** 2010. Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology.* 19(2):285–294.
- Minchin R.F., Ridgway H.J., Condrón L., Jones E.E.** 2012. Influence of inoculation with a *Trichoderma* bioinoculant on ectomycorrhizal colonisation of *Pinus radiata* seedlings. *Annals of Applied Biology.* 161(1): 57-67.
- Mittal R.K. Wang B.S.P.** 1993. Effects of some seed borne fungi on *Picea glauca* and *Pinus strobus* seeds. *European Journal of Forest Pathology.* 23: 138–146.
- Molina R., Massiocotte H., Trappe J.M.** 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF (ed) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process.* Chapman and Hall, New York, pp 357–423.
- Moore M.S., Follas G.B., Hagerty G.C., Beresford R.M.** 2008. Carboxylic acid amide (CAA) fungicide resistance prevention strategy. *New Zealand Plant Protection* 61:134-136.
- Moorman G.W., Kang S., Geiser D.M., Kim S.H.** 2002. Identification and characterisation of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. *Plant Disease.* 86: 1227 – 1231.
- Mousseaux M.R., Dumroese R.K., James R.L., Wenny D.L. and Knudsen G.R.** 1998. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control (agent) of *Fusarium oxysporum* in container grown Douglas fir seedlings. *New Forests* 15(1): 11–21.
- Muthukumar A., Easwaran A., Nakkeeran S., Sangeetha G.** 2010. Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. *Crop Prot* 29:1483–1488.
- Napier B.A.S., Bayles R.A., Stigwood P.L.** 2000. Sensitivity of powdery mildew and yellow rust to DMI, morpholine and strobilurin fungicides in England and Scotland. *Proceedings of the BCPC Conference Pests & Diseases.* 427-434.
- Nguyen X.-H., Naing K.-W., Lee Y.-S., Tindwa H., Lee G.-H., Jeong B.-K., Kim K.-Y.**

2012 Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in Pepper. The Plant Pathology Journal. 28(3): 282–289

O'Brien R.G., Vawdrey L.L., Glass R.J. 1988. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew *Sphaerotheca fuliginea* and its effect on field control. Australian Journal of Experimental Agriculture. 28:417-424.

Okamoto H., Sato M., Sato Z., Isaka M., 1998. Biocontrol of *Phytophthora capsici* by *Serratia marcescens* F-1-1 and analysis of biocontrol mechanisms using transposon insertion mutants. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64:287-293.

Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T. 2001. Induced disease resistance by chemicals. Eur. J. Plant Pathol. 107:19–28.

Orbovic V., Achor D., Syvertsen J.P. 2007. Adjuvants Affect Penetration of Copper Through Isolated Cuticles of Citrus Leaves and Fruit. Hortscience. 42(6):1405–1408.

Ozgonen Y., Yardimci N., Kilic H.C., 2009. Induction of phenolic compounds and pathogenesis related proteins by mycorrhizal fungal inoculations against *Phytophthora capsici* Leonian in pepper. Pak. J. Biol. Sci. 12(17), 1181– 1187.

Pap P., Rankovic B., Masirevic S. 2012. Significance and need of powdery mildew control (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl.) in the process of regeneration of the pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stands in the Ravni Srem area. Periodicum Biologorum. 114(1):91–102.

Paderes D. E., Hill R. A., Wang W. Y., Ridgeway H. J. Stewart A. 2005. Development of a Bio Protection System for *Pinus Radiata* with *Trichoderma* (ArborGuard™). In FOA/MAF 5th Annual Forest Biosecurity Workshop. Rotorua. New Zealand.

Papavizas G.C., O' Neill N.R., Lewis J.A. 1978. Fungistatic activity of propyl-N (alphadimethylaminopropyl) carbamate on *Pythium* spp. and its reversal by sterols. Phytopathology. 68:1667–1671.

Parker I.M., Gilbert G.S. 2004. the Evolutionary Ecology of Novel Plant-Pathogen Interactions. Annu. Rev. Ecology Evolution Systematic. 35(1), 675–700.

Paul D., Sarma Y. R. 2006. Antagonistic effects of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strains on the different growth phases of *Phytophthora capsici* , foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.). Archives Of Phytopathology And Plant Protection. 39(2), 113–118.

Paulitz, T. C.; Adams, K., 2003: Composition and distribution of *Pythium* communities in wheat fields in eastern Washington state. Phytopathology 93 (7): 867-873

Paulitz T.C., Belanger R.R., 2001. Biological control in green house system. Annu. Rev. Phytopathol. 39:103-133.

Peacock K.L., Fulbright D.W. 2007. Effective longevity of propiconazole following injection into *Quercus rubra*. Pp. 181-190. In: Proceedings of the 2nd National Oak Wilt Symposium, Austin, Texas.

Picard K., Ponchet M., Blein J. P., Rey P., Tirilly Y., Benhamou N. 2000a. Oligandrin A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. Plant Physiology. 124(1):379–95.

Picard K., Tirilly Y., Benhamou N. 2000b. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. Applied Environmental Microbiol. 66(10):4305–4314.

- Pieterse C. M. J., Pelt J. A. V., Wees S.C.M.V., Ton J., Kloostererziel K.M.L., Keurentjes J. J.B., Verhagen B.W.M., Knoester M., Sluis I.V.D., Bakker P.A.H.M., Loon L.C.V.** 2001. Rhizobacteria mediated induced systemic resistance: Triggering, signaling and expression. *Eu. J. Plant Pathol.* 107:51-61.
- Pietras M., Rudawska M., Leski T., Karliński L.** 2013. Diversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on nursery grown European beech seedlings. *Annals of Forest Science* 70:115–121
- Piggot C. D.** 1982. Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr. in dry soils. *New Phytol.*, 92: 513-517.
- Pilbeam R.A., Howard K., Shearer B.L. Hardy G.E.St.J.** 2011. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees - Structure and Function.* 25:1121–1131.
- Pommer E.H.**, 1995. Morpholine fungicides and related compounds. In: *Modern Selective Fungicides—Properties, Applications, Mechanisms of Action* (H. Lyr, ed.), Gustav Fisher–Verlag, Jena, Germany, 163–183.
- Pozo J.C.D., Allona I., Rubio V., Leyva A., de la Pena A., Aragoncillo C., Paz-Ares J.** 1999. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J.* 19: 579–589.
- Read D.J., Perez-Moreno J.** 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytol.* 157:475–492.
- Rademacher W.** 2000. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways." *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:501-531.
- Rapp L., Richter J.** 1982. Effect of propamocarb-hydrochloride (Previcur N) on several isolates of some *Pythium* and *Phytophthora* species in vitro and in vivo. *J. Plant Dis. Prot.* 89:487-497.
- Reglinski T., Dick M.**, 2005. Biocontrol of forest nursery pathogens. *New Zealand Journal of Forestry.* 50, 14–21.
- Reglinski T., Spiers T.M., Taylor J.T., Ah Chee A., Dick M.A.** 2008. Management of *Phytophthora* root rot in radiata pine seedlings. Report to New Zealand Forest Health Research collaborative, Project 2007-03.1-23pp.
- Renshaw J.C., Robson G.D., Trinci A.P.J., Wiebe M.G., Livens F.R., Collison D.C., Taylor R.J.** 2002. Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycol. Res.* 106:1123–1142.
- Rhodes L.H., Larser P.O.** 1981. Effects of fungicides on mycorrhizal development of creeping bentgrass. *Plant. Dis.* 65,145-147.
- Roberts D.P., Lohrke S.M., Meyer S.L.F., Buyer J. S., Bowers, J.H., Jacyn Baker C., Chung, S.** 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection*, 24(2): 141–155.
- Rolbiecki S., Klimek A., Rolbiecki R., Hilszczańska D.** 2009. Wpływ nawożenia organicznego i ściółkowania na wzrost jednorocznych siewek sosny zwyczajnej oraz właściwości biologiczne gleb w szkółce leśnej w warunkach mikrozaszrania. *Infrastruktura i ekologia terenów wiejskich* 6: 229–243.

- Rudawska M., Leski T., Trocha L. K., Gornowicz R.** 2006. Ectomycorrhizal status of Norway spruce seedlings from bare-root forest nurseries. *For. Ecol. Manag.* 236:375–384.
- Salas-Marina M.A., Silva-Flores M.A., Uresti-Rivera E.E., Castro- Longoria E., Herrera-Estrella A., Casas-Flores S.** 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* 131:15–26.
- Samoucha Y., Cohen Y.** 1990. Toxicity of propamocarb to the late blight fungus on potato. *Phytoparasitica.* 18:27–40.
- Saxena R.K., Sangeetha L., Vohra A., Gupta R., Gulati R.** 2001. Induction and mass sporulation in lignin degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispota* for its potential usage in pulp and paper industry. *Current Science.* 81:591– 594.
- Schena L., Hughes K.J., Cooke D.E.** 2006 Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Mol Plant Pathol.* 7 (5): 365-79.
- Schouten A.O., Maksimova O., Cuesta-Arenas Y., Berg G.V.D., Raaijmakers J.M.** 2008. Involvement of the ABC transporter in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ Microbiol* 10:1145–1157.
- Serrano M.S., Fernandez-Rebollo P., De Vita P., Sanchez M.E.** 2012. Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain. *Agroforest Syst:* 1-7.
- Shang H., Chen, J., Handelsman J., Goodman R.M.** 1999. Behavior of *Pythium torulosum* Zoospores During Their Interaction with Tobacco Roots and *Bacillus cereus* 38. *Current Microbiol.* 38:199–204.
- Shen S., Choi O., Park S., Kim C., Park C.** 2005. Root Colonizing and Biocontrol Competency of *Serratia plymuthica* A21-4 against *Phytophthora* Blight of Pepper. 21(1):64–67.
- Silo-Suh L.A., Lethbridge B.J., Raffel S.J., He H., Clardy J., Handelsman J.** 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* 60:2023–2030.
- Silva H.S.A., Romeiro R.S., Carrer-Filho R., Pereira J.L.A., Mizubuti E.S.G., Mounteer A.,** 2004. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under Weld conditions. *J. Phytopatol.* 152, 371–375.
- Singh J.S., Pandey V.C., Singh D.P.** 2011. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140:339–353.
- Smillie, R., Grant, B.R. and Guest, D.** 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* 79, 921–926.
- Smith K. P., Havey M. J., Handelsman J.** 1993. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Dis.* 77:139-142.
- Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.** 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and

acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biol. Technol.* 33:141–151.

Sreenivasa M.N., Bagyaraj D.J. 1989. Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Soil*. 119:127-132.

Stewart J. E., Kim M. S., James R. L., Dumroese R. K., Klopfenstein N. B. 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* isolates from a conifer nursery. *Phytopathology*. 96(10): 1124-1133.

Sugimoto T., Watanabe K., Yoshida S., Aino M., Irie K., Matoh T., Biggs A.R. 2008. Select calcium compounds reduce the severity of *Phytophthora* stem rot of soybean. *Plant Dis* 92:1559–1565.

Sutherland J.R. Diekmann M., Berjak P. 2002. Forest tree seed health for germplasm conservation. IPGRI Technical Bulletin 6. 85 p. Rome, Italy. ISBN 92-9043-515-1.

Timmusk S., van West P., Gow N.A.R., Huffstutler R.P. 2009. *Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. *J. Appl. Microbiol.* 106:1473–1481.

Tooley P.W., Martin F.N., Carras M.M., Frederick R.D. 2006. Real-Time Fluorescent Polymerase Chain Reaction Detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* Using Mitochondrial Gene Regions. *Phytopathology*. 96 (4): 336-45.

Trotta A., Varese G.C., Gnani E., Fusconi A., Sampó S., Berta G. 1996. Interaction between the soil borne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil* 185:199–209.

Tsantrizos Y.S., Kope H.H., Fortin J.A., Ogilvie K.K. 1991. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 30: 1113–1118.

Tyler B.M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R.H., Aerts A., Arredondo F.D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J.L. 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* .313: 1261–1266.

Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., Dery C., Brzezinski C., Beaulieu C. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1630–1635.

Van Peer R., Niemann G. N., Schippers B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt in carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, 81, 728–734.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. 2008. *Trichoderma* plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1–10.

Von Broembsen S.L., Deacon J.W. 1997. Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solutions. *Phytopathology*. 87:522–528.

Wang H.C., Sun H.Y., Stammler G., Ma J.X., Zhou M.G. 2009. Baseline and differential sensitivity of *Peronophythora litchii* (lychee downy blight) to three carboxylic acid amide fungicides. *Plant Pathol* 58: 571–576.

Whipps J.M. 2001 Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Experim. Botany*. 52:487–511.

- Wilde T. H.** 1990. Propamocarb-HCl, a fungicide suitable for integrated pest management. Pages 303-306 in: Tomato and Pepper Production in the Tropics. Proc. Intl. Sympos. Integrated Management Practices. Taiwan.
- Wilkinson, C.J., Holmes, J.M., Dell, B., Tynan, K.M., McComb, J.A., Shearer, B.L., Colquhoun, I.J. and Hardy, G.E.St.J.** 2001. Effect of phosphite on *in planta* zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology. 50, 587–593.
- Wilson A.D., Lester D.G.** 2002. Trench inserts as long-term barriers to root transmission for control of oak wilt. Plant Disease. 86: 1067-1074.
- Wong F.P., Wilcox W.F.** 2001. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). Plant Dis. 85:649-656.
- Wood H. M., Dickinson M. J., Lucas J. A., Dyer P.S.** 2001. Cloning of the *CYP51* gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. FEMS Microbiol. Lett. 196:183–187.
- Worley J. F., HacsKaylo E.** 1959. The effect of available soil moisture on the mycorrhizal association of virginia pine. For. Sci.: 267-268.
- Wuyep P.A., Khan A.U., Nok A.J.** 2003. Production and regulation of lignin degrading enzymes from *Lentinus squarrosulus* (mont.) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler. African Journal of Biotechnology 2 (44), 444–447.
- Xiao K., Kinkel L. L., Samac D. A.** 2002. Biological Control of Phytophthora Root Rots on Alfalfa and Soybean with Streptomyces. Biological Control. 23(3), 285–295.
- Xu X.-M., Robinson J. D, Jeger M, Jeffries P.** 2010. Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures. Biocontrol Sci. Technol. 20:359-373.
- Xu X.M., Jeffries P., Pautasso M. Jeger, M.J.** 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. Phytopathology 101:1024-1031.
- Xu X.-M., Jeger M.J.** 2013. Theoretical modeling suggests that synergy may result from combined use of two biocontrol agents for controlling foliar pathogens under spatial heterogeneous conditions. Phytopathology. 103(8): 768-775.
- Yan Z., Reddy M.S., Ryu C-M., McInroy J.A., Wilson M., Kloepper J.W.** 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting bacteria. Phytopathology 92:1329–1333.
- Yang C., Hamel C., Vujanovic V., Gan Y.** 2011. Fungicide:Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. ISRN Ecology. Article ID 130289, 1-8.
- Yin Y., Liu X., Li B., Ma Z.** 2009. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. Phytopathology.99(5):487-497.
- Young D.H., Spiewak S.L., Slawecki R.A.** 2001. Laboratory studies to assess the risk of development of resistance to zoxamide. Pest Management Science 57:1081-1087.
- Yuan W.M., Crawford D.L.** 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. App. Env. Microbiol. 61(8), 3119–28.

Zeng W., Kirk W., Hao J. 2012. Field management of Sclerotinia stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control*. 60:141–147.

Zhu S., Liu P., Liu X., Li J., Yuan S., Si N. 2008. Assessing the risk of resistance in *Pseudoperonospora cubensis* to the fungicide flumorph in vitro. *Pest Manag Sci.*64(3):255-261.

Zwiers L.-H., Stergiopoulos I., Van Nistelrooy J.G.M., De Waard M.A. 2002. ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3900–3906.

Dyrektywa nr 2009/128/WE z dnia 21.10.2009

Rozporządzenie nr 546/2011 z dnia 10.06.2011

www.frac.info

www.rebeca-net.de

www.ncbi.nlm.nih.gov

ZAŁĄCZNIK 1

Sekwencje DNA grzybów mykoryzowych

Morfotyp	Identyfikacja/ Numer GenBank	Sekwencja
B (Bk)	Tuber sp. HM485376	GGATCATTACAAATGACTGGGATGTCCTATCGGACCCCCAAGCAAACACATCTATGTGTACTC TGCCATGTTGCTTCCCCAGACCAGTGGCCACTGCTGCCAGCCCAGCCCCTAATGGGTTTCCTGG GTTGAGGTGTCTGGGGAAGGGCTCAATATCAAACCTTTTCAACCTACTAGTCGTCTGAGAAGGC CATGTGCCGCAATATTTAAACAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCACTAAAAA CCGACTCACATATCGTGTGGTATTGGTAGAAGTGGATAGTACTAACACTACTTTTGTCTTACTC TGCTGAAATGAATAGGCCAGAAAAGTGGACCATGGTAATAGATTCCAGGAGTGTTTTAAATG CTATACTAGTCTTATCCAAGTCATATTCTGAGCCACTGGACCCCCCATTTAGTCCAAACAACA GTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
C (Bk)	Tuber sp. HM485376	GGATCATTACAAATGACTGGGATGTCCTATCGGACCCCCAAGCAAACACATCTATGTGTACTC TGCCATGTTGCTTCCCCAGACCAGTGGCCACTGCTGCCAGCCCAGCCCCTAATGGGTTTCCTGG GTTGAGGTGTCTGGGGAAGGGCTCAATATCAAACCTTTTCAACCTACTAGTCGTCTGAGAAGGC CATGTGCCGCAATATTTAAACAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCACTAAAAA CCGACTCACATATCGTGTGGTATTGGTAGAAGTGGATAGTACTAACACTACTTTTGTCTTACTC TGCTGAAATGAATAGGCCAGAAAAGTGGACCATGGTAATAGATTCCAGGAGTGTTTTAAATG CTATACTAGTCTTATCCAAGTCATATTCTGAGCCACTGGACCCCCCATTTAGTCCAAACAACA GTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

D (Bk)	Hebeloma sacchariolens AY312985	GGATCATTAWTGAATGAACTTGGTGTGGTTGTTGCTGGCCCTCTCGGGGGCATGTGCACACTC ACCATCCTCATCTYTCCACCTGTGCACCTYTTGTAGACTTGGAANGACTTTCCGAGGCCACTC GGTYGGGAGGTTTGGCTGGCATTAGSTGGCTTTCCTTGCCTTTYCACGTTTACGTTTTTCATAT ACCCCAATTGTATGTAACAGAAWGATCATTGGGCCCTTGTGCCTATAAACCTTATACAACTT TCAGCAACGGATYTYTTGGCTYTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCMCCTTGCGCTCCTTGGTATTYCGA GGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTYTCAACCTTTATCAGCTTTTGTGATAACGGCT TGGATATGGGGGTTTTTTTTTGGCTGGCTTCTTCACAGATGGTCAGCTCCCCTTAAATGCATTA GCCGGTGCCCCGCGTGGACTGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGACATCTGCAAT CATATGGGTTTGCCTGCTTCTAACGGTCTGTTTGTTCAGACAATACATGACAATTGACCTCA AAT
E (Bk)	Hebeloma sacchariolens AY312985	CGGAAGGATCATTATTGAATGAACTTGGTGTGGTTGTTGCTGGCCCTCTCGGGGGCATGTGCA CACTCACCATCCTCATCTCTCCACCTGTGCACCTCTTGTAGACTTGGAATGACTTTCCGAGGC CACTCGGTGCGGAGGTTTGGCTGGCATTAGCTGGCTTTCCTTGCCTTTCCACGTCTACGTTTTT CATATAACCCCAATTGTATGTAACAGAAATGTATCATTGGGCCCTTGTGCCTATAAACCTTATAC AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTAT TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATCTCAACCTTTATCAGCTTTTGTGATAA CGGCTTGGATATGGGGGTTTTTTTTTGGCTGGCTTCTTCACAGATGGTCAGCTCCCCTTAAATG CATTAGCCGGTGCCCCGCGTGGACTGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGACATCT GCAATCATATGGGTTTGCCTGCTTCTAACGGTCTGTTTGTTCAGACAATACATGACAATTGA CCTCAAAT
H (Bk)	Tuber sp. JQ724042	GATCATTACAAATGACTGGGATGTCCTATCGGACCCCCAAGCAAACACATCTATGTGTACTCT GCCATGTTGCTTCCCCAGACCAGTGGCCACTGCTGCCAGCCCAGCCCCTAATGGGTTCCCTGGG TTGAGGTGTCTGGGGAAGGGCTCAATATCAAACCTTTCAACCCACTAGTCGTCTGAGAAGGCC ATGTGCCGCAATATTTAAACAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCTTAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCACTAAAAAC CGACTCACATATCGTGTGGTATTGGTAGAAGTGGATAGTACTAACAATACTTTGTCTTACTCT GCTGAAATGAATAGGCCAGAAAAGTGGACCATGGTAATAGATTCCAGGAGTGTTTTAAATGC TATACTAGTCTTATCCAAGTCATATTCTGAGCCACTGGACCCCCATTTAGTCCAAACAACAG TGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

I (Bk)	Hebeloma sacchariolens JX030286	GGCATTAGCTGGCTTTTCCTTGCCTTTCCACGTCTACGTTTTTCATATACCCCAATTGTATGTA ACAGAAATGTATCATTGGGGCCCTTGTGCCTATAAACCTTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCT TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTG AGTGTCAATTAAATTCTCAACCTTTATCAGCTTTTGTGATAACGGCTTGGATATGGGGGTTTT TTTTTGCTGGCTTCTTCACAGATGGTCAGCTCCCCTTAAATGCATTAGCCGGTGCCCCGCGTG GACTGTCTATYGGTGTGATAATTATMTACGCCGTGGACATCTGCAATCATAYGGGTTTGCMCT GCTTCTAACGGTCTGTTTGTTCAGMCAATACATG
J (Bk)	Clavulina sp. HQ271352	CGGAAGGATCATTAAATGAGTTGTGATGGGGTTTGATGCTGGCAGCCAATTTTTGGATGCATGT GCTTGCCCTAACAAATCATCTTCCAAACACCTGTGCACATTTTTGAGGGAGTTTCGAGTTGATT GCCACTTTTGGGTGATTTTCTTGCATTCCCTTAAATCATTATACGCCATTGACAATGCTGAAC GTGCTCTGTGCCGCAAGGCCATTAATATAATACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCTCG CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGGGGAGCACGCCTGTTTCGAGTGTCACG AAATTTCTCAAGCTAGGATGGCTTTTTGTCTGTCTTAGCCTTGGTTGTTGGGCTTTGCCGTG TCCTTCATTGGGACGGCTGGCCTTAAAAGCATTAGCTGATCCTCGTGTGGCACTGGTTCTACT CAGCGTGATAACAGTCTGATCGCTGAGGACATCTTTTGGGATGGCCAGTCCTCATTGTTGGTTG CTTCTAACTTGGTTTCGCGGATTGTTCAATCTGCGTTCCACTTTTCAGCTTTGACCTCGAAT CAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
K (Bk)	Pezizaceae DQ974750	CGGAAGGATCATTATCGAAAGCTCTGGCTTTTGCTGTGCCTTGAACCCTTTGATGTATAAACC TTTGTTGCTTCCGTCGGCCGACGACACAAAACCTGCGGCATCGGCTGATGGAGGGTATTTGAGA ACTTTGGCTGTTTAAATGTTATTAGTCTGAAAGATTTGAGATGAAAACGCTCAAATAATAAAA CTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCCTGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTATGGTTATT CCGTAGGGCATGCCCCGTCTCAGCGTCAGAAGAAACCTCAGGCAAGGCTTTTAAATGCCATTCC TGGATTGTGTCAGAGTGGCAGCAGACCCGAGGTCAATTCTGCCCTTTGTAAAACCATGGATGTA TTGAAGATTTGTTTCATTCCAACGTGATAGAATATTTGATTCTGTTGGTATCAATTATCTGCAC ATACTTCCAAAAAAACCCACAAAATTGTTGACATATTTGACCTGAGATCGGGTAGGGATACCC GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

M (Bk)	Peziza sp. JX135041	GGAAGGATCATTATTGAAAACTATGTTAGTTTTTTATATCCCATTGTTTTATCTACCCTGTT GCTTCTACTGGACTGTTTTGCTTGGAGGTAAGATTTATAAACCTCTAGGCCAAAACCTCAGGCT TGTGTGAACCACACTTTCCAGAGAGCTGCCAGTAGCAAGACCACTTGCTAAAACCTGTTTGTG AAATATATAGTCTGAATTTTGTGTCTTGAAAATGAAATAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTAG GCTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGTGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCTCGTG AATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTATGGTATTCCATAGGGCATAACCTGTTTGAG CGTTAGCTCCCCATATTCTCAAGCATTATTTTGTAAATGCCTGGATTTGTTTGGAGAGGCACCT CTATCATGGAGGTACCCTTCAGAAATGTATATGGCAGTATAGTTTATATCTGAACCAGGCGTA ATAATAATAAAGTCGCTGAGTTTACCATATTTATACTTGCCCTGAACCCACCCATTGTTAAATC GGGTAACCTCAAATCAG
N (Bk)	Scleroderma areolatum EU819438	CGGAAGGATCATTATCGAAACAGAACGCCCCGGGGGAAAGGGGGAGCGCCGACGGCCCGAGAC TGTCGCCGGCCTCGCGCGCGCGCACGTCCCTCGCCGTCGCTCTTTCCGACCCTTCGAGGCTTT CGACCTTCTCAACACCTGTGCACCCGCTGTAGGTCCCTCGGGACCTACGTCTTTCTTCGAACC CGCATGTCTACAGAACGTATTCGTGCGCTCCCGGCCCTCGACCCTCAGGGTCCCGCGTCGGCGA CCGCAAAACCTATGATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG CAGCGAATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC ACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTTCATCGAAACCTCAGACCG ACCCTTCGACCCCGTCGGAGCTCGGTCTGGACTTGTGGGAGTCTGCGGGCGAAGCGTGACTTC GTCGGCTCTCCTCAAAGCATTAGCCGTGGGTGGCGAGCCTGGCATGGCACGGCCTCCTCGAC GTCGTAATGATCGTCTGTGGGCTGGAAGTGTACGGCTCGACGGACCCATGCTTCGCAAGTCTTG CGAGCCCGTCCCTCGCGGACGGCCGCGCCCCATCGAAGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
O (Bk)	Peziza sp. JX350041	CGGAAGGATCATTATTGAAAACTATGTTAGTTTTTTATATCCCATTGTTTTATCTACCCTGT TGCTTCTACTGGACTGTTTTGCTTGGAGGTAAGATTTATAAACCTCTAGGCCAAAACCTCAGGC TTGTGTGAACCACACTTTCCAGAGAGCTGCCAGTAGCAAGACCACTTGCTAAAACCTGTTTGT GAAATATATAGTCTGAATTTTGTGTCTTGAAAATGAAATAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTA GGCTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGTGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCTCGT GAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTATGGTATTCCATAGGGCATAACCTGTTTGA GCGTTAGCTCCCCATATTCTCAAGCATTATTTTGTAAATGCCTGGATTTGTTTGGAGAGGCACC TCTATCATGGAGGTACCCTTCAGAAATGTATATGGCAGTATAGTTTATATCTGAACCAGGCGT AATAATAATAAAGTCGCTGAGTTTACCATATTTATACTTGCCCTGAACCCACCCATTGTTAAAT CGGGTAACCTCAAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT

A (Db)	Tuber sp. AY634173	TCTTGATCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT CATTACCAATATCTGGGATGCCAAAGACACAGGCTCCCGATAAAACACATTTATGCGTATCCT CCCATGTTGCTTTCCCAGGCCAGCGGCCACTGCTGCCAGCCATGCCGTTTTTCGGTTACATGG TTGAGGTGCTTGGGGAAGGGCTAATTATCAAACCTTTACTTCACCTTATTGTCTGAGAAGGCCA TGTGCCGTAATCTTTAAACATGTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT TGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCGAAAAACCC AGATCACCTAGAGTGTGGTATTGGCAGAAGTGGTCGGGGCTATCAGGGCTGCTGCCACTCTGC TGGAATGAATAGGCTGGAAAAGTAGATCATAGCAACAGACTTTCACAGTATTTTGAAATGCTA AATTAGTTTGAAGCTGATCGGAACCTAAGCCATTTGACCCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAGG TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
B (Db)	Naucoria salicis FJ904180	AGGATCATTATTGAATGAAATTGGCGTGGTAGTCGCTGGCCCTCTCTGGGGGCATGTGCACGC CCGCCCATCCTCATCTCTTCTCCTGTGCACCTCTTGTAGGTTTGGATAGACATTTTTCTGAGG CAACTCAGTCGGGGGGAATGCTGTGCGCAAGCCGGCTTTCCTTGCGTTTTTCCAAGCCTATGT TTTTTCATATACCCAGTAGTATGTAACAGAATGTATTGTTGGGCGCTTGC GCCTATAAAGTTTA TACAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGG TATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTTCTCAACCTTTCATTAGCTTTTGCTG ATGAAATGGCTTGGATGTGGGGGTTTGCTGGCTTCGGTCGGCTCCCCTTAAATGCATTAGCTG GTGTACCCCATGGTGGACTTTTGGTGTGATAATTATCTACGCCATTTATTGTCTGCGACGGTG GTCTTTCACTGCTTCTAACCGTCCGTTCAATTCGGACAATTGAAATGACAATTTGACCTCAAAT CAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
C (Db)	Naucoria salicis FJ904180	GGATCATTATTGAATGAAATTGGCGTGGTAGTCGCTGGCCCTCTCTGGGGGCATGTGCACGCC CGCCATCCTCATCTCTTCTCCTGTGCACCTCTTGTAGGTTTGGATAGACATTTTTCTGAGGCA ACTCAGTCGGGGGGAATGCTGTGCGCAAGCCGGCTTTCCTTGCGTTTTTCCAAGCCTATGTTT TTCATATACCCAGTAGTATGTAACAGAATGTATTGTTGGGCGCTTGC GCCTATAAAGTTTATA CAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTA TTCCGAGGAGCATGCCTGT

D (Db)	<i>Inocybe curviceps</i> AM882813	AGGATCATTATTGAATAAACTTGATCAGGTTGTTGCTGGCTCCCCGAGCATGTGCACACTTG TCATCTTTACTTCTCCCCACTGTGCACATATTGTAGGCCTGGAATTCTTGTGATTATTTTGTAT TAGATTGAGGACTGCTGTGCTTTAGCCAGCTTTTCCTTGCATTTCCAGGTCTATGTTTACCTT CACAACTCTGAATATGTTTAGAATGTTGGAATATAATATATATATACTTTTCAGCAACGG ATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC TGTTTGAGTGTCAATCTCTCAACTACATCAATCTTTCTGGTTTGGTGTAGCCTTTGGATG TGGGGGTTTTATTTTGTGCTGGCCTCTATTAAACGAGGTCAGCTCCCCTGAAATTTATTAGCGGT ATCTGAGCAGAGACCTACTACAGGTGTGATAAATTATCTATGCCTTGGTAATGCTGCATCAAC AGATTGTGCTGCTTCCAGTGAATCATTTGACAAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCG CTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
E (Db)	<i>Inocybe curviceps</i> JN035289	GGATCATTATTGAATAAACTTGATCAGGTTGTTGCTGGCTCCCCGAGCATGTGCACACTTGT CATCTTTACTTCTCCCCACTGTGCACATATTGTAGGCCTGGAATTCTTGTGATTATTTTGTAT AGATTGAGGACTGCTGTGCTTTAGCCAGCTTTTCCTTGCATTTCTTGGTCTATGTTTACCTTC ACAACCTCTGAATATGTTTAGAATGTTGGAATATAATATATATATACTTTTCAGCAACGGA TCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCT GTA
F (Db)	<i>Helotiales</i> sp. JF273525	GGATCATTACCGAGTTCATGCCCTTACGGGTAGACCTCCCACCCTATGTTATATTACCTTTGT TGCTTTGGCGGGCCGCCCGGCTTCGGCCAGGCTACCGGCTCCAGCTGGTAAGCGCTCGCCAGA GGACCCCCAACTCTGAATATCAGTGTCTGTCGAGTACTATAAAATAGTTAAACCTTTCAACAA CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC AGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT GCCTGTA
G (Db)	<i>Naucoria salicis</i> FJ904180	GGATCATTATTGAATGAAATTGGCGTGGTAGTCGCTGGCCCTCTCTGGGGGCATGTGCACGCC CGCCCATCCTCATCTCTTCTCCTGTGCACCTCTTGTAGGTTTGGATAGACATTTTTCTGAGGC AACTCAGTCGGGGGGAATGCTGTGCGCAAGCCGGCTTTCTTGCCTTTTCCAAGCCTATGTT TTTCATATACCCAGTAGTATGTAACAGAATGTATTGTTGGGCGCTTGCGCCTATAAAGTTTAT ACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGT ATTCCGAGGAGCATGCCTGTA

H (Db)	Tuber sp. KF742730	GCGGAAGGATCATTACAAATGACTGGGATGTCCTATCGGACCCCCAAGCAAACACATCTATGT GTACTCTGCCATGTTGCTTCCCCAGACCAGTGGCCACTGCTGCCAGCCCAGCCCCTAATGGGT TCCTGGGTTGAGGTGTCTGGGGAAGGGCTCAATATCAAACCTTTTCAACCCACTAGTCGTCTGA GAAGGCCATGTGCCGCAATATTTAAACAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTC GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAC TAAAAACCGACTCACATATCGTGTGGTATTGGTAGAAGTGGATAGTACTAACACTACTTTGTC TTACTCTGCTGAAATGAATAGGCCAGAAAAGTGGACCATGGTAATAGATTCCAGGAGTGTTTT AAAATGCTATACTAGTCTTATCCAAGTCATATTCTGAGCCACTGGACCCCCCATTTAGTCCAA ACAACAGTGGTTGACCTCGGATCA
I (Db)	Helotiales sp. GQ240930	GGATCATTAAAGAATTTGCCCCGTCTCTCGAGGATGGGTCCTCTTCTAAACCGTGTATACAT ACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGTCTCGGCGTTGGCTTCGGCTGACTGTGCCCGCCAGAG AACCCCAACTCTTCTGTTTTAGTATTGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAACTTTCAACAACG GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG AATTCAGTGAATCATCGAATCTTKGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGC CTGTAA
J (Db)	Scleroderma areolatum EU819438	GGATCATTATCGAAACAGAACGCCCCGGGGGAAAGGGGGAGCGCCGACGGCCCGAGACTGTCTG CCGGCCTCGCGCGCGTGCACGTCCCTCGCCGTCGCTCTTTTCCGACCCTTCGAGGCTTTCGAC CTTCTCAACACCTGTGCACCCGCTGTAGGTCTTCGGGACCTACGTCTTTCTTCGAACCCGCA TGTCTACAGAACGTATTTCGTGCGTCCCGGCCTCGACCCTCAGGGTCCCGCGTCCGGCAGCCG AAAACCTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC GAATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCT TGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATCGAAACCTCAGACCGACCC TTCGACCCCGTCGGAGCTCGGTCTGGACTTGTGGGAGTCTGCGGGCGAAGCGTGACTTCGTCG GCTCTCCTCAAAAGCATTAGCCGTGGGTGGCGAGCCTGGCATGGCACGGCCCTCTCGACGTCG TAATGATCGTCGTGGGCTGGAAGTGTACGGCTCGACGGACCCATGCTTCGCAAGTCTTGCGAG CCCGTCCCTCGCGGACGGCCGCGCCCCATCGAAGCTTGACCTCAAAT

K (Db)	Scleroderma areolatum EU819438	GGATCATTATCGAAACAGAACGCCCGGGGGGAAAGGGGGAGCGCCGTCGGCCCCGAGACTGTGCG CCGGCCTCGCGCGCGTGCACGTCCCTCGCCGTCGCTCTTTCCGACCCTTCGAGGCTTTTCGACC TTCTCAACACCTGTGCACCCGCTGTAGGTCTTTCGGGACCTACGTCTTTCTTCGAACCCGCAT GTCTACAGAACGTATTCGTTCGCGTCCCGGCCCTCGACCCTCAGGGTCCCGCGTCGGCGACCGCA AAACCTATKATACAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG AATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTT GCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTTCATCGAAACCTCAGACCGACCCT TCGACCCCGTCGGAGCTCGGTCTGGACTTGTGGGAGTCTGCGGGCGAAGCGTGAATTCGTTCGG CTCTCCTCAAAAGCATTAGCCGTGGGTGGCGAGCCTGGCATGGCACGGCCTCCTCGACGTCGT AATGATCGTCGTGGGCTGGAAGTGTACGGCTCGACGGACCCATGCTTCGCAAGTCTTGCGAGC CCGTCCCTCGCGGACGGCCGCGCCCCATCGAAGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGC TGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGG
L (Db)	Laccaria sp. AJ534899	GGATCATTATTGAATAAACCTGATGTGGCTGTTAGCTGGCTTTTCGAAGCATGTGCTCGCCCG TCATCTTTATCTCTCCACCTGTGCACATTTTGTAGTCTTTCGATATCTCTCGAGGCAACTCGG ATTTTAGAATCGTCGTGCTGTACAAGTCGGCTTTTCTTTCCCTTTCCAAGACTATGTTTTTATA TACACCAAAGTATGTTTAAAGAATGTCATCAATAGGAACTTGTTTTCTATAAAATCATAACAAC TTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCC GAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTAATTTCTCAACCTTCCAACCTTTTATTAGCTTGGTTA GGCTTGGATGTGGGGGTGTGGGCTTCATTAATGAGGTGCACTCTCCTTAAATGCATTAGCGG AACTTTTGTGGACCGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGATGTGAAGCAACTTTAT GAAGTTCAGCTTCTAAACCGTCCATTAATTTGGACAATTTTGAAAATTTGACCTCAAATCAGG TAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
L (Db)	Peziza sp. JX135041	GGATCATTATTGAAAACTATGTTAGTTTTTTATATCCCATTTGTTTTATCTACCCTGTTGCTT CTACTGGACTGTTTTGCTTGGAGGTAAGATTTATAAACCTCTAGGCAAAACCTCAGGCTTGTG TGAACCACACTTTCCAGAGAGCTGCCAGTAGCAAGACCACTTGCTAAAACCTGTTTGTGAAAT ATATAGTCTGAATTTTGTGTCTTGAAAATGAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTAGGCTC TTGCATCGATGAAGAACGCAGTGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCTCGTGAATC ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTATGGTATTCATAGGGCATACTGTTTGTAGCGTT AGCTCCCCATATTCTCAAGCATTATTTTGTAAATGCCTGGATTTGTTTGGAGAGGCACCTCTAT CATGGAGGTACCCTTCAGAAATGTATATGGCAGTATAGTTTATATCTGAACCAGGCGTAATAA TAATAAAGTCGCTGAGTTTACCATATTTATACTTGCCCTGAACCCACCCATTGTTAAATCGGGT AACCTCAAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

M (Db)	Peziza sp. JX135041	GGATCATTATTGAAAACTATCTTAGTTTTTTTACATCCCATTGTTTTATCTACCCTGTTGCTT CTACTGGACTGTTTTTGCTTGGAGGTAAGATTTATGAACCTCTAGGTAAACCTCAGGCTTGT GTGAACCACACTTTCCAGAGAGCTGCCAGTAGCAAGACCACTTGCTAAACCTGTTGTGAAAT ATATAGTCTGAATTTTGTGTCTTGAAAATAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTAGGCTC TTGCATCGATGAAGAACGCAGTGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCTCGTGAATC ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTATGGTATTCCATAGGGCATAACCTGTTTGAGCGTT AGCTCCCCATATTCTCAGGCATTATTTTTTTATAATGCCTGGATTTGTTTGGAGAGGCACCTCT ATCATAGAGGTACCCTTCAGAAATGTATATGGCAGTATAGTTTATATCTGAACCAGGCGTAAT AATAATAAAGTCGCTGAGTTTACCATATTTATACTTGCCTGAACCCACCCATTGTTAAATCGG GTAACCTCAAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
--------	------------------------	--

ZAŁĄCZNIK 2.

Ankieta stanu zagrożenia fitopatologicznego szkółki leśnej

Ankieta adresowana jest do osób bezpośrednio zaangażowanych w nadzór nad produkcją szkółkarską w Nadleśnictwie.
Celem ankiety jest określenie czynników mogących mieć związek z nasileniem lub ograniczeniem występowania patogenów grzybowych zakłócających produkcję szkółkarską.

1. Dane dotyczące lokalizacji

Proszę uzupełnić informacje w odpowiednich polach.

Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych

Nadleśnictwo

Leśnictwo

Oddział leśny

Rok utworzenia szkółki

2. Sposób użytkowania terenu przed utworzeniem szkółki

Proszę zaznaczyć odpowiednie pole i uzupełnić brakujące informacje.

☐ Grunt leśny pod drzewostanem

Typ gleby

Rodzaj gleby

Typ siedliskowy lasu

Skład gatunkowy i wiek usuniętego drzewostanu

.....
.....

☐ Grunt rolny

Typ gleby

Rodzaj gleby

Bonitacja gleby

Dominująca produkcja rolna poprzedzająca założenie szkółki

.....

☐ Inny

Jaki?

.....
.....
.....

Typ gleby

Rodzaj gleby

Bonitacja gleby (jeśli znana)

3. Podstawowa charakterystyka szkółki leśnej

Proszę zaznaczyć odpowiednie pola i uzupełnić brakujące informacje.

3.1. Rodzaj i powierzchnia szkółki

- ☐ Otwarta
 - ☐ Scalona
 - ☐ Zespólona
- ☐ Podokapowa
- ☐ Kontenerowa

Powierzchnia całkowita szkółki leśnej

Powierzchnia produkcyjna szkółki leśnej.....

Przeciętna powierzchnia pojedynczej kwatery

3.2. Rodzaj zastosowanej irygacji oraz wykorzystywane źródła wody

- ☐ Deszczownia stała
- ☐ Deszczownia przenośna
- ☐ Brak deszczowni
- ☐ Studnia głębinowa
 - ☐ Woda magazynowana w zbiorniku zamkniętym
 - ☐ Woda magazynowana w zbiorniku otwartym
 - ☐ Woda użytkowana bezpośrednio z ujęcia
- ☐ Ciek wodny
- ☐ Zbiornik wodny

3.3. Informacje o rodzaju i wielkości produkcji materiału sadzeniowego

Roczny rozmiar produkcji

Dominująca produkcja w ciągu ostatnich lat

Gatunek	Typ produkcyjny sadzonki	Wielkość produkcji	Udział w ogólnej produkcji

4. Informacje o stosowanym nawożeniu i płodozmianie

Proszę zaznaczyć odpowiednie pola i uzupełnić brakujące informacje.

4.1. Nawożenie

Czy w ostatnich latach stwierdzano na szkółce istotne niedobory podstawowych składników pokarmowych w glebie (podłożu produkcyjnym)? Jeśli tak, to których pierwiastków dotyczyły?

☐ Tak ☐ Nie

.....
Czy w ostatnich latach stwierdzano na szkółce istotne nadmiary podstawowych składników pokarmowych glebie(podłożu produkcyjnym)? Jeśli tak, to których pierwiastków dotyczyły?

☐ Tak ☐ Nie

.....
Przeciętny odczyn gleby w szkółce wynosi pH (w H₂O)pH (w KCl)

Czy stosowano (jeśli dotyczy) w ostatnich latach alkalizację gleby (podłoża produkcyjnego)? Jeśli tak, to o jaką wartość pH zmienił się odczyn gleby w stosunku do wartości początkowej? Jaka substancja była czynnikiem odkwaszającym?

☐ Tak ☐ Nie

.....
Czy stosowano (jeśli dotyczy) w ostatnich latach zakwaszanie gleby (podłoża produkcyjnego)? Jeśli tak, to o jaką wartość pH zmienił się odczyn gleby w stosunku do wartości początkowej? Jaka substancja była czynnikiem zakwaszającym?

☐ Tak ☐ Nie

.....
Rodzaj stosowanych nawozów organicznych (jeśli dotyczy)z podaniem w miarę możliwości: stosunku C/N, zasobności nawozu w podstawowe składniki pokarmowe, pH, składników nawozu (kompostu), dawki na 1 ha oraz częstotliwości stosowania.

1.

2.

3.

Czy stosowano (jeśli dotyczy) w ostatnich latach nawożenie zielone z użyciem gatunków roślin o właściwościach fitosanitarnych? Jeśli tak, to jakie gatunki stosowano?

☐ Tak ☐ Nie

4.2. Płodozmian

Proszę o odpowiednie uzupełnienie poniższego schematu, zgodnie ze stosowanym w szkółce płodozmianem (jeśli dotyczy).

Pole płodozmianu

	I	II	III	IV	V
1 rok					
2 rok					
3 rok					
4 rok					
5 rok					

5. Informacje o problemach fitopatologicznych stwierdzonych podczas produkcji szkółkarskiej

Proszę zaznaczyć odpowiednie pola i uzupełnić brakujące informacje

5.1. Skala problemu (subiektywna ocena wypełniającego ankietę)

- ☐ Bardzo duża
- ☐ Duża
- ☐ Średnia
- ☐ Mała
- ☐ Brak

5.2. Straty w produkcji spowodowane infekcjami patogenów grzybowych oraz stosowane zabiegi i ich skuteczność

Gatunek	Typ produkcyjny sadzonki	Wielkość strat w produkcji [%]	Patogen (jeśli stwierdzono)	Zastosowane fungicydy	Skuteczność zabiegu (duża, średnia, mała, brak)

6. Obserwacje osoby nadzorującej szkółkę leśną dotyczące związku stosowanej agrotechniki (włącznie z zabiegami, które nie zostały ujęte w ankiecie) z nasileniem lub ograniczeniem występowania patogenów grzybowych.

.....

.....

.....

.....

.....

**„ZINTEGROWANA OCHRONA SZKÓŁEK PRZED NOWYMI, INWAZYJNYMI PATOGENAMI
W WARUNKACH OGRANICZONEGO WYBORU FUNGICYDÓW”**

Wprowadzenie

W latach 2011-2013 w Zakładzie Ochrony Lasu IBL, na zlecenie Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych realizowano temat badawczy, którego głównym celem było poszukiwanie alternatywnych (do chemicznych) metod ochrony materiału szkółkarskiego w sytuacji niedoboru na rynku fungicydów. Zakres badań obejmował działania dotyczące:

1. profilaktyki, zmierzającej do podniesienia naturalnej odporności roślin (analiza stosowanych obecnie metod profilaktycznych – badanie ankietowe w szkółkach leśnych; testy polowe stymulatorów wzrostu i ocena ich skuteczności),
2. identyfikacji patogena, określenia stopnia i skali uszkodzenia oraz potencjalnych uszkodzeń i strat, jako elementów procesu decyzyjnego poprzedzającego zabiegi ratownicze (identyfikacja patogena na podstawie analiz DNA; testy patogeniczności wybranych mikroorganizmów chorobotwórczych).

Integrowana ochrona roślin to sposób ochrony roślin przed organizmami szkodliwymi, polegający na wykorzystaniu wszystkich dostępnych metod ochrony roślin, w szczególności metod niechemicznych, w celu zminimalizowania zagrożenia dla zdrowia ludzi, zwierząt oraz dla środowiska.

WNIOSKI Z BADAŃ

Działania z zakresu profilaktyki:

1. Rany powstające przy zabiegu mechanicznego podcinania systemów korzeniowych stanowią otwarte drogi infekcji dla patogenicznych organizmów, które są przyczyną wielu chorób sadzonek. Poza tym prowadzą do dużych dysproporcji w wielkości pomiędzy rozbudowanymi pędami i pozostałymi po cięciu korzeniami.

2. Zastosowanie gryki jako przedplonu wpływa korzystnie na grubość szyi korzeniowej oraz na ilość drobnych korzeni u siewek dębu.
3. Stosowanie stymulatorów wzrostu opartych na bazie Efektywnych Mikroorganizmów (EM) negatywnie wpływa na stan badanych sadzonek, ograniczając liczbę mykoryz i powodując wzrost udziału mykoryz martwych. Sadzonki potraktowane preparatem EM tworzą głównie związki mykoryzowe z grzybami z rodzaju *Hebeloma sacchariolens*.
4. Zastosowanie stymulatorów wzrostu mających w składzie fosforyn amonu (preparat Actifos) zabezpiecza systemy korzeniowe sadzonek dębu przed infekcją patogenami z rodzaju *Phytophthora* m.in. *P. quercina*. W ponad 60% analizowanych przypadków, zastosowanie preparatu Actifos, wpłynęło na zwiększenie przyrostu części nadziemnej sadzonek dębu, buka oraz olszy, a także korzeni olszy i dębu. Stosowane preparaty fosforynowe (Actifos i Busz Forte) nie mają wpływu na stan ilościowy mykoryz badanych sadzonek, natomiast powodują wzrost liczby mykoryz żywych.

Działania z zakresu identyfikacji i oceny szkód powodowanych przez patogeny:

1. Precyzyjne wykrywanie patogenów w szkółkach leśnych oraz ich identyfikacja na poziomie gatunku (np. powszechnie występujących gatunków z rodzaju *Phytophthora*) jest ważnym elementem procesu decyzyjnego w ramach integrowanej ochrony roślin.
2. Do identyfikacji patogenów obecnych w strefie korzeniowej (ryzosferze) lub tkankach roślin w szkółkach leśnych, szczególnie przydatne są analizy na poziomie DNA za pomocą sond genetycznych. Takie sondy zaprojektowano dla 8 najczęściej występujących w glebie patogenów z rodzaju *Phytophthora*: *P. alni*, *P. cactorum*, *P. plurivora*, *P. lacustris*, *P. hungarica*, *P. megasperma*, *P. quercina*, *P. pseudosyringae*.
3. Obecność w tkankach roślin patogenu *Phytophthora quercina*, nie daje widocznych symptomów chorobowych w krótkim czasie od infekcji. Patogen ten nie powoduje też śmiertelności jednorocznych sadzonek dębu, a jedynie zmniejsza długość i powierzchnię ich systemów korzeniowych; zarówno głównych jak i korzeni drobnych. Obecność *P. quercina* stwierdzono także w kilka miesięcy po jego wprowadzeniu do substratu szkółkarskiego. Oznacza to, iż zainfekowana gleba może być źródłem choroby, a patogen może być przenoszony ze szkółek na uprawy wraz z bryłą korzeniową oraz w tkankach chorych roślin.

WYTYCZNE DLA PRAKTYKI

W celu zwiększenia naturalnej odporności roślin w szkółkach leśnych zaleca się:

- objęcie dużych szkółek wielkoobszarowych, które prowadzą wymianę materiału roślinnego pomiędzy sobą (i/lub szkółkami roślin ozdobnych) specjalnym monitoringiem fitopatologicznym prowadzonym przez Zespoły Ochrony Lasu wspólnie z IBL co pozwoli na zminimalizowanie ryzyka wystąpienia i rozprzestrzeniania chorób grzybowych,
- stworzenie warunków ograniczających występowanie patogenów w szkółkach poprzez ich zakładanie na glebach o zawartości składników pokarmowych optymalnej dla hodowanych gatunków lasotwórczych. Celowym jest okresowe wykonywanie analiz fizyko-chemicznych próbek gleb, w tym badanie odczynu kwasowości,
- poprawienie warunków fizycznych gleb: np. zwiększenie ich przewiewności poprzez stosowanie zabiegów agrotechnicznych, takich jak spulchnianie oraz głęboszowanie co zmniejsza ryzyko wystąpienia infekcji grzybowych,
- okresowe stosowanie nawozów zielonych (gryka, gorczyca) w celu ograniczenia procesów infekcji korzeni sadzonek. Jednak, nie zaleca się stosowania nawożenia zielonego bezpośrednio w roku poprzedzającym siew gatunków iglastych, ponieważ istnieje ryzyko zwiększenia stopnia zagrożenia fitopatologicznego,
- stosowanie nawozu Actifos (na bazie fosforu amonowego), który stymuluje wzrost roślin, zmniejsza uszkodzenia drobnych korzeni powodowanych przez patogeny z rodzaju *Phytophthora* oraz zwiększa udział korzeni żywych w ryzosferze sadzonek,
- krótszą hodowlę sadzonek dębu w szkółkach połączoną ze stosowaniem stymulatorów wzrostu, które korzystnie wpływają na rozwój masy korzeni i części nadziemnej. Natomiast nie zaleca się wykonywania zabiegu podcinania korzeni sadzonek dębu ze względu na powstawanie ran, które sprzyjają infekcjom patogenów,
- odkażanie butów przy wejściu i wyjściu ze szkółki poprzez przechodzenie przez sterylizujące maty oraz odkażanie narzędzi wykorzystywanych do pracy na różnych kwaterach (na których obserwuje się chore siewki). Postępowanie takie znacząco ogranicza możliwość zawleczenia na szkółki nowych patogenów lub roznoszenia ich po kwaterach. Tego typu zalecenia stosuje się obecnie w wielu ogrodach botanicznych lub uprawach szkółkarskich w różnych krajach, np. w Wielkiej Brytanii, Irlandii i Włoszech,

- przedśiewne podkiełkowanie nasion gatunków iglastych oraz przykrywanie siewów jałowym piaskiem, bądź włókniną w celu uzyskania szybkich i równomiernych wschodów oraz zmniejszenia zagrożenia ze strony patogenów grzybowych.
- unikanie sadzenia w pasach przeciwwietrznych roślin ozdobnych (rózaneczników, roślin wrzosowatych, cyprysików), które są szczególnie podatne na infekcje ze strony wielu patogenicznych gatunków z rodzaju *Phytophthora* i mogą stanowić źródło infekcji.

W celu identyfikacji patogena w szkółkach leśnych zaleca się:

- pobranie fragmentów chorych tkanek, próbek gleby i/lub wody, a następnie przesłanie ich do Zakładu Ochrony Lasu IBL w celu wykonania specjalistycznych analiz fitopatologicznych oraz genetycznych. Fragmenty tkanek z chorych roślin należy owinać w wilgotny ręcznik papierowy oraz folię natomiast glebę należy pobrać w kilku punktach kwatery, zmieszać i utworzyć próbkę zbiorczą o wadze 0,5 kg, którą najlepiej włożyć do plastikowej torebki z opisem miejsca pobrania. Wodę ze zbiorników lub cieków wodnych należy pobrać w objętości ok. 1,5 l tuż spod powierzchni lustra wody do czystej butelki plastikowej. Tak przygotowane próbki należy niezwłocznie przesłać do ZOL IBL wraz z dokładnym opisem symptomów, daty obserwacji, sposobu pobrania i przechowania materiału. W przypadku braku możliwości natychmiastowej wysyłki, próbki należy przechowywać w temperaturze +4°C (lodówka, chłodnia). Dobór odpowiedniej strategii postępowania wynika z prawidłowo oznaczonego sprawcy choroby,
- w sytuacjach potwierdzenia w glebie obcych, inwazyjnych organizmów podjęcie ich zwalczania za pomocą wszelkich dostępnych środków (wymienionych i aktualizowanych każdego roku na stronie w wykazie „Środków Ochrony Roślin” oraz zalecanych w zastosowaniach małoobszarowych). Pełny wykaz fungicydów dostępny jest na stronach:

- Lasów Państwowych www.lasy.gov.pl

- Instytutu Badawczego Leśnictwa www.ibles.pl

W celu uzyskania sadzonek wolnych od patogenów oprócz zaprawiania nasion, zaleca się odkażanie podłoża np. parą wodną oraz oczyszczanie wody używanej do ich podlewania (filtrowanie mechaniczne lub biologiczne).