INSTYTUT BADAWCZY LEŚNICTWA

# Zakład Ekologii Lasu

Symbole: UKD 630\*2

PKT 60.27.00

LKO 29; 181.351

**Możliwości ochrony i restytucji trufli letniej (*Tuber aestivum* Vitt.)**

**w lasach Polski**

Sprawozdanie końcowe w temacie BLP-368

Okres realizacji tematu: 23.02.2011 – 31.12.2013 r.

**Główny autor:** dr hab. Dorota Hilszczańska

**Współautorzy i wykonawcy (alfabetycznie):**

dr inż. Andrzej Boczoń, mgr inż. Marek Pudełko, mgr inż. Aleksandra Rosa-Gruszecka,

Lidia Śmierzyńska, mgr inż. Michał Wróbel

Kierownik Zakładu Dyrektor Instytutu

Sękocin Stary, grudzień 2013 r.

SPIS TREŚCI

[**1. Wstęp** 2](#_Toc374106307)

[**2. Cel badań**](#_Toc374106308) 4

[**3. Materiał i metody**](#_Toc374106309) 4

[3.1. Ocena parametrów fizyko-chemicznych gleb w naturalnych stanowiskach trufli letniej oraz w uprawach truflowych](#_Toc374106310) 4

[3.2. Ocena przeżywalności sadzonek i wielkości parametrów biometrycznych](#_Toc374106311) 5

[3.3. Ocena stanu mykoryz u dębu i leszczyny rosnących w uprawach trufli letniej i analizy genetyczne](#_Toc374106312) 5

[3.4. Inokulacja sadzonek zarodnikami *T. aestivum* Vitt. (trufli letniej) i hodowla w warunkach szklarniowych](#_Toc374106313) 6

[3.5. Analizy wilgotności i temperatury gleby](#_Toc374106314) 7

[3.6. Poszukiwanie nowych stanowisk występowania *Tuber* spp. i ocena plonowania trufli letniej w drzewostanach](#_Toc374106315) 7

3.7. Analiza statystyczna wyników………………………………………………………..8

[**4. Wyniki**](#_Toc374106316) 8

[4.1. Ocena parametrów fizyko-chemicznych gleb w naturalnych stanowiskach trufli letniej oraz w uprawach truflowych](#_Toc374106317) 8

[4.2. Ocena przeżywalności sadzonek i parametrów biometrycznych sadzonek](#_Toc374106318) 12

[4.3. Ocena stanu mykoryz u dębu i leszczyny rosnących w uprawach trufli letniej i genetyczne analizy pokrewieństwa polskich i europejskich *Tuber* spp.. 1](#_Toc374106319)3

[4.4. Ocena mykoryz u inokulowanych sadzonek hodowanych w warunkach szklarniowych wysadzonych na uprawie w Michałowie](#_Toc374106320) 20

[4.5. Analizy wilgotności i temperatury gleby 21](#_Toc374106321)

4.6. Ocena plonowania trufli letniej w drzewostanach…………………………………24

[**5. Dyskusja**](#_Toc374106322) 27

[**6. Podsumowanie i wnioski**](#_Toc374106323) 31

[**Literatura**](#_Toc374106324) 32

[Załączniki: (Instrukcja zakładania upraw truflowych)](#_Toc374106325)

1. **Wstęp**

Trufle (*Tuber* spp.*)* należą do grzybów workowych (*Ascomycota*) charakteryzujących się podziemnym (hypogeicznym) trybem życia (owocniki zwykle tworzą się w glebie na głębokości ok. 10-20 cm). Tworzą mykoryzę - symbiozę o charakterze mutualistycznym z wieloma gatunkami drzew i krzewów leśnych, m.in. dębem, bukiem, lipą, grabem, leszczyną. Rozwój mikoryz trufli jest regulowany przez temperaturę, wilgotność oraz składniki chemiczne gleby o odpowiedniej przepuszczalności. Warunki sprzyjające dla rozwoju wymieniony grzyb znajduje zarówno w glebach piaszczystych, jak i podmokłych, jednakże zasobnych w węglan wapnia, o niskiej zawartości azotu, fosforu i żelaza, a bogatych w potas i siarkę, o odczynie między 7-8 pH (Pacioni i Comandini, 1999).

Wśród gatunków trufli najwyżej cenione pod względem zapachowym i smakowym są trufla biała (*Tuber magnatum*) i trufla czarna (*T. melanosporum*) (Mello i in. 2006), występujące głównie we Włoszech, Francji i Hiszpanii. Trufla letnia (*T. aestivum*), chociaż ma nieco mniejsze walory od dwóch wymienionych gatunków, ma tę nad nimi przewagę, że owocnikuje równie dobrze w chłodnym, jak i ciepłym klimacie. Występuje od Portugalii i Wielkiej Brytanii przez Bułgarię i Włochy na południu, po kraje bałtyckie na wschodzie Europy. Dania i Gotlandia pozostają jak dotąd najdalej wysuniętymi na północ stanowiskami występowania tego gatunku (Pegler i in., 1993; Chevalier, 2009; Marjanovic i in., 2009). W Polsce owocniki *T. aestivum* stwierdzono w 2007 r. w drzewostanach grabowo-dębowych w regionie Niecki Nidziańskiej (Hilszczańska i in., 2008). Nie wyklucza się (Hilszczańska i in., 2013), że owocniki tego grzyba występują tak licznie, jak owocniki *Boletus,* ale z uwagi na podziemny rozwój grzyba oraz brak w Polsce tradycji kulinarnych związanych z truflą, są gatunkiem „przeoczonym”.

Liczba potwierdzonych stanowisk trufli jest w Polsce wciąż niewielka, jednak w okresie minionych 5. lat znacząco wzrosła (Hilszczańska i in., 2008, 2013a; Ławrynowicz i in., 2008; Rosa-Gruszecka i in., 2014), głównie dzięki realizacji projektów badawczych związanych z ochroną i promocją tych cennych grzybów. Znane stanowiska trufli zlokalizowane głównie w terenach, gdzie występują rędziny czy pararędziny, gleby wytworzone na gipsach lub dolomitach, charakteryzujące się wysokim odczynem podłoża (od 7 do 8 pH) i zasobne w wapń.

Jak podają Hall i współautorzy (1994, 1998, 2007) owocnikowaniu trufli nie sprzyjają lasy o zwartej strukturze, z małym dostępem światła. Trufle nie rosną dobrze w warunkach gęstej roślinności runa. W Polsce trufla letnia najlepsze warunki do owocnikowania znajduje w drzewostanach mieszanych, zwłaszcza jeśli ich wiek nie przekracza 30 lat, na siedliskach lasów grądowych, buczyn i świetlistych dąbrów. W starszych drzewostanach również trufla występuje, lecz liczba wykrytych owocników jest znacznie mniejsza (Hilszczańska i in., dane niepublikowane). W składzie roślinności runa na stanowiskach trufli letniej często występują storczyki, tj. *Cephalanthera* spp., *Epipactis* spp. czy *Cipripedium calceolus*. Gatunki te tworzą również symbiozę mykoryzową z grzybami *Tuber* spp. (Selosse i in. 2004).

Negatywny wpływ na rozwój trufli, a więc i na zmniejszenie zbioru owocników w naturalnych drzewostanach, obserwowany szczególnie w krajach śródziemnomorskich w minionym stuleciu (Callot,1999), mają czynniki ekologiczne i socjalne. Zaprzestanie zbierania drewna na opał, związane z migracją ludności wiejskiej do miast w latach 60. ubiegłego wieku, spowodowało znaczne ocienienie dna lasu. Tradycyjny wypas zwierząt zapewniający prześwietlenie drzewostanu (warunki dogodne dla rozwoju trufli) również został porzucony (Reyna, 2007). Zastępowanie drzewostanów dębowych szybko rosnącymi gatunkami iglastymi było kolejnym czynnikiem niekorzystnym dla grzybów z rodzaju *Tuber*. Do zniszczenia wielu stanowisk trufli mogło się przyczynić nieumiejętne ich zbieranie, np. wykopywanie nieodpowiednimi narzędziami owocników, które nie osiągnęły stadium dojrzałości (Estrada i Alcántara, 1990).

W celu przeciwdziałania dalszemu spadkowi plonu trufli oraz propagowaniu rozwiązań związanych z innym, niż tradycyjne, zagospodarowaniem terenów niewykorzystywanych pod uprawy rolnicze, coraz powszechniejsze staje się promowanie zakładania ogrodów truflowych. Związane jest to z wykorzystaniem inokulum w postaci „europejskich”, rodzimych gatunków trufli w krajach, jak dotąd niezwiązanych z tradycyjną uprawą trufli. Jako przykład może posłużyć Szwecja, gdzie w 1997 r. na Gotlandii i Olandii założono pierwsze ogrody truflowe, przynoszące obecnie plon. Jako inokulum do zaszczepienia sadzonek dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i leszczyny pospolitej (*Corylus avellana* L.) użyto rodzimych i francuskich owocników *T. aestivum* (Weden i in., 2001, 2009).

Zakładanie plantacji truflowych w warunkach Polski jest stosunkowo nowym przedsięwzięciem naukowo-gospodarczym, które wpisuje się w coraz bardziej popularyzowany na świecie kierunek „agroforestry”. Taka koncepcja zagospodarowania przestrzeni okazuje się niejednokrotnie o wiele bardziej korzystna (w niektórych regionach), niż konwencjonalne rolnictwo lub leśnictwo. Biorąc pod uwagę przykłady z zagranicy, m.in. Węgier, Francji, Włoch i Hiszpanii, można zauważyć, że ten sposób zagospodarowania stymuluje rozwój ekonomiczny, jaki i społeczny, szczególnie małych wiejskich społeczności (Samils, 2002).

Tworzenie upraw truflowych - oprócz znaczenia ekonomicznego niesie ze sobą również cenny aspekt dla ochrony przyrody. Dla przykładu, wprowadzane do tych upraw gatunki dębu *Quercus robur i Q. petrea* należą do drzew, z którymi związana jest duża liczba innych organizmów, wiele gatunków mchów, porostów, grzybów i bezkręgowców, a liczbę gatunków, które żyją tylko i wyłącznie w powiązaniu z dębem, szacuje się od 800 do 1000 (Gärdenfors, 1994).

1. **Cel badań**

Celem badań było określenie uwarunkowań oraz możliwości ochrony i restytucji trufli letniej (*Tuber aestivum* Vitt), gatunku umieszczonego na Czerwonej Liście (Wojewoda i Ławrynowicz, 2006) o statusie zagrożonego lub bardzo rzadkiego. Cel ten realizowano poprzez poznanie zmienności środowiskowej i gatunkowej grzybów rodzaju *Tuber* w Polsce oraz struktury mykoryz u sadzonek dębu szypułkowego (*Quercus robur*) i leszczyny pospolitej (*Corylus avellana*) rosnących na dwóch plantacjach trufli letniej. Dodatkowym, wymiernym efektem zadań realizowanych w ramach projektu jest opracowana „Instrukcja zakładania upraw truflowych”, stanowiąca załącznik niniejszego sprawozdania.

1. **Materiał i metody**
   1. Ocena parametrów fizyko-chemicznych gleb w naturalnych stanowiskach trufli letniej oraz w uprawach truflowych

Badania prowadzono w Nadleśnictwie Pińczów w dojrzałych drzewostanach mieszanych (w dwóch lokalizacjach oznaczonych jako SA i M) oraz w dwóch „ogrodach truflowych” w Michałowie i Chełmie, założonych na terenie Nadl. Pińczów, RDLP Radom i Nadl. Chełm, RDLP Lublin. Od września 2011 do października 2013 w wybranych drzewostanach prowadzono poszukiwania owocników trufli. Ze stanowisk, na których stwierdzono owocniki *Tuber* spp., pobrano próbki gleby do analiz.

Badano także chemizm gleb w plantacjach truflowych. Analizę zawartości składników mineralnych oraz składu granulometrycznego wykonano w Pracowni Chemii Środowiska Leśnego IBL, posiadającej akredytację nr AB740 Polskiego Centrum Akredytacji. Badania prowadzono wg następujących norm: pH gleby wg normy PN-ISO 10390:1997, zawartość węglanu wapnia określono metodą Scheiblera (ISO 10693 1994). Procent N określono wg metody PN-ISO 13878:2002, natomiast udział C badano zgodnie z metodą PN-ISO 10694:2002. Zawartość podstawowych składników pokarmowych analizowano wg normy PB-14 ed.2 z dnia 01.01.2010.

* 1. **Ocena przeżywalności sadzonek i wielkości parametrów biometrycznych**

Przeżywalność sadzonek na plantacji w Chełmie oceniano corocznie od 2008 r. Od 2012 r. mierzono również wysokość części nadziemnej i grubość szyi korzeniowej. W październiku 2013 r., po 5. miesiącach od wysadzenia, przeprowadzono ocenę przeżywalności sadzonek na plantacji w Michałowie oraz zmierzono u wybranych 20-tu sadzonek inokulowanych i nieinokulowanych wysokość części nadziemnej i grubość szyi korzeniowej.

* 1. **Ocena stanu mykoryz u dębu i leszczyny rosnących w uprawach trufli letniej**

**i analizy genetyczne**

Korzenie drobne dębu i leszczyny do oceny mikoryz, z uprawy w Chełmie (fot.1), pobrano w połowie października 2011. Próby pobrano za pomocą świdra glebowego, pięć próbek (v=15 cm3) gleby wraz z korzeniami spod 5. dębów i tę samą liczbę próbek spod leszczyn. Na drugiej plantacji postępowano analogicznie, próby do oceny mykoryz pobrano w październiku 2013 r.

Ocenę mykoryz wykonano na podstawie ich cech morfologicznych pod mikroskopem stereoskopowym Axioskop 2, przy powiększeniu 10 do 50x (Agerer, 2006, Agerer i Rambold, 2007). W celu potwierdzenia prawidłowości identyfikacji mykoryz z wybranych próbek izolowano DNA genomowe. W reakcji PCR stosowano startery ITS1 i ITS4, charakterystycznych dla grzybów ektomykoryzowych. Następnie powtórzono reakcję z zastosowaniem starterów charakterystycznych dla trufli, tj. ITS 5 i ITS7 (Bertini i in., 1999). Kolejny etap analizy polegał na wykonaniu sekwencjonowania z zastosowaniem starterów użytych w drugiej reakcji. Uzyskane sekwencje zostały zgłoszone do bazy danych w banku genów NCBI. Ocenę powtórzono w latach 2012-2013. Identyfikację owocników *Tuber* spp. zebranych w czasie prowadzenia badań wykonano również na podstawie analiz DNA. Sekwencje uzyskane dla owocników pozwoliły na zbadanie pokrewieństwa populacji polskiej *T. aestivum* w Europie oraz jej zróżnicowania wewnątrz kraju (ryc. 4 i 5).

Analizę fitosocjologiczną (Tabela 3)wykonywano na powierzchniach kołowych o średnicy100 m wg metody Brauna-Blanqueta. Dodatkowo uwzględniano roślinność runa i troficzność siedliska, dostęp światła, kwasowość i wilgotność gleby (Zarzycki i in., 2002).

**3.4. Inokulacja sadzonek zarodnikami *T. aestivum* Vitt. (trufli letniej) i hodowla w warunkach szklarniowych**

Owocniki *T. aestivum* (1kg), które przez 3 miesiące (od zbioru do zastosowania) przechowywano w zamrażalniku, w temperaturze -20 ºC utarto w moździerzu, w celu uwolnienia zarodników z worków (asci) i usprawnienia ich kiełkowania. Przygotowano podłoże hodowlane, składające się z wermikulitu i torfu (pH=6,5), zmieszanego w proporcjach4:1, v:v oraz węglanu wapnia (CaCO3) dodawanego w ilości 48 g na litr podłoża.Podłoże hodowlane przed wysadzeniem żołędzi *Ouercus robur* sterylizowano przez 1godzinę w temp. 121ºC. Odczyn podłoża w chwili sadzenia wynosił pH 7,2. Do tak przygotowanego podłoża wysadzono żołędzie (331 szt.). (zaprawione i podkiełkowane, uzyskane ze szkółki w Nędzy, Nadl. Rudy Raciborskie) do doniczek pojemności ok. 1 litra. Inokulację wykonano 2 tygodnie od siewu żołędzi (wykształcenie się pierwszych korzeni drobnych). Pod każdą sadzonkę dodano 1 g zmielonych owocników zawieszonych w 25 ml wody destylowanej. Jako kontrolę traktowano 10 sadzonek, gdzie dodano czystą wodę bez zarodników trufli.

Sadzonki dębu wzrastały w szklarni przez 13 miesięcy, od kwietnia 2012 r. do maja 2013 r., w temperaturze 22ºC. Nawadnianie stosowano w zależności od potrzeb, zwykle 2 razy w tygodniu. W okresie wzrostu sadzonek w szklarni dwukrotnie wykonano oprysk środkiem Falcon 460 EC przeciwko chorobom grzybowym, tj. mączniakowi prawdziwemu dębu i antraknozie. Nie stosowano nawozów w czasie wzrostu sadzonek. Po 6-ciu miesiącach wzrostu w warunkach szklarniowych z wybranych sadzonek pobrano próbki korzeni drobnych w celu sprawdzenia stanu mykoryz.

W maju 2013 roku sadzonki zostały wysadzone na stanowisko stałe w rozstawie 3,5 m x 4 m, na powierzchni około 0,5 ha. Przy wyborze powierzchni uwzględniono rodzaj gleby, warunki termiczne i wilgotnościowe oraz naturalne występowanie trufli letniej. Wykonano zabiegi uprawowe, takie jak: orka głęboka, talerzowanie i bronowanie. Prace te miały miejsce w październiku 2012 r. Posadzono 331 sadzonek dębu szypułkowego, w tym 205 sadzonek inokulowanych *Tuber aestivum* i 126 sadzonek nieinokulowanych. Powierzchnia została ogrodzona, aby zapobiec szkodom od zwierzyny, a ziemię wokół każdej sadzonki przykryto włókniną, aby zapobiec zachwaszczeniu w bezpośrednim jej sąsiedztwie.

* 1. **Analizy wilgotności i temperatury gleby**

Na wybranych lokalizacjach w drzewostanach założono mierniki wilgotności i temperatury podłoża, które mierzyły zawartość objętościową wody w glebie oraz jej temperaturę, wg metody TDR. Zasada pomiaru wilgotności gleby w metodzie TDR polegała na określeniu stałej dielektrycznej gleby, która poddana jest działaniu pola elektrycznego o częstotliwości 109 Hz. W takich warunkach gleba zachowuje się jak izolator, którego stała dielektryczna warunkowana jest wilgotnością, gdyż woda jest przewodnikiem impulsu elektrycznego. Stała dielektryczna [ε] wyznaczana jest z prędkości propagacji fal elektromagnetycznych w glebie [v]



gdzie: c – prędkość światła w próżni

Wilgotność objętościowa gleby określana jest ze stałej dielektrycznej i gęstości gleby [ρ], według formuły (Malicki i inni, 1996):



Zastosowana metoda oparta na reflektometrycznym pomiarze wilgotności gleby wykazuje wysoką zgodność z pomiarem bezpośrednim wilgotności gleby metodą grawimetryczną (suszarkową) (Malicki i in., 1998). Pomiary wykonywano w ciągu sezonu wegetacyjnego w latach 2012-2013.

**3.6 Poszukiwanie nowych stanowisk występowania *Tuber* spp. i ocena plonowania trufli letniej w naturalnych drzewostanach**

Poszukiwanie owocników trufli prowadzono w latach 2011 do 2013 z pomocą tropiącego psa rasy Lagotto Romagnolo. Od czerwca do listopada, zwykle co dwa tygodnie, na stanowiskach wytypowanych na podstawie analiz glebowych i składu zbiorowiska roślinnego sprawdzano obecność owocników trufli. Odnotowano 6 stanowisk występowania trufli letniej. Jako główny czynnik determinujący występowanie trufli, w tym trufli letniej, brano pod uwagę zawartość wapnia w glebie. Liczbę znalezionych owocników zestawiono z zawartością wapnia w glebie. Zależność między wymienionymi czynnikami przedstawiono w rozdziale 4.6.

**3.7 Analiza statystyczna wyników**

Dane analizowano przy pomocy programu StatSoft 2008. Stosowano nieparmetryczny test korelacji Spearmana przy poziomie istotności p=0,05.

1. **Wyniki**
   1. Ocena parametrów fizyko-chemicznych gleb w naturalnych stanowiskach trufli letniej oraz w uprawach truflowych

Szczegółową charakterystykę parametrów glebowych dla stanowisk naturalnych trufli, oznaczonych jako SA i M oraz ogrodów truflowych w Chełmie i Michałowie przedstawiono w tabeli nr 1. Zarówno gleby z drzewostanów, jak i ogrodów, charakteryzowały się właściwymi proporcjami gliny, pyłu i piasku w odniesieniu do wymagań trufli letniej w tym aspekcie. Najwyższą zawartością węglanu wapnia charakteryzowała się gleba z uprawy w Chełmie, a najniższą z uprawy w Michałowie. Zawartość pozostałych, analizowanych pierwiastków mieściła się w zakresie wymagań grzybów należących do rodzaju *Tuber*. Zależność między zawartością węgla i azotu była równa lub wyższa od 10, co wskazuje na niski udział azotu przyswajalnego.

**Tabela 1.** Skład fizyko- chemiczny gleby na wybranych powierzchniach badawczych

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| parametry glebowye | Powierzchnie badawcze | | | |
| Chełm | Michałów | Pińczów (SA) | Pińczów (M) |
| % gliny | 39,4\* | 36,97 | 50,0 | 45,0 |
| % pyłu | 29,1 | 42,35 | 15 | 24,5 |
| % piasku | 31,5 | 20,68 | 35 | 30,5 |
| pHH20 | 8,1 | 6,8 | 7,53 | 7,33 |
| pHKCL | 7,2 | 5,8 | 6,99 | 6,82 |
| CaCO3 (ogółem)% | 21,85 | 0,08 | 5,9 | 12,6 |
| P (g x kg-1) | 0,35 | 0,11 | 0,30 | 0,54 |
| Fe(g x kg-1) | 11,43 | 15,40 | 13,32 | 19,92 |
| Ca (g x kg-1) | 75,18 | 19,29 | 8,07 | 14,7 |
| Mg (g x kg-1) | 3,13 | 2,43 | 3,17 | 4,82 |
| K (g x kg-1) | 4,09 | 3,83 | 3,85 | 6,32 |
| Ca/Mg | 24,0 | 7,94 | 2,5 | 3,0 |
| K/Mg | 1,31 | 1,58 | 1,2 | 1,3 |
| C (ogółem) % | 3,94 | 1,69 | 3,5 | 6,2 |
| N (ogółem) % | 0,10 | 0,17 | 0,34 | 0,50 |
| C/N | 38,8 | 10,0 | 10,3 | 12,5 |

\*- dane są średnią arytmetyczną dla 5. powtórzeń

Charakterystykę naturalnych stanowisk występowania trufli letniej oraz innych gatunków przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Charakterystykanaturalnych stanowisk trufli

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Stanowiska *Tuber* spp. | Skała macierzysta | Drzewostan | Wystawa | Wysokość n.p.m. | Odnotowane gatunki trufli |
| M | Margle i wapienie kredowe | dębowo- grabowo- bukowy | SE | 247 | *T. aestivum,*  *T. maculatum,*  *T. excavatum,*  *T. borchii* |
| SA | Margle i wapienie kredowe | dębowo-grabowo-bukowy | NS | 319 | *T. aestivum,*  *T. excavatum,*  *T. rufum* |

**Tabela 3.** Roślinność występująca na stanowiskach naturalnych trufli. Podkreślono gatunki tworzące mykoryzę z grzybami *Tuber* spp.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Rośliny runa** | M | SA | **Drzewa i krzewy** | M | SA |
| *Aegopodium podagraria* | + |  | *Acer pseudoplatanus* |  |  |
| *Actaea spicata* | + |  | *Acer campestre* |  |  |
| *Ajuga reptans* |  |  | *Betula pendula* |  |  |
| *Alium ursinum* |  |  | *Carpinus betulus* | + | + |
| *Anemone nemorosa* | + |  | *Cerasus avium* |  | + |
| *Anemone sylvestris* | + |  | *Cornus sanguinea* | + |  |
| *Asarum europaeum* | + |  | *Cornus alba* |  | + |
| *Astragalus glycyphyllos* | + | + | *Corylus avellana* | + | + |
| *Athyrium filix-femina* |  | + | *Crataegus monogyna* | + | + |
| *Calamagrostis arundinaceae* |  |  | *Euonymus verrucosa* | + | + |
| *Campanula latifolia* | + |  | *Fagus sylvatica* | + |  |
| *Carex sylvatica* |  |  | *Fraxinus excelsior* | + |  |
| *Carex digitata* |  | + | *Lonicera xylosteum* |  | + |
| *Convallaria majalis* | + |  | *Malus sp.* |  |  |
| *Corydalis cava* |  |  | *Pinus sylvestris* |  |  |
| *Cephalanthera alba* | + | + | *Populus tremula* |  |  |
| *Cypripedium calceolus* |  |  | *Prunus spinosa* | + |  |
| *Daphne mezereum* | + | + | *Pyrus pyraster* |  |  |
| *Epipactis helleborine* | + |  | *Quercus robur* | + | + |
| *Fragaria vesca* |  | + | *Ribes uva-crispum* |  |  |
| *Galeobdolon luteum* |  |  | *Rosa canina* | + |  |
| *Galium aparine* | + |  | *Sambucus nigra* |  |  |
| *Galium odoratum* |  |  | *Tilia cordata* | + |  |
| *Galium sylvaticum* | + | + | *Ulmus laevis* |  |  |
| *Geranium sylvaticum* |  |  | *Viburnum opulus* |  | + |
| *Geum urbanum* |  | + |  |  |  |
| *Hedeara helix* | + |  |  |  |  |
| *Hepatica nobilis* |  |  |  |  |  |
| *Hypericum perforatum* |  |  |  |  |  |
| *I*Isopyrum thalictroides |  |  |  |  |  |
| *Lathyrus niger* | + |  |  |  |  |
| *Lathyrus sylvestris* | + | + |  |  |  |
| *Lasperitium sp.* |  |  |  |  |  |
| *Lilium martagon* | + | + |  |  |  |
| *Maianthemum bifolium* | + | + |  |  |  |
| *Melittis melissophyllum* | + |  |  |  |  |
| *Melica nutans* | + |  |  |  |  |
| *Neottia nidus avis* | + |  |  |  |  |
| *Oxalis acetosella* |  | + |  |  |  |
| *Peucedanum oreoselinum* | + |  |  |  |  |
| *Poa nemoralis* |  | + |  |  |  |
| *Polygonatum multiflorum* | + |  |  |  |  |
| *Polygonatum odoratum* |  |  |  |  |  |
| *Primula veris* | + |  |  |  |  |
| *Pulmonaria obscura* |  | + |  |  |  |
| *Ranunculus acris* |  |  |  |  |  |
| *Rubus sp.* |  | + |  |  |  |
| *Rubus idaeus* |  | + |  |  |  |
| *Sanicula europaea* | + |  |  |  |  |
| *Rubus sp.* | + |  |  |  |  |
| *Stelaria holostea* |  |  |  |  |  |
| *Symphytum*  *nemorosum* |  |  |  |  |  |
| *Urtica dioica* |  | + |  |  |  |
| *Vaccinium myrtillus* |  | + |  |  |  |
| *Vinca mninor* |  |  |  |  |  |
| *Viola reichenbachiana* | + | + |  |  |  |
| *Viola mirabilis* | + |  |  |  |  |
| Razem | 28 | 18 |  | 11 | 9 |

4.2. Ocena przeżywalności i parametrów biometrycznych sadzonek

Przeżywalność sadzonek dębu i leszczyny w uprawie truflowej w Chełmie w latach 2008-2013 przedstawiono na ryc. 1. Sadzonki leszczyny charakteryzowały się wyższą przeżywalnością niż sadzonki dębu. Liczba zamarłych leszczyn w ciągu czterech sezonów wegetacyjnych wyniosła 8%, zaś liczba zamarłych dębów kształtowała się na poziomie 28%. Po wykonaniu nasadzeń uzupełniających liczba sadzonek dębu i leszczyny wynosiła 178 i 179 szt., odpowiednio).

Ryc. 1. Przeżywalność sadzonek dębu i leszczyny w uprawie w Chełmie.

Przeżywalność sadzonek wysadzonych w Michałowie była wysoka i wynosiła 93%. Z wysadzonych 331 sadzonek zamarły 23 sadzonki, w tym 18 sadzonek inokulowanych.

Wykonane pomiary pędu i grubości szyi korzeniowej dla sadzonek dębu i leszczyny rosnących na plantacji eksperymentalnej w Chełmie oraz sadzonek dębu z plantacji w Michałowie wykazały brak istotnych różnic między sadzonkami inokulowanymi a sadzonkami nieinokulowanymi.

* 1. **Ocena stanu mykoryz u dębu i leszczyny rosnących w uprawach trufli letniej i genetyczne analizy pokrewieństwa polskich i europejskich *Tuber* spp.**

Ocena mykoryzacji u dębu i leszczyny rosnących na uprawie w Chełmie, wykonana w 2011 r. wykazała stosunkowo wysoką udatność zabiegu. Udział mykoryz *T. aestivum* (fot. 2.)u leszczyny wyniósł 64 %, u dębu zaś 75%. Pozostałe mykoryzy były tworzone głównie przez autochtoniczne grzyby rodzaju *Thelephora* (20%)i *Hebeloma* (5%) (fot. 3 i 4, odpowiednio).

 

**Fot. 2.**  Ektomykoryzy *T. aestivum* usadzonek *C. avellana,* pow. 32x(po lewej) i *Q. robur,* pow. 16x (po prawej)



**Fot. 3.**  Mykoryzy *Thelephora terrestris* ( pow. 32x) na korzeniach sadzonek dębu rosnących w uprawie



**Fot. 4.**  Mykoryzy  *Hebeloma* sp. (pow. 16x) na korzeniach sadzonek dębu rosnących w uprawie

Wyniki analizy DNA (sekwencje ITS) wyizolowanego z mykoryz *Tuber* potwierdziły identyfikację wykonaną na podstawie obserwacji mikroskopowych. Sekwencjonowane DNA z mykoryz porównano z sekwencjami DNA uzyskanego z owocników *T. aestivum* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Identyfikacja symbionta mykoryzowego na korzeniach sadzonek *Q. robur* (1.)

i *C. avellana* (2.)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Gatunek | Długość sekwencjonowanego  ITS (pz) | Nr gatunku  w Banku Genów  o podobnej sekwencji | Zgodność |
| 1. *Tuber aestivum* | 690 | E326689 | 98% |
| 2. *Tuber aestivum* | 687 | EU326689 | 96% |

*ITS, internal transcribed spacer (wewnętrzna sekwencja kodująca); pz – pary zasad*

Ocena mykoryzacji u dębu i leszczyny rosnących na uprawie w Nadl. Chełm wykonana w 2012 r. wykazała, iż udział mykoryz *T. aestivum* u leszczyny w strukturze wszystkich mykoryz wynosił56% i był niższy, w porównaniu do roku 2011, o 8 %. Natomiast u dębu udział tych mykoryz wynosił 33%. U sadzonek dębu udział mykoryz *T. aestivum* uległ zmniejszeniu aż o 42%, w porównaniu z rokiem poprzednim. Zarówno u dębu, jak i u leszczyny odnotowano duży udział mykoryz tworzonych przez następujące grzyby: *Thelephora terrestris, Inocybe* sp., *Peziza* sp., *Scleroderma citrinum* i *Tomentella* sp.

Wyniki analizy DNA (sekwencje ITS) wyizolowanego z mykoryz *Tuber* potwierdziły identyfikację wykonaną na podstawie obserwacji mikroskopowych. Sekwencjonowane DNA z mykoryz (Tabela 4) porównano z sekwencjami DNA uzyskanego z owocników *T. aestivum* (Tabela 5), znajdujących się w Banku Genów: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

**Tabela 4.** Pochodzenie i charakterystyka próbek środowiskowych

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nr | Pochodzenie próbki | Cechy morfologiczne mykoryz |
|  |  |  |
| 1. | leszczyna, Chełm | mikoryza ciemna z wyraźnymi cystydiami |
| 2. | leszczyna, Chełm | mufka: biała grzybnia ekstramatrykalna |
| 3. | dąb, Chełm | mufka: grzybnia żółta, mocno spleciona |
| 4. | dąb, Chełm | ciemna mikoryza |

**Tabela 5.** Identyfikacja symbionta mykoryzowego na korzeniach sadzonek *C. avellana* (1-2.) i *Q. robur* (3-4.)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Gatunek/Nr w Banku Genów | Długość sekwencjonowanego  ITS (pz) | Nr gatunku w Banku Genów o najbardziej podobnej sekwencji | Zgodność |
| 1. *Tuber aestivum*  (JX194117) | 493 | JF693892 | 100% |
| 2. *Tuber aestivum*  (JX194118) | 494 | JF693892 | 100% |
| 3. *Tuber aestivum*  (JX194119) | 494 | AJ888118 | 100% |
| 4. *Tuber aestivum*  (JX194120) | 493 | AJ888118 | 100% |

Ocena mykoryzacji u dębu i leszczyny rosnących na uprawie w Chełmie wykonana 2013 r. pozwoliła na wyodrębnienie u dębu 4. morfotypów mykoryz. Dominowały mykoryzy *Inocybe* sp., ich udział wynosił 50%, zaś mykoryzy *T. aestivum* stanowiły 33%. Inne grzyby to *Peziza* sp. i *Tomentella* sp., których łączny udział wynosił 17%.

Ryc. 2. Udział procentowy grzybów mykoryzowych kolonizujących korzenie dębu na plantacji w Chełmie (jesień 2013 r.)

U sadzonek leszczyny stwierdzono obecność 3 morfotypów mykoryz. Dominowały mykoryzy tworzone przez *T. aestivum,* ich udział wynosił 61% w ogólnej liczbie mykoryz. Gatunek *T. terrestris* kolonizował 36% liczby korzeni leszczyny, zaś udział mykoryz *Alnicola* sp. wynosił zaledwie 3 %.

Ryc. 3. Udział procentowy grzybów mykoryzowych kolonizujących korzenie leszczyny na plantacji w Chełmie (jesień 2013 r.)

Wykonane analizy genetyczne miały na celu określenie pokrewieństwa populacji trufli letniej występującej w Polsce. Na podstawie zgromadzonych w Banku Genów sekwencji DNA *T. aestivum* (z owocników i mykoryz), pochodzących z różnych regionów geograficznych, opracowano drzewo filogenetyczne, ilustrujące pokrewieństwo w obrębie gatunku (Ryc. 4). Jako gatunek, do którego odniesiono porównania (tzw. „poza grupą”) wybrano *T. excavatum* – truflę wydrążoną.

Zaznaczone na rycinie pogrubioną czcionką numery sekwencji uzyskane z mykoryz (tab. 4 i tab. 5) mieszczą się w jednej grupie z *T. aestivum* użytym do inokulacji (EU326689), ale również z sekwencjami pochodzącymi z próbek środowiskowych z Czech, Słowacji, Włoch, Węgier, Austrii i Szwecji. Na ryc. 5. pokazano zróżnicowanie genetyczne polskiej populacji trufli (DNA wyizolowano wyłącznie z owocników). Trufla letnia pochodząca ze stanowiska SA (11-12, 29-30) charakteryzuje się wyraźną odrębnością od trufli letniej ze stanowiska M. Owocniki zebrane z tych stanowisk wykazują pokrewieństwo z truflą letnią występującą we Włoszech w regionie Umbrii i Arezzo. Z kolei dwa z owocników znalezionych na stanowiskach PR oraz NW znajdują się jednym kladzie z truflą letnią występującą w Szwecji.

HQ285309\_Slovakia

JF693892\_Poland

HQ285305\_Czech\_Republic

HQ285302\_Italy

FM205616\_Hungary

EU753266\_Austria

EU326689\_Poland

AJ888119\_Italy

**JX194118\_Poland**

AJ888114\_Hungary

**JX194117\_Poland**

AJ888118\_Italy

EU326688\_Poland

**JX194119\_Poland**

**JX194120\_Poland**

HQ285311\_Czech\_Republic

AJ492208\_Italy

AJ492218\_Italy

AJ888120\_UK

AJ888116\_Italy

AJ888109\_Sweden

AJ888110\_Sweden

HQ285294\_Czech\_Republic

HQ285306\_Slovakia

AJ888127\_France

AJ888121\_Denmark

AJ888083\_Sweden

AJ888113\_Hungary

AJ888122\_Sweden

AJ492203\_Italy

JF926117\_Germany

AJ492199\_Italy

AJ888049\_Sweden

AJ888076\_France

AJ888077\_Italy

FM205619\_Slovenia

AJ888125\_France

HM485340\_Sweden

FM205620\_Spain

FM205621\_Spain

DQ388878\_France

AJ888111\_France

GQ217542\_China

GU979038\_China

JN975879\_Italy

JN975880\_Italy

EU326692\_T.\_excavatum

95

94

99

99

71

84

66

58

61

97

60

0,001

Ryc. 4. Drzewo filogenetyczne dla *T. aestivum* (trufla letnia) sporządzone na podstawie sekwencji ITS przy użyciu metody Maximum Likelihood. Podziałka reprezentuje zmiany na poziomie 0,001 algorytmu liniowego.Pogrubioną czcionką zaznaczono sekwencje trufli letniej z mykoryz u dębu i leszczyny rosnących na plantacji w Chełmie.



Ryc. 5. Drzewo filogenetyczne dla *T. aestivum* (trufla letnia) sporządzone na podstawie sekwencji ITS przy użyciu metody Maximum Likelihood. Podziałka reprezentuje zmiany na poziomie 0,002 algorytmu liniowego.

Wszystkie polskie sekwencje oznaczone numerami pochodzą z populacji owocników pozyskanych w 2013 r. na terenie Niecki Nidziańskiej: 1-8, 17-20, A2- owocniki z stanowiska PR; A3- pow. NW; 11-12, 29-30 stanowisko SA; 31-32 stanowisko M; A5- pochodzenie- Arezzo, Włochy. Sekwencje z odniesieniem do kraju i/lub autora są zdeponowane w Genbanku NCBI.

4.4. Ocena mykoryz u inokulowanych sadzonek hodowanych w warunkach szklarniowych wysadzonych na uprawie w Michałowie

U sadzonek dębu mykoryzowanych owocnikami *Tuber aestivum*, rosnących w szklarni, wiosną 2013 r., przed wysadzeniem ich na uprawę, udział mykoryz z truflą letnią wynosił 76%.



**Fot. 5.**  Ektomikoryzy *T. aestivum* u sadzonek *Quercus robur* rosnących w szklarni

Wykonana jesienią 2013 r. ocena mykoryzacji u dębu na uprawie w Michałowie pozwoliła na stwierdzenie obecności 3. morfotypów mykoryz. Udział mykoryz *T. aestivum* wynosił 50%, pozostałe mykoryzy tworzone były przez *T. terrestris* (44%) i *Inocybe curvipes* (6%).

Ryc. 6. Udział procentowy grzybów mykoryzowych kolonizujących korzenie dębu na plantacji w Michałowie

**4.5. Analizy wilgotności i temperatury gleby**

Wyższe różnice w zawartości wody w glebie w ciągu badanego sezonu wegetacyjnego obserwowano w drzewostanie na powierzchni M. Najniższą wilgotność gleby odnotowano na przełomie lipca i sierpnia oraz w drugiej połowie sierpnia i drugiej dekadzie października (ryc. 7). Na powierzchni SA (ryc. 8) zmiany w wilgotności podłoża nie przebiegały w tak skokowy sposób, jak na powierzchni M. Wilgotność podłoża nie osiągnęła tu wartości zerowej, jak w przypadku powierzchni M. Występowanie owocników *T. aestivum* na badanych powierzchniach poprzedzone było opadami deszczu. W okresach między opadami, gdy następowało obniżenie wilgotności gleby oraz jej przewodności elektrycznej, stwierdzano pojawienie się owocników tego gatunku (ryc. 7 i 8).

Owocnikowanie *T. excavatum* i *T. maculatum*  nie było zależne od wzrostu wilgotności podłoża. Temperatura gleby na powierzchni M była wyrównana w ciągu badanego sezonu. Wyższą zmienność temperatury obserwowano na powierzchni SA, gdzie owocniki trufli letniej obecne były zarówno przy wyższej, jak i niższej temperaturze podłoża (ryc. 8)

**Ryc. 7.** Owocnikowanie trufli w odniesieniu do wilgotności i temperatury gleby oraz przewodności elektrycznej na powierzchni M w drzewostanie

**Ryc. 8.** Owocnikowanie trufli w odniesieniu do wilgotności i temperatury gleby oraz przewodności elektrycznej na powierzchni SA w drzewostanie

**4.6. Ocena plonowania trufli letniej w drzewostanach**

Badania prowadzone w latach 2011-2013 pozwoliły na lokalizację 4 nowych (w chwili rozpoczęcia badań posiadano tylko 2 stanowiska, tj. M i SA) stanowisk trufli letniej i innych gatunków *Tuber: T. excavatum, T. maculatum, T. macrosporum* i *Tuber* sp. Na badanych stanowiskach stwierdzono, że wraz ze wzrostem zawartości wapnia (ryc. 9.) i węglanu wapnia (ryc. 10, 11 i 12.) w podłożu uzyskano wyższą liczbę liczbę owocników *T. aestivum*. Zależności między zawartością węglanu wapnia a liczbą znalezionych w latach 2011-2013 owocników trufli letniej były statystycznie istotne dla każdego sezonu wegetacyjnego.

**Ryc. 9** Liczba owocników i gatunków *Tuber* spp. oraz zawartość wapnia w naturalnych stanowiskach



Ryc. 10. Korelacja między liczbą owocników *T. aestivum* zebranych w 2011 r. a zawartością CaCO3 (%) w glebie (n=12, r=0,78, p=0,0003036)



Ryc. 11. Korelacja między liczbą owocników *T. aestivum* zebranych w 2012 r. a zawartością CaCO3 (%) w glebie (n=30; r=0,42; p=0,022260)



Ryc. 12. Korelacja między liczbą owocników *T. aestivum* zebranych w 2013 r. a zawartością CaCO3 (%) w glebie (n=30, r=0,54, p=0,001960)



Ryc. 13. Zależność między liczba gatunków trufli a zawartością CaCO3 (%) w glebie (n=30, r=0,65, p=0,000103)

Stwierdzono istotną statystycznie zależność między liczbą gatunków *Tuber* spp. zebranych w 2013 r., a zawartością węglanu wapnia w badanych stanowiskach (ryc. 13). Współczynnik korelacji r wynosił 0,65 przy p=0,000103.

1. **Dyskusja**

**Ocena parametrów biometrycznych**

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wielkości parametrów wzrostu między sadzonkami inokulowanymi *T. aestivum* a sadzonkami nieinokulowanymi, co może oznaczać, że wysiłek rośliny związany w tym okresie z utworzeniem mykoryzy i zaopatrzeniem partnera grzybowego w węglowodany, nie był dla niej zbyt obicążający. Dane literaturowe nie są jednoznaczne, jeśli chodzi o korzyści (wyrażone parametrami wzrostu) u sadzonek mykoryzowanych. Smith i Read (2008) podają, że na ogół sadzonki mykoryzowane są niższe od sadzonek nie mykoryzowanych z uwagi na odprowadzanie przez roślinę około 30% asymilatów do partnera grzybowego. Promowanie lub hamowanie wzrostu sadzonek zależy bowiem od rodzaju, gatunku, a niekiedy nawet szczepu grzyba użytego do inokulacji (Wallander, 1992) Ważna jest również zawartość azotu w podłożu, ponieważ wysoka zawartość tego pierwiastka ogranicza nie tylko poziom mykoryzacji, ale i wzrost roślin (Hobbie i Colpaert, 2003; Hilszczańska i Sierota 2012).Analiza podłoża, na którym rosły sadzonki wykazała, że dostępność azotu była niska (C/N≥10), co wyraziło się brakiem różnic w parametrach wzrostu u sadzonek.

**Ocena mykoryz u drzew na plantacjach trufli letniej**

Obecność mykoryz *T. aestivum* u sadzonek dębu po pierwszym sezonie wegetacyjnym na plantacji doświadczalnej w Michałowie dobrze rokuje przyszłej uprawie tego gatunku trufli. Ich wysoki, 50% udział, potwierdza zasadę mykoryzacji odnośnie do pochodzenia inokulum z tego samego lub podobnego regionu geograficznego, na którym wysadza się inokulowane sadzonki (Dodd i Thomson, 1994). Użyte do mykoryzacji owocniki trufli letniej zostały bowiem zebrane w dorosłym drzewostanie dębowo-grabowym, sąsiadującym z plantacją. Parametry glebowe (Tabela 1) na tych powierzchniach były do siebie zbliżone, co również nie było obojętne dla utrzymywania się mykoryz trufli letniej i podejmowania konkurencji z innymi, autochtonicznymi gatunkami grzybów mykoryzowych (Benucci i in., 2011; 2012a, b). Należy jednak zaznaczyć, że odstępstwo od tej zasady nie musi kończyć się niepowodzeniem. Z doświadczeń przeprowadzonych w takich krajach, jak Szwecja, Finlandia, Nowa Zelandia czy Australia (Weden, 2004; Hall i in., 2007) wynika, że sadzonki inokulowane truflą pozyskaną we Francji czy Włoszech charakteryzują się dobrym wzrostem, a wokół nich, w glebie znajdowane są owocniki. Pokrewieństwo wśród europejskiej populacji trufli letniej jest duże, co pokazały również nasze badania (ryc. 6).

Kluczową rolę zawartości wapnia w podłożu dla obfitości mykoryz i owocników trufli potwierdzają wyniki uzyskane na plantacji w Chełmie. U sadzonek dębu po roku od ich wysadzenia odnotowano 75% udział mykoryz trufli letniej (Hilszczańska i Sierota, 2010), podobny wynik stwierdzono w kolejnych dwóch latach.

Natomiast w czwartym i piątym roku wzrostu sadzonek udział mykoryz trufli letniej znacznie się zmniejszył i wyniósł 33% w strukturze wszystkich mykoryz. Taki wynik można wiązać z sukcesją lokalnych grzybów mykoryzowych, a tym samym większą konkurencją wśród gatunków zasiedlających korzenie drobne sadzonek (Smith i Read, 2008).

Na obu plantacjach trufli wartość wskaźnika C/N była równa lub wyższa niż 10. Wg Ericksson i in. (1997) nie jest wskazane, aby wymieniony wskaźnik osiągnął niższą wartość niż 10, gdyż wskazuje to na stosowanie w niedalekiej przeszłości nawożenia azotowego, co nie jest sprzyjające dla rozwoju grzybów mykoryzowych, w tym *T. aestivum* (Weden i in. 2004a,b). Podobnego zdania są Chevalier i Frochot (1997), którzy wykazali, że jedynie w dwóch z 25 badanych przez tych autorów ogrodów truflowych we Francji próbkach gleby uzyskano wartość C/N poniżej 10.

Dobrym dla rozwoju *T. aestivum* wskaźnikiem jest stosunek K/Mg, którego wartość poniżej 2, świadczy, że pobieranie magnezu przez roślinę będzie odbywać się bez zakłóceń. Jednak nawet w sytuacji, gdy stosunek K/Mg jest wyższy niż 2, wciąż możliwy jest rozwój owocników *T. aestivum* (Weden i in., 2004b). Możliwe jest także tworzenie mykoryz przez *Tuber* sp. na korzeniach *Quercus petraea i Q. robur* w glebie charakteryzującej się wysokim stosunkiem K/Mg (Leski i in., 2009).

Czynnikiem utrudniającym rozwój mykoryz, a w przyszłości owocników inokulowanego gatunku grzyba (tu: *T. aestivum)*, są mykoryzy tworzone z udziałem innych, konkurujących z truflą letnią gatunków grzybów. U inokulowanych sadzonek przygodne mykoryzy najczęściej tworzone są przez grzyby należące do rodzaju *Thelephora* i *Scleroderma* (Hall i in., 2007). Uzyskane wyniki potwierdzają w/w spostrzeżenie, gdyż obecność mykoryz *Thelephora* i *Scleroderma* była stwierdzana u sadzonek już po 6-ciu miesiącach od inokulacji (Hilszczańska i Sierota, 2010).

Duży udział mykoryz *Thelephora terrestris* (50%) występuje na korzeniach dębu w plantacji w Michałowie. Podobna sytuacja jest stwierdzana w korzeniach leszczyny z plantacji w Chełmie, gdzie mykoryzy *T. terrestris* stanowią aż 61% zbiorowiska. Według Granetti i in. (2005) *T. terrestris* bardzo często towarzyszy mykoryzom *Tuber*, nawet w sytuacji, gdy podłoże hodowlane było sterylizowane. Inne równie częste mykoryzy przygodne tworzone są przez *Sphaerosporella brunnea* i *Pulvinula constellatio* (Granetti i in., 2005; Hall i in., 2007). Jednak w naszych doświadczeniach nie stwierdzono ich obecności, występowały natomiast mykoryzy tworzone przez grzyby należące do rodzajów: *Hebeloma*, *Inocybe, Tomentella, Peziza, Scleroderma* i *Alnicola.*

**Analizy mykologiczne i genetyczne**

Identyfikacja mykoryz *T. aestivum* nie należy do prostych i łatwo ją niekiedy pomylić z mykoryzą AD (*angle droix*), mykoryzą tworzącą prawoskrętne rozgałęzienia. Najczęściej jednak ten ostatni typ mykoryzy występuje u sadzonek mykoryzowanych *T. melanosporum* (Agueda i in., 2008). Użycie do identyfikacji danego organizmu technik molekularnych, a w przypadku niniejszych badań sekwencji ITS1 i ITS2 (Hall i in., 2007) pozwoliło na potwierdzenie udatności mykoryzacji w 99-100% (Tabela 5). Zastosowanie analizy DNA, w tym sekwencjonowanie, pozwoliło na określenie stopnia pokrewieństwa pomiędzy polską populacją trufli letniej, porównując zarówno mykoryzy, jak i owocniki tego gatunku, a populacjami z innych krajów europejskich (ryc. 4 i 5).

Oszacowując zróżnicowanie polskiej populacji trufli letniej można wyróżnić kilka kladów (grup) podobieństwa. Polskie sekwencje trufli letniej wykazują 100% podobieństwo do sekwencji trufli letniej z Umbrii i Arezzo. Niektóre sekwencje polskiej trufli letniej wykazują również bardzo wysokie podobieństwo do sekwencji trufli letniej ze Słowacji i Czech. Taki wynik może wskazywać na południowy szlak migracji, jakim prawdopodobnie przywędrował gatunek *T. aestivum* do Polski. Niewykluczone, że wędrówka trufli nastąpiła wraz z dębem z jednego, w tym wypadku Apenińskiego refugium, w czasie ostatniego zlodowacenia (Petit i in., 2002). *T. aestivum,* podobnie jak *T. borchii* i *T. maculatum,* wykazuje wysokie genetyczne zróżnicowanie (Mello i in., 2006). Te gatunki mają także duży zasięg geograficzny, znacznie większy niż *T. magnatum* czy *T. melanosporum* (Riousset i in., 2001), dla przykładu *T. maculatum* występuje od Francji po południową Rosję. Prawdopodobnie zmiany klimatyczne, jakie wystąpiły w okresie czwartorzędu, miały mniejszy wpływ na wymienione gatunki i tym samym jeden z mechanizmów neutralnych [ewolucji](http://pl.wikipedia.org/wiki/Ewolucja), przez co efekt „wąskiego gardła” (bottleneck) był dla nich mniej istotny. Jednak, ze względu na niepełne analizy zróżnicowania genetycznego w zasięgu geograficznym dyskutowanych gatunków, postawiona hipoteza nie może obecnie zostać zweryfikowana (Jeandroz i in., 2008; Bonito i in., 2010). Dodatkowym problemem jest zróżnicowanie międzygatunkowe, które często trudno ocenić prawidłowo opierając się jedynie na cechach mikroskopowych przy identyfikacji gatunku (Mello i in., 2006).

**Ocena plonowania trufli letniej w naturalnych drzewostanach**

Rozwój trufli, a szczególnie faza owocnikowania, są wciąż słabo poznane. Tworzenie się owocników może zachodzić dzięki pozostawaniu trufli w związku symbiotycznym z niektórymi roślinami i tylko w szczególnych warunkach siedliskowych (Stobbe i in., 2012). Kluczową rolę w rozwoju trufli, poza obecnością inokulum, odgrywa gleba - jej struktura, odczyn i zasobność w kationy wapnia (Chevalier, 2010; 2012; Chevalier i Sourzat, 2012). Zależność między zasobnością gleby w wapń a plonowaniem trufli letniej została potwierdzona również w warunkach Polski. Niemniej ważnymi czynnikami są wilgotność podłoża i jej temperatura. Związek między wilgotnością gleby a owocnikowaniem trufli letniej pokazano na przykładzie dwóch powierzchni dla danych uzyskanych w 2013 r. (ryc.7 i 8.) Dla 2012 r. nie przedstawiono danych z uwagi na brak owocnikowania trufli w okresie letnim, co miało związek z brakiem opadów i tym samym niską wilgotnością gleby. Susza w 2012 r., oprócz Polski dotknęła także kraje z południa Europy, takie jak np. Włochy czy Słowenia. Plonowanie trufli w tych krajach było także na bardzo niskim poziomie (D. Donini, dane niepublikowane). Wykonane pomiary wilgotności podłoża potwierdziły dane o owocnikowaniu trufli letniej w okresach między obfitymi opadami (Hall i in., 2007), kiedy początkowo gleba charakteryzuje się dużą zawartością objętościową wody, a następnie następuje stopniowe jej obniżanie. Nie stwierdzono bezpośredniego związku między wzrostem temperatury gleby a owocnikowaniem trufli letniej. Taki wynik wskazuje, że wilgotność podłoża jest niezwykle istotna, aby trufla letnia wytworzyła owocniki. Stąd, w ogrodach truflowych w Europie, które przynoszą wysokie plony wykonywane jest nawadnianie (Bencivenga i Baciarelli Falini, 2012).

Pierwsze owocniki grzyba na jednym z 6. stanowisk stwierdzono w połowie lipca. Poszukiwania trufli prowadzone w dwutygodniowych okresach, aż do polowy listopada b. r., pozwoliły na zebranie ponad 3 kg owocników trufli letniej. Plonowanie trufli letniej w ostatniej dekadzie listopada było odnotowane na Gotlandii (Weden i in., 2009) w latach 2005-2007. Na ogół jednak, szczególnie w krajach południowej Europy, plonowanie trufli letniej kończy się na przełomie września i października (Granetti i in., 2005).

Interesującym wynikiem jest występowanie innych gatunków trufli wraz z truflą letnią (Hilszczańska i Rosa-Gruszecka, 2013; Hilszczańska i in, 2013a). Wzrost ich liczby był pozytywnie skorelowany z zawartością wapnia w glebie (ryc. 13.). Niewykluczone, że warunki glebowe stymulujące rozwój mykoryz trufli letniej, wywołując zmiany w strukturze populacji mykoryz faworyzują rozwój mykoryz *Tuber* spp. (Garcia-Montero i in., 2008; 2012).

Procesy rozwoju mykoryz *Tuber* spp. a następnie ich owocników są w niewielkim stopniu poznane w warunkach sztucznych upraw (Bencivenga i Baciarelli Falini, 2012). Ricard (2003) i Granetti i in. (2005) podkreślają brak wiedzy w odniesieniu do wpływu własności fizyko- chemicznych gleb na występowanie owocników w naturalnych drzewostanach. Utrudnieniem dla procesu poznawczego jest brak ujednoliconych norm analiz glebowych stosowanych w Europie. W każdym kraju stosowane są inne jednostki pomiaru zawartości pierwiastków (Thomas i Sutton, 2011), w związku z czym składniki chemiczne gleb z różnych regionów geograficznych mogą być porównywane w bardzo wąskim zakresie (Hilszczańska i in., 2013b). Szereg kolejnych elementów dotyczących biologii trufli letniej, a szczególnie sposobu rozmnażania, wciąż pozostaje niewyjaśniony mimo intensywnie prowadzonych prac badawczych (Gajos i Hilszczańska, 2013).

1. **Podsumowanie i wnioski**

Wykonane badania wykazały, że różnorodność grzybów z rodzaju *Tuber* jest większa niż wcześniej zakładano (Ławrynowicz, 1988). *T. aestivum* występuje w warunkach Polski na glebach rędzinowych i czarnoziemach wykształconych na utworach czwartorzędowych. Sprzyjające rozwojowi *T. aestivum* są grądy i świetliste dąbrowy. Wśród roślin runa wskaźnikiem występowania trufli na ogół są storczyki (*Epipactis* spp., *Cephalanthera* spp i *Cypripedium calceolus*). Jednym z czynników zapewniających ochronę i restytucję trufli letniej jest zakładanie ogrodów truflowych na gruntach sprzyjających uprawie tego gatunku. W drzewostanach naturalnych koniecznym jest zapewnienie odpowiednich warunków świetlnych oraz utrzymywanie różnorodności roślinności runa. Biorąc powyższe stwierdzenia pod uwagę, można przyjąć następujące wnioski:

1. Odpowiednie dla rozwoju owocników *T. aestivum* Warunki występują w glebach typu rędzina i czarnoziem, bogatych w wapń i potas, o niskiej zawartości azotu i fosforu.
2. Zawartość wapnia jest kluczowym czynnikiem w rozwoju owocników *T. aestivum.*
3. Drzewostany charakteryzujące się udziałem wielu gatunków roślin – gospodarzy *T. aestivum*, na przykład grądy stanowią właściwe siedlisko również dla innych gatunków *Tuber.*
4. Udział mykoryz *T. aestivum* u dębu i leszczyny we właściwie założonych uprawach eksperymentalnych kształtuje się na optymalnym poziomie, co pozwala prognozować pojawienie się owocników w niedalekiej przyszłości (3-4 lat).

**Literatura**

Agerer R. 1987-2006. Colour Atlas of Ectomycorrhizae, Einhorn Verlag, Schwabisch-Gmünd.

Agerer R., Rambold G., 2004-2007. DEEMY-An information system for characterization and

determination of ectomycorrhizae, http://www.deemy.de, Munich, Ludwig Maximilians University.

Agueda B., Agerer R., Miguel A.M., Parlade J. 2008. Quercirhiza quadratum: a revision of the characters and identity of the AD type ectomycorrhiza. I In: „*3-rd Spoleto International Congress on Truffles*”, 25-29 November, 2008, Spoleto-Italy, Book of Abstracts. p. 39.

Bencivenga M., Baciarelli Falini L. (2012). Manuale di Tartuficoltura. Esperienze di coltivazionedei tartufi in Umbria. Regione Umbria, p 130.

Benucci G.M.N., Raggi L., Albertini E., Grebenc T., Bencivenga M., Falcinelli M., Di Massimo G. 2011. [Ectomycorrhizal communities in a productive *Tuber aestivum* Vittad. orchard: composition, host influence and species replacement](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2010.01039.x/abstract). FEMS Microbiol. Ecol. 76 (1): 170–184.

Benucci G.M.N., Gogan Csorbai A., Di Massimo G., Baciarelli Falini L., Bencivenga M., Donnini D. 2012. Mycorrhization of *Quercus robur* L. and *Corylus avellana* L. seedlings with *Tuber macrosporum* Vittad. Mycorrhiza 22 (8): 639-646.

Benucci, G.M.N., Bonito, G., Baciarelli Falini, L., Bencivenga, M., 2012. Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoinensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad and *Tuber borchii* Vittad. Mycorrhiza 22, 383–392.

Bertini L., Amicucci A., Agostini D., Polidori E., Potenza L., Guidi C., Stocchi V. (1999) A new pair of primers designed for amplification of the ITS region in *Tuber* species. FEMS Microbiology Letters 173 (1), 239–245.

Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM., Vilgalys R (2010). A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. Molecular Ecology 19: 4994–5008.

Callot, G. 1999. La Truffe, la Terre, la Vie. Institut National de la Recherche Agronomique,

Paris, France.

Chevalier G., Frochot H. 1997. La truffe de Bourgogne. Petrarque, Levallois-Perret, France.

Chevalier G. 2009. The truffle of Europe (*Tuber aestivum* Vitt.): ecology and possibility of cultivation. Abstracts of First Conference on the “European” Truffle *Tuber aestivum/uncinatum*, 6-8.11.2009, Faculty Centre of Biodiversity, University of Vienna.

Chevalier, G., 2010. La truffe d’ Europe (Tuber aestivum): limites geographiques, ecologie et culture. Austrian Journal of Mycology 19, 249–259.

Chevalier G. 2012. Europe, a continent with high potential for the cultivation of the Burgundy truffle (*Tuber aestivum/uncinatum*). Acta Mycologica Vol. 47 (2): 127-132.

Chevalier, G., Sourzat, P., 2012. Soils and Techniques for Cultivating *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum* in Europe, in: Zambonelli, A., Bonito, G.M. (Eds.), Edible Ectomycorrhizal Mushrooms, Soil Biology 34, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 160- 190 Part II.

Dodd J. C., Thomson B. D. 1994.The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 159:149-158.

Ericksson J., Andersson A., Andersson R. 1997. Tillståndet i Svensk Åkermark (Naturvårdsverket Rapport No. 4778). Naturvårdsverket Förlag, Stockholm.

Estrada, J. M. and Alcántara, C. 1990. La Tòfona.Departament d’Agricultura, Ramaderia i Pesca,Generalitat de Catalunya. Barcelona, Spain.

Gajos M., Hilszczańska D. 2013. Research on truffle: scientific journal analysis. Scientific Research and Essays Vol. 8 (23): 1837-1847.

Garcia-Montero, L.G., Diaz, P., Martin-Fernandez, S., Casermeiro, M.A., 2008. Soil factors that favour the production of *Tuber melanosporum* carpophores over other truffle species: a multivariate statistical approach. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil and Plant science 58 (4), 322-329.

Garcia-Montero L.G., Valverde-Asenjo I., Moreno D., Diaz P., Hernando I., Menta C., Tarasconi K., 2012. Influence of Edaphic Factors on Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: New Hypotheses on Soil Nutrition and C Sinks Associated to Ectomycorrhizae and Soil Fauna Using the Tuber Brule Model, in: Zambonelli, A., Bonito, G.M. (Eds.), Edible Ectomycorrhizal Mushrooms, Soil Biology 34, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 83- 105 Part I.

Gärdenfors U., 1994: Eken-utnyttjad av tusentals organismer. In: Olsson U (ed) Ekfrämjandet 50 är. Ekfrämjandet och Skogsvårdsstyrelsen Ronneby: 77-82.

Granetti B., De Angelis A., Materozzi G. 2005 Umbria, terra di tartufi. Regione Umbria, Terni.

Hall I., Brown G., Byars J., 1994: The black truffle. New Zealand Institute for Crop and Food Research. Christchurch, New Zealand.

Hall I., Buchanan P. K., Yun W., Cole A. L. J., 1998: Edible and Poisonous Mushrooms. An Introduction. New Zealand Institute for Crop and Food Research. Christchurch, New Zealand.

Hall I., Brown G., Zambonelli A., 2007. Taming the truffle. The history, lore, and science of the ultimate mushroom.Timber press, Oregon, USA.

Hilszczańska D., Sierota Z., Palenzona M., 2008. New *Tuber* species found in Poland. Mycorrhiza Vol. 18, No. 4: 223-226.

Hilszczańska D., Sierota Z. 2010. First attempt towards cultivation of *Tuber aestivum* in Poland. Austrian Journal of Mycology, Vol. 19: 209-212.

Hilszczańska D., Sierota Z. 2012. Content of mineral nutrients in Scots pine seedlings inoculated with Thelephora terrestris.Zawartość składników pokarmowych w igłach sadzonek sosny zwyczajnej inokulowanej *Thelephora terrestris*. Sylwan156 (5): 391−400.Hilszczańska D., Rosa-GruszeckaA., Sikora K, Szmidla H. 2013a. First report of *Tuber macrosporum* occurrencein Poland. Scientific Research and Essays Vol. 8 (23): 1096-1099.

Hilszczańska D., Rosa A. 2013. Środowisko glebowe drzew leśnych tworzących mykoryzy z grzybami *Tuber* spp. Materiały konferencyjne- „Biologia i ekologia roślin drzewiastych”, Kórnik-Poznań 21-23.10.2013. Instytut Dendrologii PAN w Kórniku, ss. 145-146.

Hilszczańska D., Rosa-GruszeckaA., Szmidla H. 2013b. Is Nida’s Basin habitat conducive to *Tuber aestivum* Vittad. cultivation? Wulfenia, Vol. 20 (12):14-30.

Hobbie E. A., Colpaert J. V. 2003. Nitrogen availability and colonization by mycorrhizal fungi correlate with nitrogen isotope patterns in plants, New. Phytologist 157:115-126.

Jeandroz S, Murat C, Wang YJ, Bonfante P, Le Tacon F (2008). Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus tuber the ‘true truffles’. Journal of Biogeography 35: 815–829.

Leski T., Pietras M., Rudawska M. 2009. Ectomycorrhizal fungal communities of pedunculate and sessile oak seedlings from bare-root forest nurseries. Mycorrhiza DOI 10.1007/s00572-009-0278-6.

Marjanović Z, Grebenc T, Markovic M, Glisic A, Milenkovic M (2009) Ecological specificities and molecular diversity of truffles (genus Tuber) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. Sydowia 62: 67–87.

Mello A., Murat C., Bonfante P. 2006. Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. FEMS Microbiol. Lett. 260:1-8.

Ławrynowicz M (1988) In: Flora Polska. Rośliny zarodnikowe Polskii ziem ościennych. Grzyby (Mycota). Tom XVIII, Instytut Botaniki PAN, PWN, Warszawa-Kraków: 161 ss.

Ławrynowicz M., Krzyszczyk T., Fałdziński M. 2008. Occurance of black truffles in Poland. Acta Mycologica Vol. 43 (2): 143-151.

Malicki M.A., Plagge R., Roth C.H., 1996: Improving the calibration of dielectric TDR soil

moisture determination taking into account the solid soil. European Journal of Soil Science, 47: 357-366.

Malicki M.A., Walczak R.T., Kokot J., Skierucha W.M., Kotliński J., Sobczuk H.A., 1998:

Monitoring wilgotności, zasolenia i temperatury gleby. X Szkoła „Fizyka z elementami agrofizyki”, Lublin, 22-23 września 1998: 33-54.

Pacioni G., Comandini O., 1999. Tuber. In: Cairney JWG, Chambers SM (eds.) Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile. Springer, Berlin, Heiderberg, Germany, pp 163-186, Chap. 6.

Pegler D.N, Spooner B.M., Young T.W.K., 1993. British truffles. A revision of British hypogeous fungi. Royal Botanical Gardens, Kew.

Petit R.J., Brewer S., Bordacs S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U.M., van Dam B.C., Deans J.D.,Espinel S., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., Konig A.O., Lowe A.J., Madsen S.F.,Matyas G., Munro R.C., Popescu F., Slade D., Tabbener H.,de Vries S.M.G., Ziegenhagen B., de Beaulieu J.-L., Kremer A., 2002. Identification of refugia and postglacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA andfossil pollen evidence. For. Ecol. Manage. 156, 49–74.

PB-14 ed. 2 of 1 January 2010 Extraction of trace elements using inductively coupled argon-plasma spectrometry following mineralisation in chloric (VII) acid. p 8.

PN-ISO 10390 (1997). Soil Quality. Determination of pH. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 15 p.

PN-ISO 10694 (2002). Soil Quality. Determination of organic and total carbon after dry combustion (“elementary analysis”). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 12 p.

PN-ISO 13878 (2002). Soil Quality. Determination of total nitrogen content by dry combustion (“elemental analysis”). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 10 p.

PN-ISO 11277 (2005). Soil quality. Determination of particle size distribution in mineral soil material. Method by sieving and sedimentation. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 46p.

Reyna S. 2007. Trufficultura - fundamentos y technizas. Valencia, Mundi-Prensa.

Ricard J M (2003). La truffe, Guide technique de trufficulture. CTIFL, Párizs, p. 268.

Riousset I., Riousset G., Chevalier G., Bardet M. C. 2001. Truffes d’Europe et de Chine, INRA, Paris, 188 pp.

Rosa-GruszeckaA., Hilszczańska D., Szmidla H. 2014. Warunki środowiskowe sprzyjające występowaniu trufli (*Tuber* spp.) na historycznych stanowiskach w Polsce. Leśne Prace Badawcze, Vol. 75 (1) (w druku)

Samils N. 2002. The Socioeconomic Impact of Truffle Cultivation in Rural Spain-and its potential to encourage pioneer cultivation in Sweden. Master thesis 20c, SLU Uppsala, Sweden.

Selosse M. A., Faccio A., Scappaticci G., Bonfante P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. Microbial Ecology Vol. 47: 416-426.

Smith SE, Read DJ (2008). Structure and development of ectomycorrhizal roots. In: Mycorrhizal symbiosis. Third Edition, Academic Press, Harcort Brace and Company Publishers.

Stobbe U, Büntgen U, Sproll, L, Tegel W, Egli S. 2012. Spatial distribution and ecological variation of re-discovered German truffle habitats. Fungal Ecology 5 (5): 591–599.

Thomas P., Sutton H. L. 2011. A unified approach to soil structural analysis to gain a deeper insight into the ecology of the European truffle. 3-rd congress of the European scientific group *Tuber aestivum/Tuber uncinatum*. Nancy- France-7-12.11.2011: 18 p.

Wallander H. 1992.Regulation of ectomycorrhiza symbiosis in *Pinus sylvestris* L. seedlings. Influence of mineral nutrition. Ph. D. Th. Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Forest Mycology and Pathology, Uppsala, Sweden.

Weden C., Ericsson L., Danell E. 2001. Tryffelnyheter fran Gotland [Research on *Tuber aestivum* syn. *T. ucinatum*, and *T. mesentericum* reported from Sweden for the first time]. Svensk Botanisk Tidskrift 95.

Weden C., 2004. Black truffles of Sweden. Systematics, Population Sudies, Ecology and Cultivation of *Tuber aestivum*syn. *T. uncinatum.* Acta Universtatis Upsaliensis.

Weden C., Danell E., Camacho F. J., Backlund A. 2004aThe populationof hypogeous fungus *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* on the island of Gotland. Mycorrhiza 14: 19-23.

Weden C., Chevalier G., Danell E. 2004b*Tuber aestivum* (syn. *T. uncinatum*) biotopes and their history on Gotland, Sweden. Mycol Res. 108 (3): 304-310.

Weden C., Petterson L., Danell E. 2009. Truffle cultivation in Sweden: Results from *Quercus robur* and *Corylus avellana* field trials on the island of Gotland. Scandinavian Journal of Forest Research 24 (1):37-53.

Wojewoda W., Ławrynowicz M. 2006.Czerwona lista grzybów wielkoowocnikowych w Polsce. W: Mirek Z., Zarzycki K., Wojewoda W., Szeląg Z. (eds).Czerwona lista roślin i grzybów w Polsce. W. Szafer Institute of Botany, PAS, Kraków: 53 – 70.

Zarzycki, K., Trzcinska-Tacik, H., Rozanski, W., Szalag, Z., Wolek, J., Korzeniak, U. (2002). Ecological indicator values of vascular plants of vascular plants of Poland. Biodiversity of Poland, 2.