

ROMAN PACHLEWSKI, ELŻBIETA CHRUSCIAK, TERESA ZAWISTOWSKA

## WYKORZYSTANIE PRZEZ GRZYBY MIKORYZOWE AZOTU Z RÓŻNYCH FORM NAWOZÓW AZOTOWYCH STOSOWANYCH W NAWOŻENIU LASU

Zakład Gleboznawstwa i Nawożenia, Pracownia Biologii Gleb Leśnych  
Instytutu Badawczego Leśnictwa  
Warszawa-Sękocin

### WSTĘP

W warstwie próchnicznej gleb leśnych zmagazynowane są znaczne ilości azotu na ogół trudno dostępnego dla roślin z uwagi na złożoną budowę chemiczną związków, w skład których wchodzi. Mobilizacja tej formy azotu ma przebieg enzymatyczny i jest wynikiem działania mikroflory danego siedliska. Jednocześnie z mineralizacją zachodzą procesy uwsteczniania — zbiałczania azotu mineralnego, mogące w pewnych warunkach (stosunek C:N) przyczyniać się do przejściowej straty łatwo przyswajalnych dla roślin nieorganicznych związków azotu. Stosowane obecnie mineralne nawożenie lasu ma na celu zapobieżenie lub usunięcie dającego się zauważyć deficytu N w glebach leśnych.

Uwzględniając strukturę biologiczną ekosystemów leśnych, nawożenie stanowi dla leśnictwa poważny i trudny problem wymagający możliwie wszechstronnej analizy potrzeb i skutków.

Zabieg nawożenia nie pozostaje bez wpływu na rozwój grzybów mikoryzowych i ich związki mikoryzowe z drzewami. W literaturze dotyczącej tego zagadnienia [1, 3, 5] istnieją dane, z których wynika, że w glebach zawierających stosunkowo mało przyswajalnego N i P mikoryzy tworzą się obficie niż w glebach zasobnych w przyswajalne jony tych pierwiastków. Zwiększenie ilości tych elementów wyraźnie ogranicza formowanie mikoryz, a w krańcowych przypadkach może doprowadzić do ich wyeliminowania. Według niektórych badaczy radzieckich [10] dawka 20 kg/ha N ma działanie korzystne, zwłaszcza przy jednoczesnym wniesieniu 135 kg/ha P i 60 kg/ha K. Słanakis [9] na podstawie swoich doświadczeń suponuje, że stężenia azotu rzędu 159–265 mg/l

hamują lub inaktywują produkcję auksyny przez grzyby mikoryzowe, co w efekcie prowadzi do braku zawiązywania mikoryz; przy 5 i 51 mg/l N mikoryzy wykształcały się prawidłowo.

Zapotrzebowanie na azot wśród grzybów mikoryzowych nie odbiega zasadniczo od wymagań innych *Basidiomycetes*. Badania prowadzone w tym zakresie przez wielu autorów [3] wykazały, że grzyby te rosną lepiej w obecności soli amonowych niż azotanów, mając ograniczone możliwości redukcji tych ostatnich ze względu na brak reduktazy azotanowej. Azotyny są równie źle przyswajalne. Mocznik, aminokwasy, kwasy nukleinowe, hydrolizaty białka są dla niektórych gatunków grzybów symbiotycznych odpowiednim źródłem azotu. Zdolność wykorzystania pewnych związków może być uzależniona dodatkowo właściwym źródłem węgla, na przykład winian amonu jest trudniej przyswajalny przez *Cenococcum graniforme* w obecności oligosacharydów niż glukozy [8].

Założeniem pracy była próba ustalenia w warunkach laboratoryjnych, w oparciu o wytyczne nawożenia szkólek leśnych [12], które z zalecanych nawozów i w jakich dawkach są optymalne dla wybranych symbiotów sosny. W dalszych bowiem planach przewiduje się porównawcze doświadczenia nad wpływem nawożenia na aktywność mikoryzową tychże grzybów w warunkach syntezy w czystych kulturach i doświadczeniach wazonowych.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia dotyczyły dwóch podstawowych zagadnień:

— analizy wzrostu grzybów testowych na podłożach z różnymi związkami azotu,

— ujawnienia potencjalnych właściwości enzymatycznych wybranych szczepów.

**Kultury grzybów.** Obserwacjami objęto zestawione niżej gatunki:

Gatunek	Nr lub symbol szczepu kolekcji <sup>1</sup>	Typ mikorozy z sosny <sup>2</sup>	
		ekto-	ektendo-
<i>Amanita muscaria</i> (L.ex Fr./Hooker	1/182	+	—
<i>Cenococcum graniforme</i> (Sow./Ferd. et Winge	3543 4931	+	—
Izolat z ektendomikoryzy sosny	MrgX	—	+
<i>Paxillus atrotomentosus</i> (Batsch./Fr.	0260	—	—

<sup>1</sup> Szczepy z kolekcji Pracowni Mikrobiologii Leśnej IBL w Jeziorach.

<sup>2</sup> Według [11, 6, 7].

<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr.	0211	+	—
<i>Russula emetica</i> Fr.	2981	+	—
<i>Suillus bovinus</i> (L.ex Fr./O.Kuntze	1941	+	—
<i>S. luteus</i> (L.ex Fr./S.F.Gray	1155	+	—
<i>Tricholoma albobruneum</i> (Pers.ex Fr.)	1951	+	—

## Kummer

Źródła azotu. Spośród nawozów stosowanych w nawożeniu szkółek wybrano: saletrę wapniową, saletrę amonową, siarczan amonu, mocznik. W praktyce stosuje się dawki od 0,1 do 0,15% N w warstwie ornej; powyżej 0,37–45% N w glebie uważa się, że nawożenie jest zbędne. Kierując się tym założeniem zastosowano dla każdego z wymienionych związków stężenie 0,12% i 0,36% N oraz kontrolnie 0,0075% N. Ta ostatnia dawka odpowiada zawartości azotu w 500 mg winianu amonu na litr podłoża — związku uważanego za optymalne źródło N dla większości grzybów ektomikoryzowych.

Podłoża hodowlane. Kultury grzybów jako inokulat hodowano w ciągu 10–14 dni w 25°C na płytkach Petriego z pożywką agarową o składzie:

— glukoza	— 20 g,
— maltoza	— 5 g,
— winian amonu	— 0,5 g,
— MgSO <sub>4</sub>	— 0,5 g,
— KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	— 1 g,
— cytrynian żelaza 1%	— 0,5 ml,
— ZnSO <sub>4</sub> — (1:500)	— 0,5 ml,
— tiamina	— 50 µg,
— agar	— 15 g,
— woda destylowana	— 1000 ml.

Jałowym korkoborem wycinano krążki grzybni o średnicy 0,8 cm i przenoszono je na podłoża z testowanymi źródłami N. Poszczególne związki azotu w trzech różnych dawkach każdy i kontrolnie winian amonu w dawce 0,0075% dodawano do pożywki podstawowej:

— glukoza	— 20 g,
— maltoza	— 5 g,
— tiamina	— 50 µg,
— agar	— 15 g,
— woda destylowana	— 1000 ml.

Podłoża hodowlane rozlewano do płytek, inokulowano krążkami grzybni i inkubowano 14 dni w temperaturze 25°C. Każdy wariant doświadczenia wykonany był w dwóch powtórzeniach. Intensywność wzrostu oceniano na podstawie pomiaru liniowego średnicy grzybni w trakcie doświadczenia i po jego zakończeniu. Dla dwóch spośród badanych

szczepów — *Cenococcum graniforme* i *Rhizopogon luteolus* — wykonano dodatkowo pomiar suchej masy grzybni, którą uzyskano na analogicznych podłożach płynnych. Hodowle na tych pożywkach prowadzono w ciągu 28 dni w 25°C. Grzybnię odsączano, suszono w temperaturze 75°C do stałej wagi i ważono.

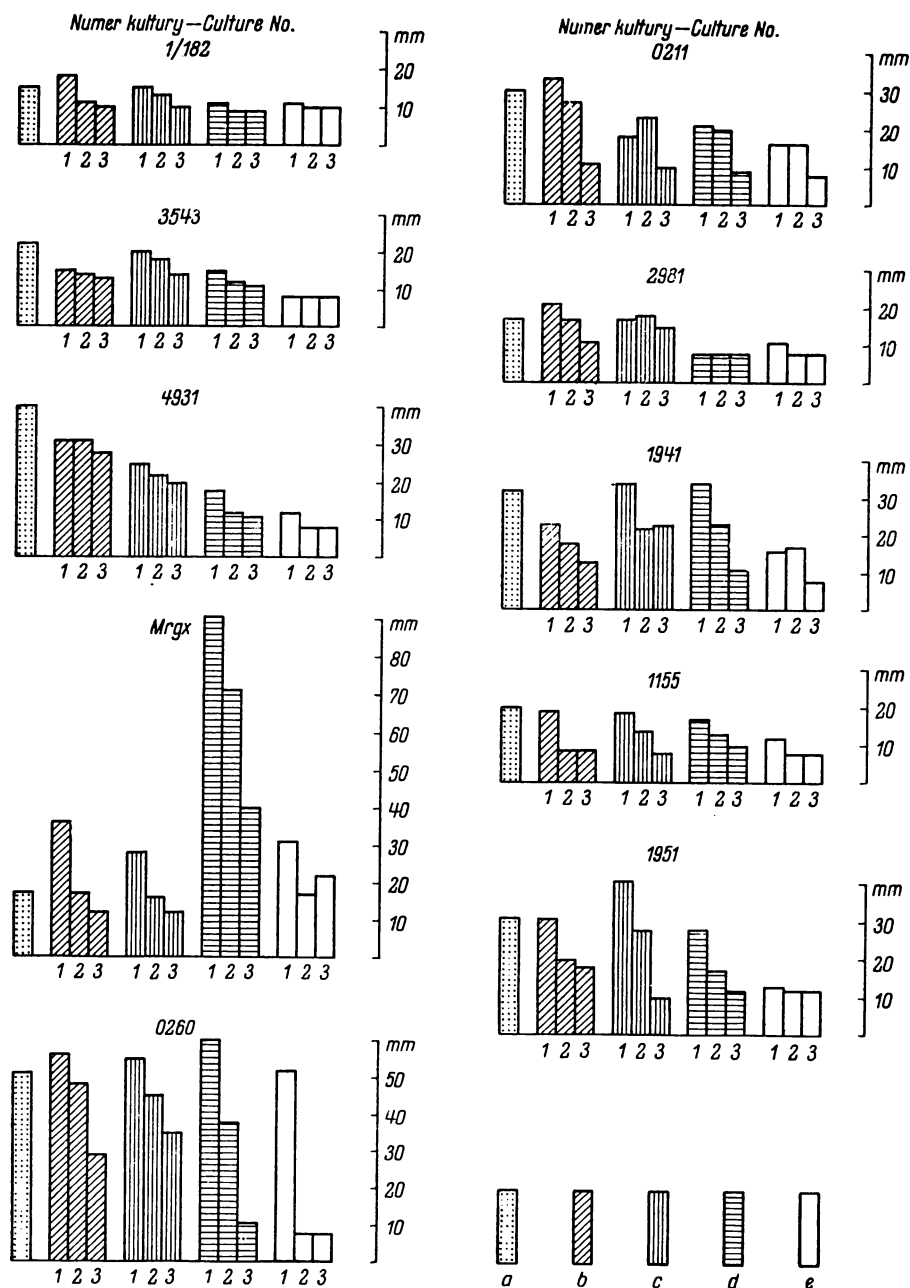
Określanie właściwości enzymatycznych. Aktywność enzymatyczna grzybów wyższych jest dobrym wskaźnikiem ich przynależności do określonej grupy ekologicznej [4]. W ramach doświadczeń podjęto próbę określenia zdolności niektórych grzybów mikoryzowych do mineralizacji wybranych związków azotowych. Obserwacje szły w kierunku ujawnienia grzybów zdolnych do dezaminacji asparaginy, proteolizy oraz rozkładu mocznika. Rozkład asparaginy badano na podłożu według Girard i Rougieux [2] na podstawie reakcji barwnej wydzielonego amoniaku z odczynnikiem Nesslera. Jako kryterium rozkładu białka przyjęto upłynnienie żelatyny. Test na ureazę wykonywano stosując zmodyfikowane podłoże według Christensena o składzie:

- glukoza — 1 g,
- NaCl — 5 g,
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 2 g,
- woda destylowana — 1000 ml.

Po 10 ml pożywki rozlewano do probówek, jałowiono 20 minut w 115°C, dodając aseptycznie po ostudzeniu 1 ml 20-procentowego wodnego roztworu mocznika przesączonego przez sączek bakteriologiczny Schotta G5. Wskaźnikiem wytworzonego z mocznika amoniaku był roztwór 0,1-procentowy błękitu bromotymolowego bądź czerwieni fenolowej. Zmiana odczynu z kwaśnego na alkaliczny powodowała pojawienie się błękitnego lub czerwonego zabarwienia podłoża (kontrola żółta).

#### WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, iż zapotrzebowanie poszczególnych grzybów mikoryzowych na azot z różnych jego form związków kształtowało się odmiennie. Wyniki przedstawiono na rys. 1 i 2. I tak w badaniach winian amonu okazał się optymalnym związkiem dla *Suillus luteus* i *Cenococcum graniforme* (dla obu szczepów tego gatunku). Na podłożu z siarczanem amonu w dawce równoważnej winianowi najobfitszy wzrost notowano dla grzybów *Amanita muscaria*, *Rhizopogon luteolus* i *Russula emetica*. Azotan amonu przy koncentracji 0,0075% N był najkorzystniejszym związkiem dla *Tricholoma albobrunneum* i równie dobrym jak  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  dla *Suillus bovinus*. Azotan wapnia wprowadzony w najniższym stężeniu powodował najlepszy wzrost *Paxillus atrotomentosus* i grzyba ektendomikoryzowego MrgX. Mocznik,

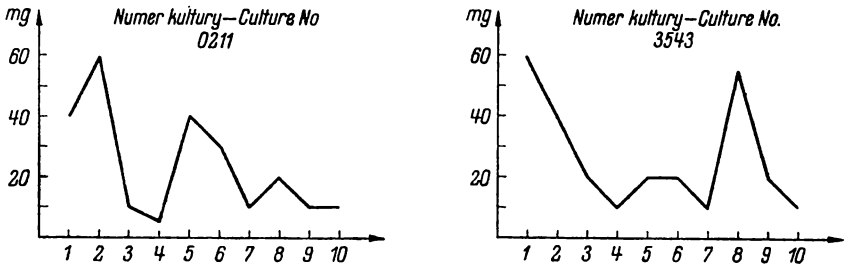


Rys. 1. Średnica grzybni

a -  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  - 0,0075% N, b -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , c -  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , d -  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , e -  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$ ; 1 - 0,0075% N, 2 - 0,12% N, 3 - 0,36% N

Mycelium diameter

explanation - see in Polish



Rys. 2. Sucha masa grzybni

1 —  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  — 0,0075% N, 2 —  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 0,0075% N, 3 —  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 0,12% N, 4 —  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 0,36% N, 5 —  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,0075% N, 6 —  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,12% N, 7 —  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,36% N, 8 —  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  — 0,0075% N, 9 —  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  — 0,12% N, 10 —  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  — 0,36% N

Mycelium dry matter

explanation — see in Polish

Tabela 1

Aktywność enzymatyczna grzybów mikoryzowych  
Enzymatic activity of mycorrhizal fungi

Gatunek - Species	Nr kolekcji lub symbol szczepu No. of collection or the strain sign	Rozkład - Decomposition of		
		mocznika urea	białka protein	asparaginy asparagine
<i>Amanita citrina</i> /Schff./ S.F. Gray	0583	-	+	-
	0587	-	+	-
<i>A. muscaria</i> /L.ex Fr./ Hooker	1/182	±	-	-
<i>A. verna</i> /Bull.ex Fr./ Pers.ex Vitt.	0141	-	+	-
<i>Boletus edulis</i> Bull. ex Fr.	1239	+	-	+
<i>Cenococcum graniforme</i> /Sow./ Ferd. et Winge	3543	+	-	-
	4931	+	-	+
<i>Coltricia perennis</i> /L. ex Fr./ Murr.	1196	+	-	-
<i>Hebeloma mesophaeum</i> /Pers. ex Fr./ Quel	3037	+	±	+
Izolat z ektendomikoryzy sosny	MrgX	+	-	-
<i>Lactarius quietus</i> Fr.	1377	+	-	±
<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr.	0211	++	++	+
<i>Russula emetica</i> Fr.	2981	+	-	+
<i>Suillus bovinus</i> /L. ex Fr./ O. Kuntze	1941	+	-	+
<i>S. granulatus</i> /L. ex Fr./ O. Kuntze	1444	+	-	-
<i>S. luteus</i> /L. ex Fr./ S.F. Gray	0112	++	-	±
	1155	-	-	-
<i>S. flavidus</i> /Fr./ Sing	0164	+	-	+
	0166	+	-	+
<i>Tricholoma albobrunneum</i> /Pers. ex Fr./ Kummer	1951	-	+	+
<i>T. flavovirens</i> /Pers. ex Fr./ Lund	0349	±	-	+
<i>T. imbricatum</i> /Fr. ex Fr./ Kummer	1962	-	±	-
<i>T. pessundatum</i> /Fr./ Lund	2870	-	-	-

Stopień rozkładu: ++ bardzo intensywny      Decomposition degree: ++ highly intensive  
 + intensywny      + intensive  
 ± słaby      ± weak  
 - brak      - lack

ogólnie biorąc, był najgorszym źródłem N. Względnie dobrze był wykorzystywany przez szczep mikoryzowy MrgX i grzyb niemikoryzowy *P. atrotomentosus*.

Stężenia azotu 0,12 i 0,36% dawały na ogół gorszy efekt wzrostu niż 0,0075%.

Wartość suchej masy grzybni potwierdziła wspomniany wyżej fakt, iż winian amonu jest optymalnym związkami dla *C. graniforme*, a siarczan amonu dla *Rh. luteolus*. Zaobserwowano pewne różnice w wykorzystaniu przez *C. graniforme* mocznika w płynnym podłożu w porównaniu ze stałym na korzyść tego pierwszego.

Ograniczoną aktywność enzymatyczną grzybów mikoryzowych w zestawieniu z innymi podstawczakami stwierdził m. in. Lundberg [4]. Wiadomo jednak, że wytwarzają one szereg hydrolaz [10]. Spośród zbadanych 23 szczepów grzybów mikoryzowych (tab. 1) tylko 8 nie wytwarzało ureazy. Były to izolaty należące głównie do rodzaju *Amanita* i *Tricholoma*. Szczególnie aktywnie mocznik był rozkładany przez *Rh. luteolus* i jeden ze szczepów *S. luteus*; jedynie u 7 szczepów stwierdzono właściwości proteolityczne. Także pod tym względem najaktywniejszy był *Rh. luteolus*.

Większość bakterii i grzybów glebowych bardzo szybko (w ciągu 2–4 dni) amonifikuje asparaginę. Aktywność enzymatyczna zbadanych grzybów mikoryzowych jest pod tym względem raczej ograniczona: tylko około 50% szczepów rozkładało asparaginę z wydzieleniem amoniaku.

## WNIOSKI

1. Dawki azotu stosowane w nawożeniu szkólek leśnych, użyte do hodowli czystych kultur grzybów mikoryzowych, okazały się zbyt wysokie.

2. Aktywność enzymatyczna tej grupy grzybów jest stosunkowo ograniczona, przy czym najpowszechniej notowano wytwarzanie ureazy.

3. Pomimo zdolności większości zbadanych szczepów grzybów mikoryzowych do wytwarzania ureazy mocznik okazał się w warunkach przeprowadzonych doświadczeń najmniej przydatnym dla nich źródłem azotu.

4. Szczep ektendomikoryzowy MrgX, główny komponent związków mikoryzowych siewek sosny w szkólkach, wykazał wśród grzybów mikoryzowych stosunkowo dużą zdolność asymilacji azotu z mocznika.

## LITERATURA

- [1] Björkman E.: Über die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. Symb. Bot. Upsalensis 6, 1942, 1-190.
- [2] Gerard H., Rougieux R.: Techniques de microbiologie agricole. Dunod, Paris 1967.
- [3] Harley J. L.: The biology of mycorrhiza. London 1959.
- [4] Lundeberg G.: Utilisation of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. Studia Forestalia Suecica 79, 1970, 1-95.
- [5] Melin E.: Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. Abderhaldens Handb. Biol. Arbeitsmethoden 11, 1936, 1015-1108.
- [6] Pachlewski R., Pachlewska J.: Badania nad grzybami mikoryzowymi siewek sosny (*Pinus silvestris* L.) w szkółkach leśnych. Prace IBL 395, 1971, 4-65.
- [7] Pachlewski R., Pachlewska J.: Studies of symbiotic properties of mycorrhizal fungi of Pine (*Pinus silvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar. Warsaw 1974.
- [8] Palmer J. G.: Techniques and procedures for culturing ectomycorrhizal fungi. In "Mycorrhizae" (E. Hacsckaylo ed.), USDA Forest Serv. Misc. Publ. No. 1189, Washington 1971, 132-144.
- [9] Slankis V.: Formation of ectomycorrhizae of forest trees in relation to light, carbohydrates, and auxins. In "Mycorrhizae" (E. Hacsckaylo ed.) USDA Forest Serv. Misc. Publ. No. 1189, Washington 1971, 151-167.
- [10] Szemachanowa N. M.: Mikotrafia driewiesnych porod. Moskwa 1962.
- [11] Trappe J. M.: Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot. Rev. 28, 1962, 538-606.
- [12] Walendzik J.: Wytuczne nawożenia szkólek leśnych. IBL, Warszawa-Sękocin 1975, 1-33.

Р. ПАХЛЕВСКИ, Е. ХРУСЬЦТАК, Т. ЗАВИСТАВСКА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКОРИЗОВЫМИ ГРИБАМИ  
РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ УДОБРЕНИИ ЛЕСОВ

Отделение почвоведения и удобрения, Исследовательский институт лесоводства,  
Лаборатория биологии лесных почв, Варшава-Сенкоцин

Резюме

Предпосылкой работ являлось установление отзывчивости микоризовых грибов на азотные удобрения рекомендуемые в директивах по удобрению лесопитомников, чтобы выявить оптимальные источники азота и их дозы для развития симбиотических грибов сосны.

В опытах проведенных на чистых культурах применялась кальциевая селитра, аммиачная селитра, сульфат аммония и мочевины в дозах 0,0075%, 0,12% и 0,36% N. В контроле употреблялся виннокислый аммоний (тарترات аммония), который обычно применяется в питательных смесях для изучаемой группы грибов в количестве 500 мг на литр субстрата, что эквивалентно концентрации 0,0075% N. Наблюдениям были подвергнуты грибы из видов *Amanita*, *Cenococcium*,



*Paxillus, Rhizopogon, Russula, Suillus, Tricholoma* и изолированный из эктендомикоризы сосны MrgX.

Интенсивность роста оценивалась на основании измерений диаметра мицелия, а для двух штаммов по весу сухой массы мицелия.

В опытах пытались установить в лабораторных условиях способность микоризовых грибов к дезаминированию аспарагина, а также к разложению белков и мочевины. Тестовые испытания были проведены на вышеперечисленных видах грибов и на видах *Boletus, Coltricia, Hebeloma, Lactarius*.

Установлено, что в условиях опыта концентрация 0,12% и 0,36% азота обуславливала менее благоприятный эффект роста, чем доза 0,0075%.

Энзиматическая активность грибов была относительно невелика. Несмотря на способность большинства испытанных штаммов вырабатывать уреазу, мочевина оказалась менее пригодным для них источником азота. Эктендомикоризовый штамм MrgX показывал сравнительно наибольшую способность к усвоению азота из мочевины.

R. PACHLEWSKI, E. CHRUSCIAK, T. ZAWISTOWSKA

#### UTILIZATION BY MYCORRHIZAL FUNGI OF NITROGEN FROM VARIOUS NITROGEN COMPOUNDS USED FOR FOREST FERTILIZATION

Department of Soil Science and Fertilization the Forestry Research Institute,  
Warszawa-Sękokocin

#### Summary

The objective of this study was to establish the response of mycorrhizal fungi to nitrogen fertilizers recommended in the forest nursery fertilization guide, and subsequently, to determine, which nitrogen sources are the best and which are the optimal fertilizer rates for symbiotic fungi of pine.

In the experiments, carried out on pure cultures, the following compounds were applied as sources of nitrogen: calcium nitrate, ammonium nitrate, ammonium sulphate and urea in rates: 0.0075%, 0.12%, 0.36% of N. Control medium contained ammonium tartrate — a compound being usually added to synthetic media for the investigated group of fungi (in quantity of 500 mg/l of medium, what is equal to the concentration of 0.0075%). This study covered the following fungi genera: *Amanita, Cenococcum, Paxillus, Rhizopogon, Russula, Suillus, Tricholoma* and an isolate from ectendomycorrhiza of pine MrgX.

Growth intensity was evaluated on the basis of mycelium diameter measurement, and for two strains, on the basis of mycelium dry matter.

In these experiments an attempt was also made to determine under laboratory conditions, the ability of mycorrhizal fungi to desaminate asparagine and decompose protein and urea. The test was carried out on the above fungi, and additionally on some fungi which belong to the genera: *Boletus, Coltricia, Hebeloma, Lactarius*.

It has been found that under experiment conditions, concentrations of nitrogen: 0.12% and 0.36%, generally resulted in a restrained growth. Enzymatic activity of investigated fungi was relatively low. Although majority of the strains examined

was capable of urease synthesis, urea appeared to be least useful as a source of nitrogen for these fungi.

Ectendomycorrhiza-forming strain MrgX, the main component of mycorrhizal association of pine seedlings in nurseries, has been found to be most capable of assimilation of nitrogen from urea.

*Prof. dr Roman Pachlewski*  
*Instytut Badawczy Leśnictwa*  
*05-550 Raszyn, Sękocin*