



Examensarbete

Institutionen för skoglig mykologi och patologi

Stjälkröksvamp

(*Tulostoma brumale*)

- Stora eller små individer?



Michael Krikorev

Kandidatuppsats i biologi, C-nivå, 15 HP

Handledare: Anders Dahlberg, Institutionen för skoglig mykologi och patologi

Examinator: Nils Högberg, Institutionen för skoglig mykologi och patologi

Examensarbete 2009:6

Uppsala 2009

Innehållsförteckning

Sammanfattning	3
Abstract	3
Introduktion	4
Olika individbegrepp inom biologin	4
Vad är en svampindivid?	5
Hur stora och gamla kan svampindivider bli och vad beror det på?	6
Hur avgränsar man utbredningen av svampindivider i ett område?	7
Vilken art valdes för studien och varför?	7
Frågeställning	8
Vad kännetecknar gruppen stjälkroksvampar?	8
Beskrivning av den studerade arten stjälkroksvamp	8
Utbredning i Sverige och världen	9
Stjälkroksvampens ekologi	10
En hotad art	10
Metoder	11
Försökslokal	11
Insamling	13
Odling och korsningstest	13
Resultat	15
Diskussion	18
Tack till	19
Referenser	20

Sammanfattning

Stjälkröksvampen *Tulostoma brumale* är en rödlistad saprotrof basidiesvamp som i Sverige huvudsakligen förekommer i kalkrik sandstäppsartad miljö. Svampindividers antal, storlek och rumsliga utbredning har undersökts på en lokal i östra Skåne i syfte att få mer kunskap om den rumsliga populationsstrukturen hos arten. Test av somatisk inkompatibilitet mellan mycel framodlade från olika fruktkroppar har använts för att beräkna och avgränsa individer (geneter). Från 48 undersökta fruktkroppar kunde 27 olika geneter identifieras på en yta av 1210 m². Utbredningen av testade fruktkroppar och beräknade geneter presenteras i ett grafiskt rutnät. Geneternas storlek beräknades genom att mäta det längsta avståndet mellan fruktkroppar vars framodlade mycel var somatiskt kompatibla. Totalt påvisades 16 geneter med 2 eller fler fruktkroppar. Såsom det avspeglades av fruktkropparna var den största geneten 1,25 meter, och det kortaste avståndet mellan fruktkroppar från 2 olika geneter var 32 cm. Resultatet indikerar att populationen består av relativt små, kortlivade och sporetablerade geneter. En måttlig och kontinuerlig markstörning genom beteshävd underlättar troligen individernas sporetablering och ökar artens överlevnadsmöjligheter. Individernas uppskattade storlek, ålder och förökningsstrategier diskuteras

Abstract

The spatial population structure of the saprotrophic basidiomycete *Tulostoma brumale* was investigated at a site in south eastern Sweden. Sporocarps were mapped and collected, and somatic incompatibility tests between mycelial cultures cultivated from the sporocarps were used to identify genets. Calculations of the size and numbers of genets and their distribution were performed. The spatial distribution of the tested sporocarps and the identified genets are presented graphically in a grid. The total number of identified genets within the investigated area (1210 m²) was 27 based on 48 tested sporocarps. The size of the genets was calculated by measuring the distance between the furthestmost sporocarps with somatically compatible mycelial cultures. 16 of the 27 identified genets displayed 2 or more sporocarps. The most extensive genet, as reflected by the tested sporocarps, was 1.25 meters in diameter. The shortest distance between sporocarps from different genets was 32 cm. The results indicate that the population contains of relatively small, short-lived and spore established genets. A moderate but continuous disturbance by (preferably horse) grazing can maintain open sand bares that probably favour the establishment of new genets from spores. The size, age and life strategies of genets are discussed.

Introduktion

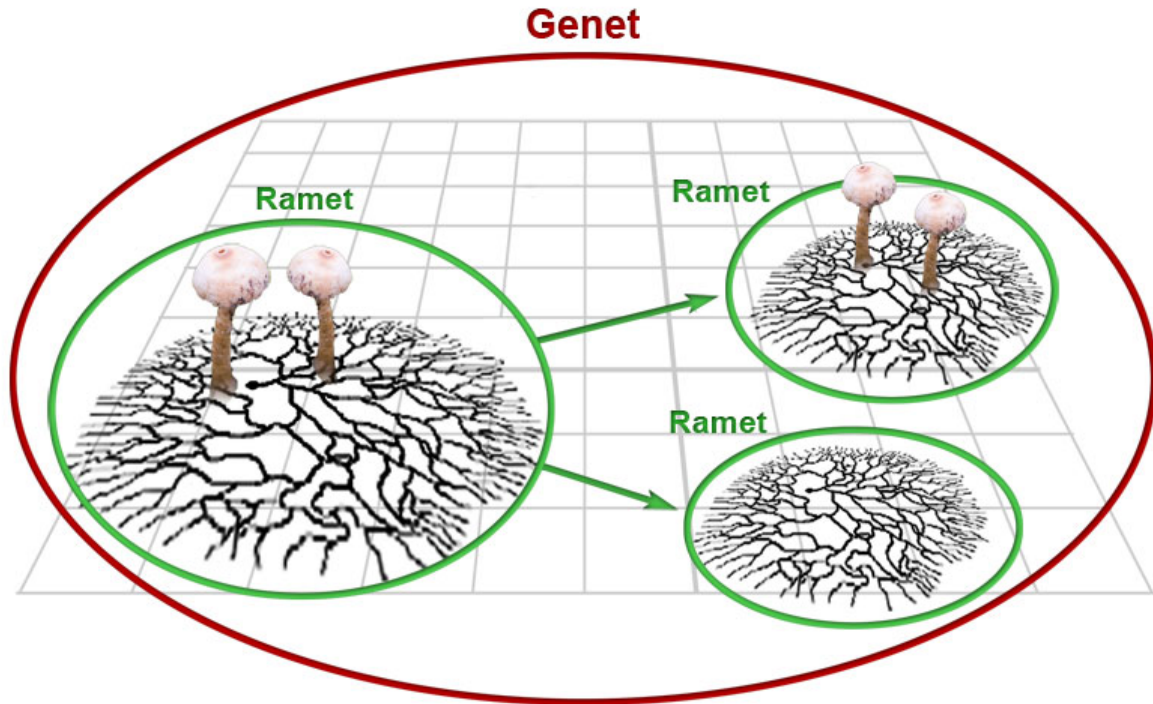
Olika individbegrepp inom biologin

Vad är en individ? Begreppet *individ* används på flera olika sätt och det saknas en entydig definition på vad som menas (se t ex Wilson, 1999; Wilson, 2007). I biologiska sammanhang avser man ofta en encellig eller flercellig organism med en unik genotyp och som har en potentiell förmåga att leva ett självständigt liv. Det är viktigt att kunna avgränsa det man definierat som individer för att kunna studera dynamiken hos arter och populationer, men det är inte alltid görligt.

Hos däggdjur kan man utan svårighet definiera en individ eftersom det är en flercellig, sexuellt reproducerande och frilevande organism som lätt går att urskilja från den omgivande miljön. Men hur bedömer man lavar som består av en svamp (mykobiont) och en alg eller blågrön bakterie (fotobiont) i symbios? En lav kan betraktas som ett litet ekosystem snarare än en individ eftersom den består av genetiskt distinkta komponenter med olika ursprung som samsas i en och samma bål. Att fotobionten i en lav kan leva självständigt oberoende av en mykobiont (se t ex Petersen, 1998) förstärker uppfattningen att lavar inte är egentliga "individer".

Ibland definierar man hela samhällen som individer, t ex en myrkoloni, som i summan av alla sina delar har en förmåga att reproducera sig men där många enskilda myror med specialiserade funktioner varken kan fortplanta sig eller leva ett självständigt liv. Organismer som reproducerar sig asexuellt kan också vara svåra att avgränsa på individnivå. T ex förökar sig bakterier genom delning eller knoppning vilket medför att alla avkomlingar utgör en klon av genetiskt identiska "individer". På samma sätt gör många växter, mossor, lavar och svampar som genom vegetativ förökning eller asexuellt bildade sporer kan bilda kloner av genetiskt identiska och frilevande enheter, s.k. *rameter* (se t ex Petersen, 1998). Dessa kan betraktas som egna "individer" eftersom de potentiellt har samma förmåga som moderindividen att leva självständigt och reproducera sig. För att beskriva klonbildande organismer och deras förekomst brukar man använda sig av individbegrepp på två olika nivåer: En *genet* är den genetiskt unika individen (har en unik genotyp), och en *ramet*, är den självständiga och genetiskt identiska enhet som härrör från en genet (Figur 1).

Mot bakgrund av den mångfald av livsformer som existerar kan man konstatera att det inte finns något entydigt och universellt individbegrepp som kan tillämpas på alla former av liv. Samtidigt är individer grundläggande enheter som är viktiga att identifiera och definiera för att kunna studera och förstå de processer som inverkar på dynamik och förändringar hos populationer och arter.



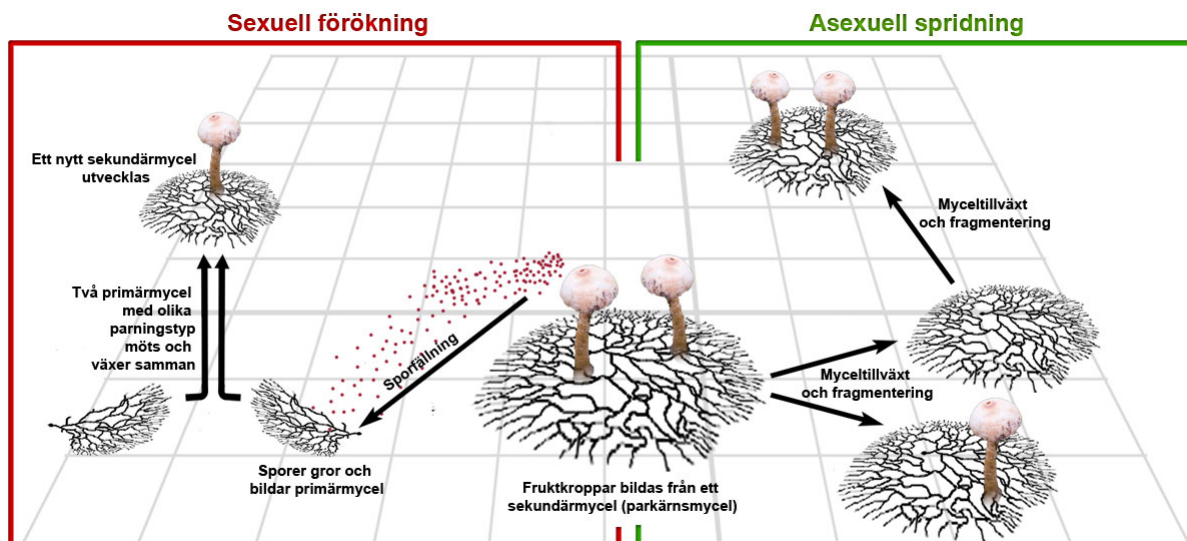
Figur 1. Geneter och rameter - individbegrepp på två nivåer

Organismer som kan föröka sig asexuellt föranleder användningen av individbegrepp på två nivåer. En ramet är en självständig frilevande enhet som bildats på asexuell väg. En genet är en genetiskt unik individ och omfattar alla härstammande rameter av samma genotyp. Hos de flesta markväxande basidiesvampar bildas rameter vegetativt genom fragmentering av det växande mycelet snarare än genom asexuellt bildade sporer.

Vad är en svampindivid?

Svampar är en artrik och mångformig organismgrupp. En del svampar är encelliga, som t ex jästsvampar, medan andra är flercelliga och bildar *hyfer*, mikroskopiskt tunna celltrådar som visserligen bara är en cell breda men kan växa sig mycket långa. Ett *mycel* är det nätverk av hyfer som utgör den huvudsakliga delen av en svampindivid. Mycelet kan vara flerårigt och växer ofta dolt i mark, ved eller annat substrat och är som regel omöjligt att upptäcka och studera ute i fält. Potentiellt, och förmodligen vanligen, fragmenteras ett mycel upp i flera självständiga och genetiskt identiska *rameter* utan fysisk kontakt med varandra. I det här arbetet används begreppet *individ* likställt med *genet*, dvs en svampindivid med en unik genotyp som potentiellt kan förekomma som en eller flera frilevande rameter (Figur 1).

Ofta är det svampens fruktkroppar som man först lägger märke till ute i skog och mark. Fruktkropparna utgör bara en del av den egentliga svampindividens livscykel (Figur 2) och uppträder vanligtvis bara under någon eller ett par veckor på året medan mycelet kan växa och finnas året runt. Det är bara undantagsvis som det enkelt går att identifiera vilka fruktkroppar som tillhör samma genet; t ex svampar som växer i tydliga häxringar, eller geneter som producerar pigmentavvikande fruktkroppar, som exempelvis albinistiska geneter (Jahn & Jahn, 1987).



Figur 2. Svampar kan föröka sig både asexuellt och sexuellt

I livscykeln hos en typisk basidiesvamp förekommer två typer av mycel:

1. Ett *primärmycel* är ett monokaryotiskt och haploit ($1n$) mycel som bildas från en haploid basidiespor.
2. Ett *sekundärmycel*, även kallat *parkärnsmycel*, är ett heterokaryotiskt ($n+n$) mycel som bildas när två kompatibla primärmycel med olika parningstyp sammanväxer.

Ett primärmycel har en enkel kromosomuppsättning ($1n$) och saknar förmåga att bilda fruktkroppar. En ny svampindivid (genet) blir till då det genetiskt unika sekundärmycelet ($n+n$) bildas för första gången. Vegetativ förökning sker vanligen genom mycelltillväxt och fragmentering av sekundärmycelet, vilket leder till flera genetiskt identiska rameter. Vissa basidiesvampar kan bilda sekundärmycel direkt från asexuellt bildade sporer (t ex klamydosporer) men det är aldrig rapporterat hos stjälkroksvamp (*Tulostoma brumale*) som är den art som är avbildad i figuren och som ingår i denna studie.

Hur stora och gamla kan svampindivider bli och vad beror det på?

Svampindivider kan variera från att vara närmast viktlösa och bestå av en enda cell till att väga tusentals ton och sträcka sig över flera kvadratkilometer i yta. För många svamparter är det substratet som begränsar hur stora och gamla svampindividerna kan bli. Barrsprickling (*Lophodermium pinastri*) kan t ex aldrig bli större än det enskilda tallbarr som den växer på. På samma sätt är vedlevande svampar begränsade av storleken på det döda trädet, stubben eller lågan de lever i och hur länge dessa substrat kan utgöra en lämplig livsmiljö. Ett annat exempel är koprofila arter vars ålder och livsutrymme begränsas av spillningens omloppstid och storlek.

Marklevande svampar har inte samma begränsningar som arter som är bundna till välavgränsade substrat. Marksvampar bildar ofta fleråriga mycel som potentiellt kan leva länge och växa sig mycket stora (Anderson & Kohn, 1998; Dahlberg, 2001). De studier som hittills gjorts pekar dock på att många arter bara är ett par kvadratmeter i storlek, t ex tagelbrosking (*Marasmius androsaceus*), ametisskivling (*Laccaria amethystina*) och fränkskivlingar (*Hebeloma*) (se t ex Dahlberg, 2001) och att det är mer sällan som geneterna blir flera hundra till ett par tusen kvadratmeter stora, som t ex flera *Suillus*-arter, ärtruffel

(*Pisolithus arhizus*), rotticka (*Heterobasidion annosum*) och tätgrynna (*Resinicium bicolor*), eller ännu större som t ex *Armillaria* (Smith m.fl., 1992) och *Phellinus weirii* (Hansen & Goheen, 2000).

Fruktkropparna i ett område speglar inte nödvändigtvis svampindividernas egentliga utbredning, men de kan ändå ge en indikation om förekomsten. Genom att kartera antalet gener och dess utbredning i ett område kan man få en uppfattning om populationens struktur. Även om ålder och populationsomsättning är svårt att uppskatta genom en kartering kan det ändå ge en indikation på om det är många och små eller få och stora individer, vilket ger en fingervisning om diversiteten och populationsdynamiken.

Hur avgränsar man utbredningen av svampindivider i ett område?

Ibland kan man skatta storlek och omfång på ett enskilt mycel genom att observera hur fruktkropparna är orienterade på växtplatsen. Ett exempel är häxringsbildande arter där mycelet växer utåt från en central punkt och successivt allteftersom de blir äldre bildar en allt större ring som framträder speciellt tydligt då fruktkropparna visar sig. I de flesta fall är det dock omöjligt att avgöra om fruktkroppar härrör från en eller flera svampindivider enbart genom att se på fruktkropparna. Undantagsvis kan svampindivider vara albinistiska och deras fruktkroppar kan då följas i rum och tid med en förvisning om att de härrör från samma individ (Jahn & Jahn, 1987).

Det finns flera sätt att undersöka om fruktkroppar eller mycel härrör från samma svampindivid. Användningen av DNA-baserade tekniker är fortfarande ganska kostsamt men samtidigt kraftfulla verktyg för att studera allt från släktskap mellan olika organismgrupper på högre taxonomiska nivåer ner till detaljer hos individer och deras egenskaper. Allt fler populationsstudier sker med hjälp av molekylära metoder men det finns också mindre kostsamma metoder som kan hjälpa till att avslöja en arts individstruktur i ett område (se t ex Peay m.fl., 2008).

Somatisk inkompatibilitet har visat sig vara en enkel och fungerande metod att avgränsa olika genetiska individer hos basidiesvampar (Holmer & Stenlid, 1991; Dahlberg & Stenlid, 1990). Genom att ta mycel från olika fruktkroppar och konfrontera dem mot varandra genom att odla dem på agarplattor kan man studera eventuella reaktioner i konfrontationszonen. Om det bildas en synlig barriär tyder det på att isolaten är somatiskt inkompatibla och kan därmed antas härröra från olika gener. De reaktionszoner man får är i princip samma som man ser som avgränsningar mellan svampindivider i t ex ved eller barr ute i naturen. Nackdelen med metoden är att man inte får någon ytterligare genetisk information utöver att mycelen är olika eller inte. Man ska också vara medveten om att hos närbesläktade gener (syskon) kan de genetiska skillnaderna vara för små för att det ska bildas en tydlig reaktion (Jacobson m.fl., 1993). Det innebär att resultatet blir konservativt och snarare underskattar antalet gener och överskattar geneters storlekar. Det är inte heller alla svampar som får tydliga inkompatibilitetsreaktioner mellan individer.

Vilken art valdes för studien och varför?

Att det blev just arten stjälskröksvamp (*Tulostoma brumale*) som valdes för denna studie beror till stor del på Sven-Åke Hanson i Helsingborg som har inventerat svampar i Skåne under många år och nyligen skrivit en del om arten och dess ekologi (Hanson, 2005; Hanson, 2008). Det är en rödlistad och naturvårdsintressant art som huvudsakligen förekommer i magra sandstappsartade miljöer, och idén till denna studie föddes med förhoppning att få bättre kunskap om individernas faktiska storlek och rumsliga utbredning på en försökslokal i Skåne

som har inventerats under flera år. Under dessa inventeringar har man tidigare schablonmässigt skattat individstorlekar genom att tolka fruktkroppar med ett större avstånd än 10 meter från varandra som tillhörandes olika individer, vilket är en ofta använd schablon för marklevande svampar.

Under gynnsamma år kan arten bilda rikligt med fruktkroppar på lokalerna där den förekommer, ofta över 1000 per hektar, och eftersom det saknas tidigare populationsstudier av stjälskröksvamp kändes det extra angeläget att försöka ta reda på mer om hur artens populationsstruktur ser ut i ett sådant område.

I denna studie valde jag att använda somatisk inkompatibilitet för att försöka identifiera och avgränsa geneter eftersom det var den enda möjliga metoden för ett arbete av denna omfattning.

Frågeställning

Frågeställningarna för detta arbete var:

1. Kan somatisk inkompatibilitetskorsningar användas för att identifiera och avgränsa individer hos stjälskröksvamp?
2. Hur stora är individerna såsom det avspeglas av fruktkropparna?
3. Hur är individerna fördelade i rummet?
4. Hur nära intill varandra kan de olika individerna växa?

Vad kännetecknar gruppen stjälskröksvampar?

Stjälskröksvampar, släktet *Tulostoma*, är saprotrofa basidiomyceter. I Sverige finns det 6 arter i släktet och stjälskröksvamp är den vanligast förekommande. Fruktkropparna hos alla arterna består av en stjälsklik fot med en rökboll upptill. Rökbollen består av en tunn omslutande vägg (peridium) som innehåller en fertil vävnad (gleba) som vid mognaden mörknar och slutligen bildar sporer. I toppen av rökbollen finns en pormynning där sporererna kan komma ut. Fruktkropparna utvecklas redan när de ligger nedsänkta i marken och när fruktkropparna skjuter upp är sporererna ofta redan mogna. Fruktkropparna bildas ofta sent på säsongen (okt-dec) och kan stå kvar länge vilket gör att man kan hitta gamla kvarstående exemplar nästan året runt.

Beskrivning av den studerade arten stjälskröksvamp

Rökboll klotrund, slät, gulvit till beige, 0,5-1,5 cm bred. Pormynning tublikt utdragen och oftast omgiven av en karamellbrun ringzon. Foten är slät till något fjällig, vitaktig till ljusbrun, mörkare nedtill, 2- 5 cm hög (Figur 3).

Stjälskröksvamp kan i första hand förväxlas med mörk stjälskröksvamp, *T. melanocyclum*, som är mycket mer sällsynt och har en mörkare, mer brungrå ringzon runt pormynningen. Foten är också mörkare, speciellt nedtill och ofta något trådig (Jeppson 2006).



Figur 3. *Fruktkropp av stjälkröksvamp på försökslokalen Kungslandet i Brösarp, Tomelilla, Skåne, 2008-12-16. Lägg märke till den bruna ringzonen runt pormynningen.*

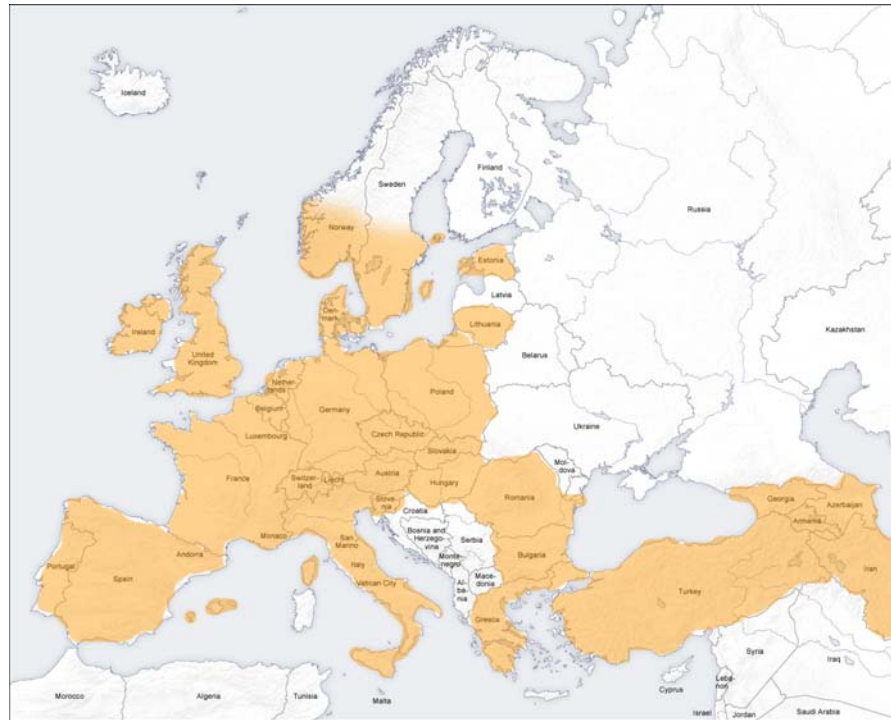
Utbredning i Sverige och världen

Stjälkröksvampens förekomst i Sverige är koncentrerad till östra Skåne, Öland och Gotland. Det finns också några aktuella fynd längs västkusten och kustnära områden i östra Mellansverige. Längre inåt landet finns enstaka ströfynd (Figur 4a).

Från Europa och övriga världen (Figur 4b) är stjälkröksvampen känd från Norge, Finland (Åland), Danmark, Estland, Litauen, Tyskland, Polen, Storbritannien, Irland, Holland, Schweiz, Österrike, Belgien, Frankrike, Corsika, Spanien, Balearerna, Kanarieöarna, Portugal, Grekland, Italien, Ungern, Rumänien, Tjeckien, Bulgarien, Slovenien, Slovakien, Armenien, Azerbaidjan, Georgien, Iran, Turkiet, Tunisien och Nordamerika (Wright, 1987; Kreisel, 2001; Sesli m.fl., 2000).



Figur 4a.
 Utbredningen av
 stjärkröksvamp i
 Sverige. De blå
 fyndprickarna
 representerar fynd från
 1990 och senare
 (ArtDatabanken, 2009).



Figur 4b. Orangefärgade områden visar utbredningen av stjärkröksvamp i Europa (efter Wright, 1987; Kreisel, 2001).

Stjärkröksvampens ekologi

Stjärkröksvamp är huvudsakligen knuten till hävdade, väldränerade och öppna sandstappsartade miljöer på kalkhaltigt underlag. Växtplatserna har ofta ett sparsamt vegetationstäck med sandblottor som uppkommit genom måttlig störning av bete och trampning (Hanson & Jeppson, 2005; Hanson, 2008) och fruktkropparna växer både på sandblottor och på ytor med slutet vegetationstäck. Arten är även funnen på alvarmark, sanddyner (Nitare, 2006a) och på lokaler med skalrik sand, kalkhällmarker och kalkstensmurar (Hanson, 2008). I de områden i Skåne där arten förekommer tenderar den att föredra sluttande marker. I en undersökning säsongen 2007-2008 fann man att över 70 % av fynden förekom på sluttande mark med tyngdpunkt på sydsluttningar (Hanson, 2008). På många Skånska stjärkröksvamplokaler förekommer sandskruvmossa (*Syntrichia ruraliformis*) och det har spekulerats i om det möjligen förekommer någon typ av association mellan stjärkröksvampar och sandskruvmossa (Hanson, 2008).

En hotad art

Stjärkröksvamp är en rödlistad art i kategorin missgynnad (NT) (Gärdenfors, 2005). I rödlistan 2005 bedömdes arten inte finnas på fler än 300 lokaler i landet, vilket bedömdes motsvara ungefär 1 500 geneter uppdelat på 15 000 frilevande rameter (1 ramet = 1 individ enligt IUCN:s definitioner). En kombination av två viktiga faktorer gjorde att arten uppfyllde kriterierna för att bli rödlistad:

1. Den begränsade populationsstorleken (<20 000 individer) i landet.
2. En fortlöpande minskning bedömdes pågå, främst p.g.a. upphörande beteshävd med igenväxning av lämpliga habitat som följd.

Den tidsperiod som bedömningarna baserades på var 20 år vilket bedömdes motsvara 3 generationer.

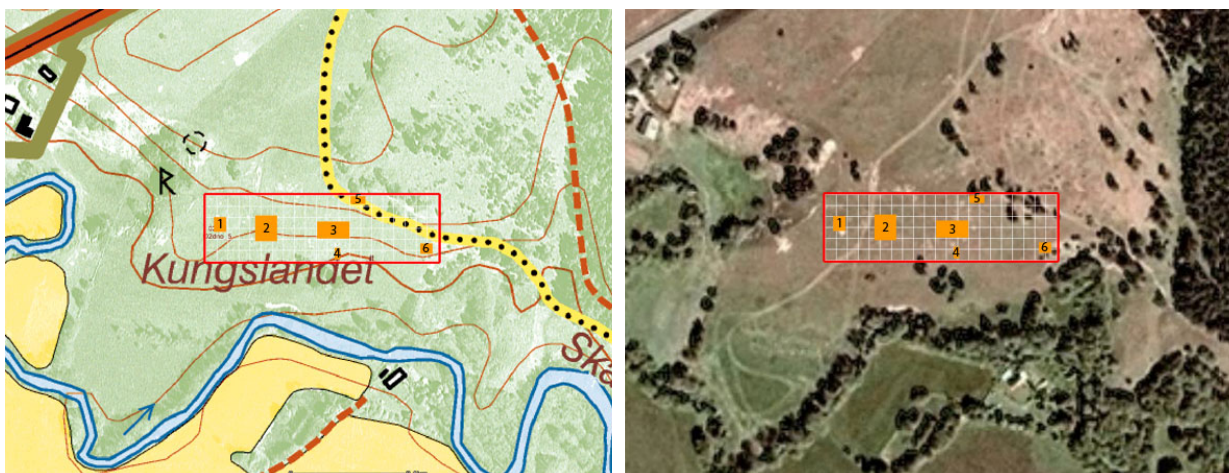
Förutom upphört betetryck med efterföljande igenväxning anses skogsplantering och konstgödning vara reella hot mot de sandstääpsmiljöer där arten förekommer (Nitare, 2006a). Lätt men kontinuerlig störning, t ex i form av hästbete som bevarar sandblottor på lokalerna, anses gynna arten (Hanson, 2008). På Ölands alvarmarker kan en selektiv röjning av enbuskar på vissa ytor som håller på att växa igen vara gynnsamt (Nitare, 2006b). Hanson (2008) menar att man även bör fokusera på att skydda och hävda sandstääpslokaler belägna i syd- och sydostsluttningar eftersom många av fynden under 2006-2008 gjordes just på lokaler i dessa väderstreck.

Metoder

Försökslokal

Den undersökta försökslokalen valdes därför att den har en känd och riklig förekomst av stjälkroksvamp. Lokalen heter Kunglandet och är beläget strax norr om Brösarp i Tomelilla, Skåne. Det är en hävdad sandstääpsliknande och trädlös naturtyp på kalkrik sand med sandblottor i vegetationstäcket. Området har en känd förekomst av stjälkroksvamp som sträcker sig tillbaka till 1940-talet (Hanson, pers. medd.) och lokalen har inventerats regelbundet de senaste åren (Hanson & Jeppson, 2005; Hanson, 2008).

Sven-Åke Hanson som regelbundet var ute och inventerade svampar i Skåne under hösten och vintern 2008-2009 var spanare och larmade när fruktkroppstillgången bedömdes vara som bäst. Kartering och insamling av fruktkroppar gjordes 2008-12-16, då Sven-Åke var med och påvisade växtplatsen. Det undersökta området avgränsades till en yta av 60 x 210 meter (1,26 ha) där merparten av alla fruktkroppar bedömdes vara. En geografisk punkt med RT90-koordinaterna 6179287/1393578 valdes som utgångspunkt för mätningarna. Koordinaterna erhöles med hjälp av en GPS-mottagare av märket Garmin GPSmap 60CSx.



Figur 5. Topografisk karta och flygbild över försökslokalen Kunglandet. Den undersökta ytan på 60 x 210 meter är inramat i rött. Delområden 1-6 visar var de karterade fruktkropparna förekom (kartor från Länsstyrelsernas länskartor och Eniro 2009).



Figur 6. En översiktsbild av försökslokalen. Stjälkröksvampens fruktkroppar växte ofta i grupper, men det fanns också ensamma fruktkroppar flera meter från varandra. Pilarna visar växtplatsen för några fruktkroppar.



Figur 7. Fruktkropparnas rumsliga position mättes in med hjälp av måttband och syftkompass från en mittpunkt som markerades med en träpinne. Fem olika mittpunkter valdes på en yta av totalt 60 x 210 meter. Plastpåsarnas placering på marken visar var de olika fruktkropparna växte.

Insamling

Insamling och kartering av fruktkroppar av stjärkröksvamp skedde under ca 5 timmar den 16 dec 2008. Området där merparten av fruktkropparna förekom påvisades av Sven-Åke Hanson på plats. Jag hade inte i förväg bestämt storleken på ytan som skulle undersökas. Vid insamlingstillfället började jag med att slumpmässigt leta upp en plats där det fanns flera (>10) färska och unga fruktkroppar inom ett par meters radie. En mittpunkt valdes och markerades med en pinne varefter GPS-koordinaterna för mittpunkten noterades. Positionen för varje fruktkropp mättes in med avstånd och grader från mittpunkten med hjälp av ett 50-meters måttband och en syftkompass (400°). På så sätt får man en högre noggrannhet än om man hade använt en GPS-mottagare för att mäta in varje fruktkropp. För varje ny vald mittpunkt noterades avstånd och grader från den föregående mittpunkten och GPS-koordinater noterades. Totalt valdes 5 mittpunkter över en yta på 60 x 210 meter. Urvalet av nya mittpunkter skedde slumpmässigt varhelst jag påträffade färska fruktkroppar, gamla och mörkfärgade fruktkroppar insamlades inte. Färska fruktkroppar insamlades och lades i 1-deciliteras plastpåsar som förslöts, numrerades och placerades i en kylbox. Efter transport i kylbox förvarades kollektionerna i +8 grader tills de odlades ut 1-2 dagar efter insamling.

Fruktkroppstätheten noterades inte vid insamlingstillfället, men totalt räknades det till över 1000 fruktkroppar i området den dagen, inom och utanför den undersökta ytan (1418 totalt under 2 dagar, Hanson, pers. medd.).

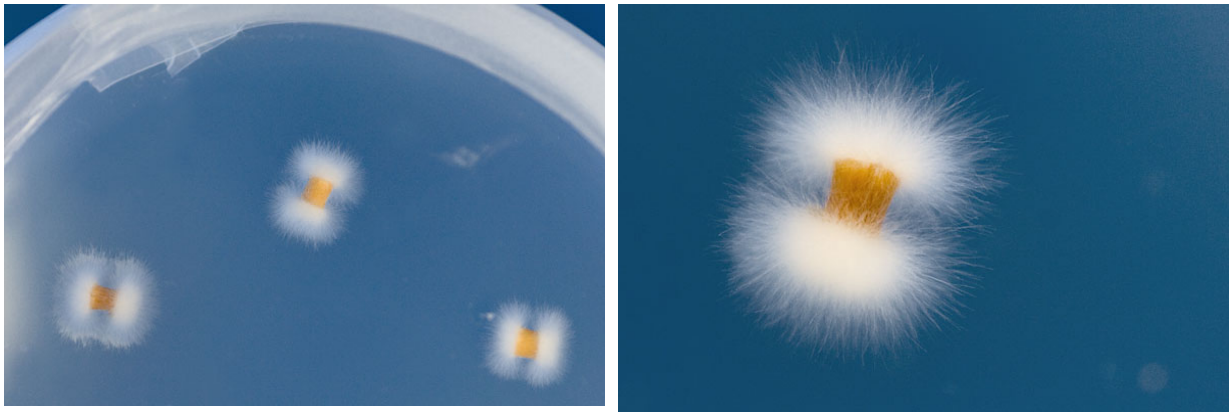
Odling och korsningstest

Utodling av mycel från fruktkropparna gjordes 24-48 timmar efter att de samlats in. Utodlingarna skedde sterilt i sterilskåp och Hagem-agar (Stenlid, 1985) användes som odlingsmedium:

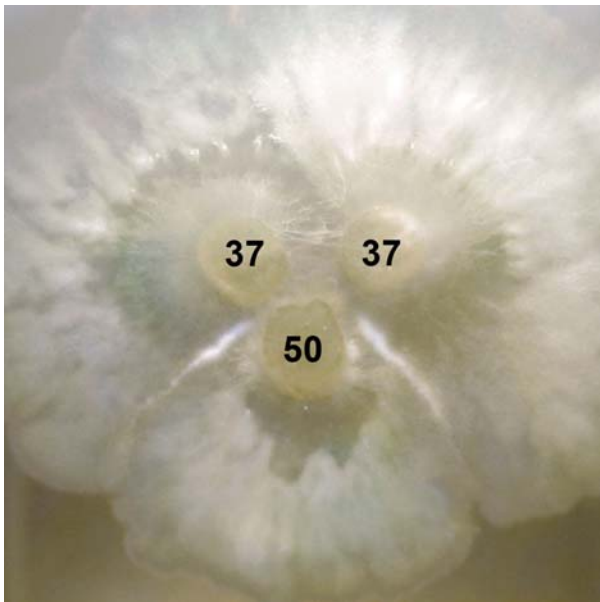
1. Hela foten på fruktkropparna skars av med en skalpell och delades på tvären i två lika långa delar.
2. Den ena halvan av foten doppades 20 sekunder i 70 %-ig etanol (EtOH) och sedan 20 sek i 2 %-ig natriumhypokloritlösning (NaClO) varefter den sköljdes i destillerat vatten i 2 omgångar á 30 sekunder.
3. Den andra halvan av foten doppades 40 sekunder i 70 %-ig etanol (EtOH) och sedan 40 sek i 2 %-ig natriumhypokloritlösning (NaClO) varefter de sköljdes i destillerat vatten i 2 omgångar á 40 sekunder.
4. Vardera fothalva skars upp i 2-3 mm stora bitar som placerades på Hagem-agar i petriskålar som numrerades efter fruktkropparnas insamlingsnummer, förslöts med parafilm och inkuberades i 20°C.
5. Isolaten kontrollerades varannan dag för att avlägsna eventuell kontaminering av bakterier och främmande svampar. 7 dagar efter utodlingen hade mycel växt ut från snittytan på fotdelarna (Figur 8).
6. Efter 21-28 dagar stansades med hjälp av en steril korkborr mycelpluggar med ca 4 mm diameter ut och korsades enligt ett reducerat korsningsschema. På varje korsningsplatta placerades 3 mycelpluggar från olika isolat, upp och ned och ca 5 mm från varandra (Figur 9). Korsningsschemat bestämdes utifrån kartan och positionerna av de insamlade fruktkropparna så att merparten av alla mycel från alla näraliggande

fruktkroppar fick växa mot varandra men bara ett urval av mycel som kom från fruktkroppar långt ifrån varandra. En första testodling visade att mycelet växte djupt ner i agarn istället för horisontellt som önskat. För att stimulera en horisontell tillväxt gjordes ytterligare en uppsättning korsningar på agar täckt med ett steriliserat och permeabelt cellofan som släpper igenom fukt och näring men som hindrade mycelet från att växa nedåt i agarn. Totalt gjordes 90 olika korsningsplattor i 2 replikat. Bland dessa fanns 19 självparade mycel för att ge underlag att tolka utseendet hos självparningar.

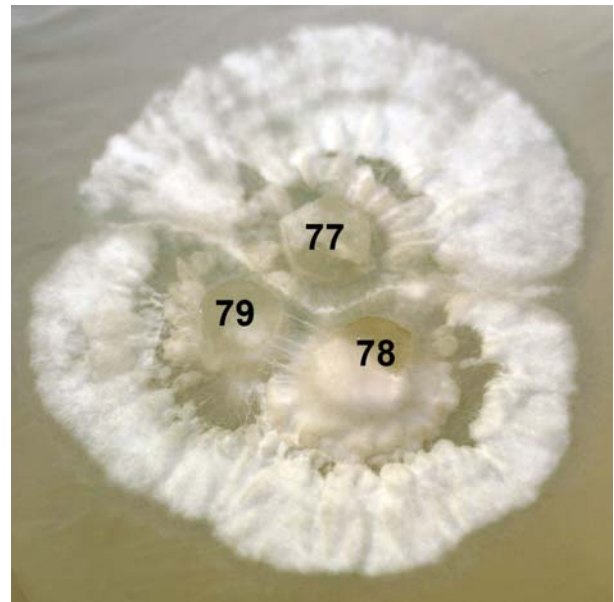
7. När korsningsisolaten fått växa 21-28 dagar gjordes den första avläsningen för att tolka eventuella reaktionszoner mellan de växande mycelen.
8. Ytterligare 2 avläsningar skedde 6 och 10 veckor efter den första avläsningen.



Figur 8. 2-3 mm stora bitar av foten på fruktkropparna odlades på Hagem-agar. 7 dagar efter utodlingen hade vita myceltussar växt ut från snittytan.



Figur 9. Reaktionen mellan självparade mycel från en och samma fruktkropp (37 x 37) och mycel parade från olika fruktkroppar (37 x 50). Lägga märke till den vita filtartade mycelbården som tyder på somatisk inkompatibilitet mellan 37 och 50. Självparade mycel visade påfallande ofta också sammanväxta hyfsträngar mellan



Figur 10. Reaktionen mellan mycel från 3 olika fruktkroppar. Nr 77 uppvisar en tydlig barriär i reaktionszonen mot 78 och 79 i form av en ljus mycelbård. Mellan 78 och 79 märks ingen sådan reaktion och mellan deras mycelpluggar syns sammanväxta hyfsträngar som var typiskt hos självparade mycel (Figur 9). Ytan på mycelen blev mer vågformig hos

mycelpluggarna. Bilden visar isolat från en icke-cellofantäckt agarplatta som i regel gav något annorlunda utseende på de odlade mycelen jämfört med dem som växte på cellofantäckt agar (Figur 10).

de isolat som odlades på cellofantäckt agar jämfört med dem utan cellofan (se Figur 9). Det var dock ingen noterbar skillnad i läsbarhet av reaktionszonerna mellan cellofan- och icke-cellofantäckta odlingar.

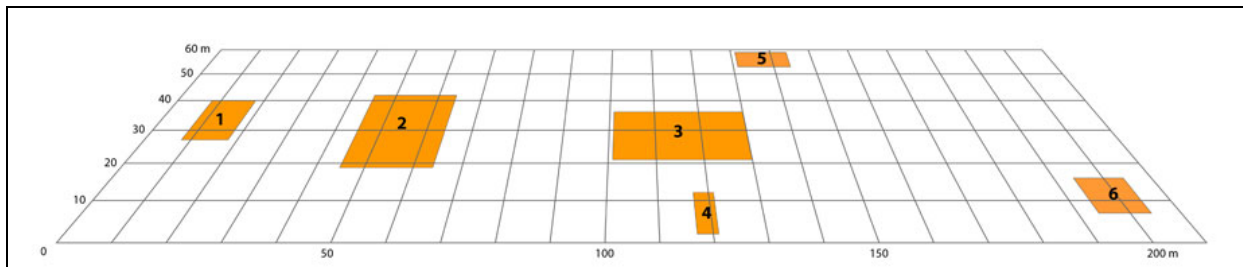
Resultat

- Totalt fanns det över 1000 fruktkroppar i det undersökta området. På en yta av 60 x 210 meter insamlades och kartlades totalt 82 fruktkroppar. Av dessa lyckades jag odla upp mycel från 49 olika fruktkroppar. I korsningsschemat användes mycel från alla 49 fruktkroppar i 90 olika korsningar. Mindre än 5 % av korsningsplattorna fick kastas p.g.a. kontaminering.
- Självparade mycel växte samman utan att bilda någon tydlig barriär i konfrontationszonen (Figur 9). Påfallande ofta syntes sammanväxta hyfsträngar mellan mycelpluggar hos självparade mycel, vilket helt saknades hos de mycel som var somatisk inkompatibla.
- Somatiskt inkompatibla mycel visade en tydlig barriär i form av en ljus mycelbård med tätt packade hyfer i reaktionszonen (Figur 9 & 10). Reaktionszonerna var något lättare att tolka efter 10 veckor jämfört med efter 6 veckor men ingen skillnad i tolkningarna förekom mellan de två avläsningstillfällena. Inga skillnader i läsbarhet förekom mellan cellofan- och icke-cellofantäckta plattor efter 10 veckor. Dock var de isolat som växte på den cellofantäckta agarn något annorlunda i utseende, mycelen fick ofta en vågformad yta (Figur 10), som var speciellt tydligt hos unga isolat.
- Totalt identifierades 27 inkompatibla mycel från 48 fruktkroppar. Jag tolkar dessa om olika geneter. 16 geneter av dessa hade fler än 1 fruktkropp. Som flest kunde 4 fruktkroppar kopplas till en och samma genet. Storleken på geneter som hade fler än 1 fruktkropp skattades genom att beräkna avståndet från de fruktkroppar som stod längs från varandra. Såsom det avspeglades av fruktkropparna var den största geneten 1,25 meter i utbredning. Det närmaste uppmätta avståndet mellan fruktkroppar från två olika geneter var 32 cm.
- Resultaten visar att somatisk inkompatibilitet är en användbar metod för att avgränsa individer hos stjälnkröksvamp.

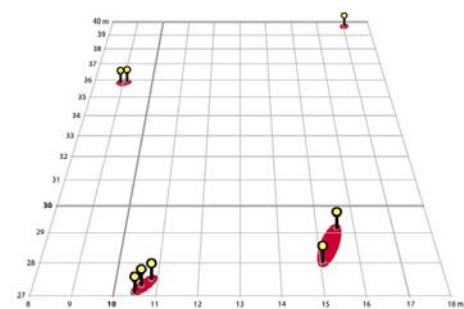
Tabell 1. Sammanställning av resultat från de 6 undersökta delområdena.

	yta 1	yta 2	yta 3	yta 4	yta 5	yta 6	Alla ytor
Storlek på undersökt yta (kvm)	130	437	435	40	78	90	1210
Antal identifierade geneter	4	6	6	3	6	6	27
Antal geneter med >1 fruktkropp	3	5	2	2	2	2	16
Antal testade fruktkroppar	8	11	10	5	6	8	48
Maxstorlek genet* (cm)	121	59	91	85	125	23	125
Kortaste avstånd mellan fruktkroppar hos olika geneter	426	117	151	322	32	44	32
Medelstorlek geneter* (cm)	64	23	60	23	20	14	54
Antal geneter/100 kvm	3,1	1,4	1,4	7,5	7,7	6,7	2,2

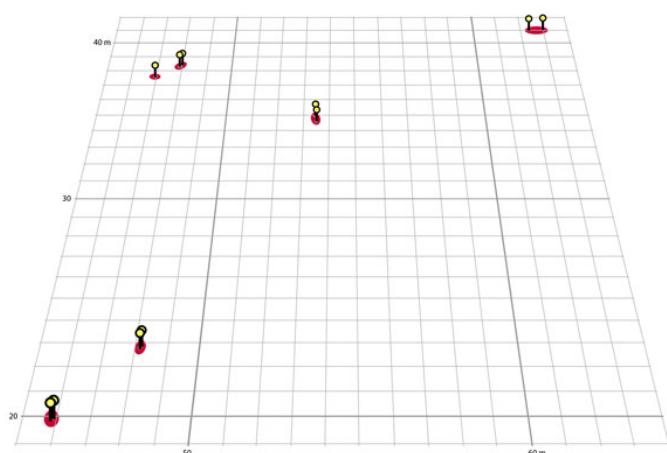
* Avser geneter med >1 fruktkropp



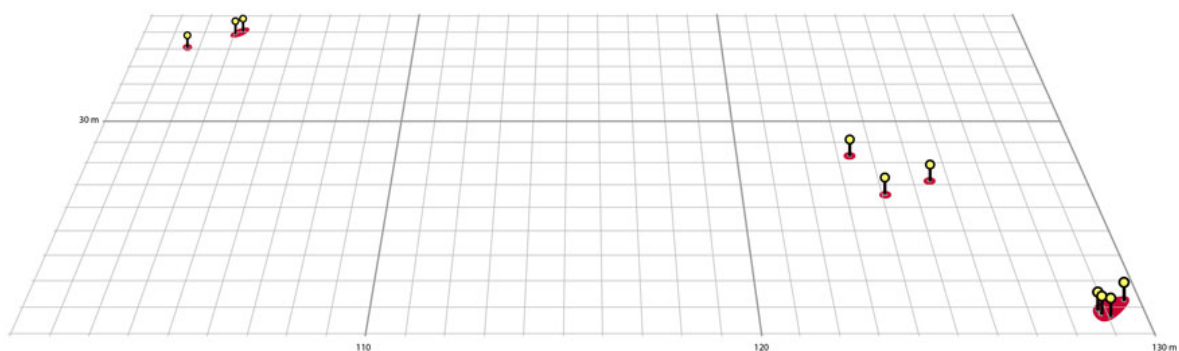
Figur 11: Det undersökta området på försökslokalen omfattar totalt 60 x 210 meter. Delytor nummerade 1-6 visar var inmätningen av fruktkroppar ägde rum. Se tabell 1 för en resultatsammanställning. Det fanns fruktkroppar också utanför de undersökta ytorna men vid undersökningstillfället gjordes ingen uppskattning av fruktkroppstätheten i området eller om det förekom skillnader i fruktkroppsförekomst utanför jämfört med innanför de undersökta ytorna.



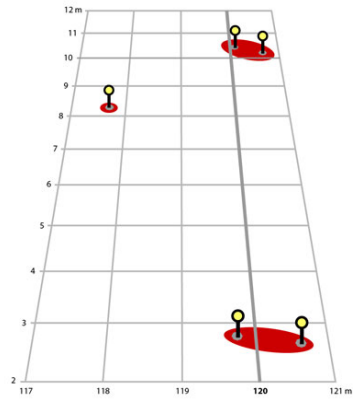
Figur 12. Försöksyta nr. 1. Genetutbredningen som påvisat av de undersökta fruktkropparna. Rödmarkerad yta visar genernas minsta beräknade utbredning. Nålar indikerar positionen av undersökta fruktkroppar. Observera att det fanns fler fruktkroppar på försöksytan som inte undersöktes.



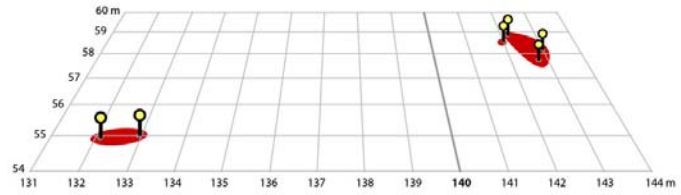
Figur 13. Genetutbredningen på försöksyta nr.2. Teckenförklaring som i Figur 12.



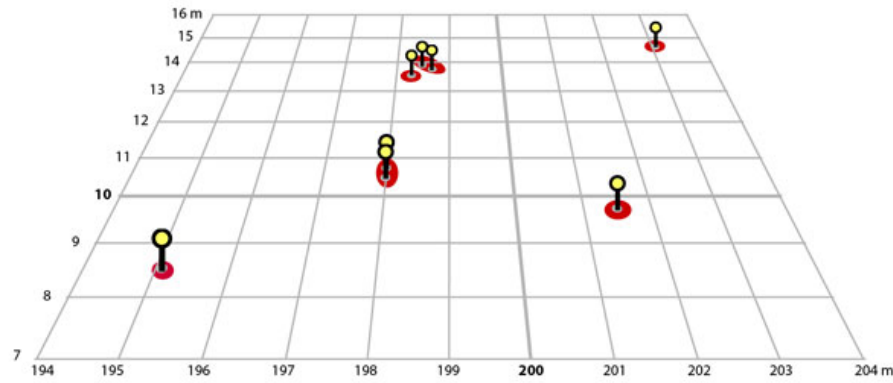
Figur 14. Genetutbredningen på försöksyta nr.3. Teckenförklaring som i Figur 12.



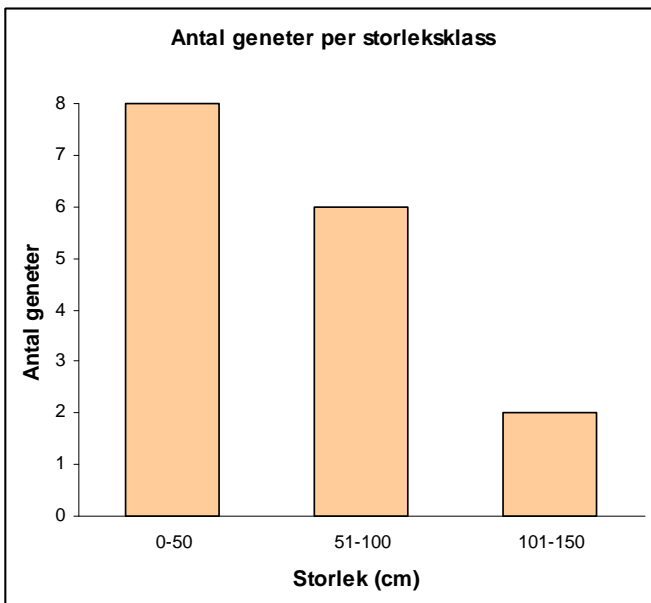
Figur 15. Genetutbredningen på försöksyta nr.4. Teckenförklaring som i Figur 12.



Figur 16. Genetutbredningen på försöksyta nr.5. Teckenförklaring som i Figur 12.



Figur 17. Genetutbredningen på försöksyta nr.6. Teckenförklaring som i Figur 12.



Figur 18. Storleken hos gener med fler än 1 fruktkropp ($n=16$) beräknades genom att mäta avståndet från de fruktkroppar som stod längst från varandra och vars isolat var somatiskt kompatibla.

Diskussion

Markväxande svampar anses potentiellt kunna växa sig obegränsat stora så länge det finns tillgång till lämpligt habitat (Anderson & Kohn, 1998; Dahlberg, 2001). Det är ofta omöjligt att i naturen följa en svampindivids utbredning i tid och rum men häxringsbildande arter är ett undantag. Nejlikbrosking (*Marasmius oreades*) som är en vanlig art i gräsmattor kan tillväxa med en hastighet av 20-30 cm per år och bilda flera meter stora ringar. Ännu snabbare tillväxt, 60 cm/år, har iakttagits hos jättetrattskevling (*Leucopaxillus giganteus*); och jätteröksvamp (*Langermannia gigantea*) kan växa uppemot 2 meter/år och bilda ringar på hundratals meter i diameter med en uppskattad ålder på 700 år (Petersen, 1998).

Skogar med lång kontinuitet har potential att hysa gamla och stora svampindivider. I en jämförelse mellan ung och gammal tallskog fann man stora skillnader i antal och storlek hos individer av örsopp (*Suillus bovinus*) (Dahlberg & Stenlid, 1990). I yngre skog var individerna många och små medan de var få och stora i äldre skog. Samtidigt har man för andra arter inte kunnat påvisa skillnader i individstorlek mellan ung och gammal skog, t ex hos tagelbrosking (Holmer & Stenlid, 1991) och ametistskevling (Dahlberg, 2001).

I den här studien fann jag inga geneter av stjälskröksvamp med större utbredning än 1,25 meter (medel=0,51, n=16). Jag har inte undersökt markhistoriken på försökslokalen, men man vet att stjälskröksvampen har funnits på samma lokal sedan 1940-talet (Hanson, pers. medd.) och på gamla flygbilder från 1940-talet ser miljön i det närmaste samma ut som det gör idag. Potentiellt borde försökslokalen kunna hysa gamla och stora individer, men det har jag inte kunnat påvisa i min undersökning. Istället indikerar resultatet att populationen består av små (och kortlivade?) geneter, och man kan fundera på vad det beror på. Kan det vara fysiska hinder som försvårar en vegetativ spridning? Stjälskröksvampen verkar ofta förekomma i mossmattor av sandskruvmossa som har en fläckvis utbredning på försökslokalen. Det har spekulerats i om det föreligger någon sorts association mellan stjälskröksvamp och sandskruvmossa (Hanson, 2008). Om mosstuvorna skulle visa sig vara livsnödvändiga tillhåll, och att miljön emellan dem är ogynnsam, kan man anta att en vegetativ spridning är mindre framgångsrik jämfört med sporspridd etablering. Intillväxande individer av samma art eller andra arter utgör också ett potentiellt fysiskt hinder. Det närmaste uppmätta avståndet mellan två olika geneter i denna undersökning var 32 cm, och förmodligen kan mycelen växa direkt intill och fysiskt blockera varandras utbredning. Jag kunde inte finna någon antydning till överlappning av geneters utbredning (Figur 12-17), men det är inte uteslutet att det förekommer.

Vit stjälskröksvamp (*T. niveum*) är en närstående art som förekommer i små och löst sittande mosskuddar direkt på sten och öppen kalkhällmark där en vegetativ spridning är i det närmaste omöjlig (Jeppson, 2005 & Jeppson, pers. medd.). Populationer i en sådan miljö är helt beroende av sporspridd föryngring. Ett undantag är svampar som kan bilda rhizomorfer som effektivt kan sprida sig över ogynnsamma ytor, men det är inte känt förekommande hos stjälskröksvampar. Även för vit stjälskröksvamp har man spekulerat om det finns någon association med mossor (Jeppson, 2005).

Svampars plasticitet är stor och populationer som huvudsakligen reproducerar sig sexuellt i en viss miljö kan visa sig framgångsrika med en vegetativ förökningsstrategi i en annan miljö. Det är svårt att svara på hur viktig sporspridd föryngring är för stjälskröksvampspopulationen på försökslokalen, men många och små individer tyder på att mycelen är sporetablerade.

Arten anses gynnad av en måttlig och kontinuerlig störning av markytan genom bete och tramp (Hanson, 2008). Förmodligen underlättar de uppkomna sandblottorna en sporetablering. Eftersom de allra flesta sporer (95-99 %) hamnar inom några meter från fruktkropparna torde chansen att två kompatibla sporer möts vara större i en individtät population jämfört med en population med få och stora individer.

Tillväxthastigheten hos stjälnkröksvampens mycel är inte känd, men individutvecklingen hos en annan saprotrof buksvamp, kantjordstjärna (*Geastrum striatum*), följdes av Sunhede (1989) som kunde påvisa en tillväxt på 2 meter under 14 år (14,3 cm/år). Med användning av den kalkylen skulle de största geneterna av stjälnkröksvamp funna i den här undersökningen vara knappt 10 år gamla. Man bör dock vara medveten om att ett mycels ytstorlek och ålder inte alltid är korrelerade. Ett exempel är jordstjärnor som växer i myrstackar där en individ kan leva i över 20 år utan att öka i utbredning räknat i markyta (Sunhede, 1989). Där kan en kontinuerlig årlig tillförsel av barr ovanifrån ge tillräckligt med nytt substrat att kolonisera.

Stjälnkröksvamp kan sällsynt bilda häxringar (Hanson, pers. medd.) och det vore intressant att följa en eller flera individer på ett och samma ställe kontinuerligt under flera år för att undersöka hur långlivade mycelen är och hur den rumsliga tillväxten ser ut. En sådan studie skulle kunna utföras med somatisk inkompatibilitet, eller med molekylära metoder.

Med somatisk inkompatibilitet kan man skilja på individer med olika genotyp men det ger ingen ytterligare genetisk information. Det hade varit intressant att undersöka den genetiska diversiteten inom populationen på försökslokalen, och framförallt hur stort genflödet är mellan populationer på olika skalor. Att det sker en frekvent sexuell föryngring inom en population säger ingenting om omfattningen på genflöde och eventuell inavelsdepression.

Min undersökning indikerar att stjälnkröksvampens individer är relativt små, kortlivade och sporetablerade. Om man antar att artens övriga svenska lokaler har en liknande populationsstruktur betyder det att individerna är beroende av en lyckad sporetablering under sin korta livstid (<10 år) för att ha en god chans att sprida sig. En kontinuerlig störning som vidmakthåller öppna sandblottor underlättar sannolikt sporetableringen och är därmed en viktig naturvårdsåtgärd som förbättrar artens överlevnadsmöjligheter. En kontinuerlig beteshävd som håller vegetationen låg och som förhindrar igenväxning av artens habitat gynnar förmodligen också individens nyetablering från sporer.

Den här undersökningen kan inte ge svar på hur många rameter som geneterna har gett upphov till på försökslokalen. Även om geneterna är relativt små så kan de teoretiskt bestå av många små rameter. Enligt de rödlistningskriterier som används idag (se Gärdenfors, 2005) så betraktas rameter likställt med "individer" och utgör därmed en viktig basenhet vid rödlistningsbedömningar. Schablonmässigt anses en genet hos markväxande svampar ge upphov till 10 frilevande rameter, men i praktiken varierar det förmodligen mycket mellan olika arter och habitat.

Tack till

Stort tack till min handledare Anders Dahlberg som frikostigt har delat med sig av idéer, goda råd, klokhet, inspiration och uppmuntran. Stort tack också till Sven-Åke Hanson vars hjälp var helt nödvändig för denna studies genomförande; som tipsade om försökslokalen och som personligen visade på stjälnkröksvamparna och deras växtplatser vid undersökningstillfället, samt bidragit med värdefull information från tidigare inventeringar av arten i Skåne. Riktat också ett tack till Mikael Jeppson för snabba, tänkvärda och utförliga svar på mina frågor och

funderingar och som generöst har bidragit med upplysningar om stjälnkröksvampens utbredning i Sverige och övriga världen. Tack också till Elisabet Eriksson för diverse hjälp under arbetets gång, och sist men inte minst till Mats Grahn och Niklas Olsson på Södertörns Högskola för lån av utrustning och lokal under en kritisk period då svampodlingarna behövde tillsyn och en plats att vara.

Referenser

- Anderson, J. B. & Kohn, L. M. 1998. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. *TREE* vol 13, nr 11 November 1998.
- Dahlberg, A. 1997. Population ecology of *Suillus variegatus* in old Swedish Scots pine forests. *Mycological Research*. 101(1): 47–54.
- Dahlberg, A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist*. 150: 555-562.
- Dahlberg, A. & Stenlid, J. 1990. Populationstructure and dynamics in *Suillus bovinus* as indicated by spatial distribution of fungal clones. *New Phytologist*. 115: 487-493.
- Gärdenfors, U. (red.). 2005. *Rödlistade arter i Sverige 2005 – The Red List of Swedish Species*. ArtDatabanken, SLU. Uppsala.
- Hansen, E. M., & Goheen, E. M. 2000. *Phellinus weirii* and other native root pathogens as determinants of forest structure and process in western North America. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 38: 515-539.
- Hanson, S-Å & Jeppson, M. 2005. Gasteromyceter i östra Skånes sandstappsområden – en sammanfattning av elva års inventeringsarbete. *Svensk Mykologisk Tidsskrift* 26(2): 61-83.
- Hanson, S-Å. 2008. Rödlistade svampar i östra Skånes sandmarker – en undersökning av *Tulostoma*-arternas ekologi. *Svensk Mykologisk Tidsskrift* 29(3): 93-109.
- Holmer, L. & Stenlid, J. 1991. Population structure and mating system in *Marasmius androsaceus* Fr. *New Phytologist* 119: 307–314.
- Jacobson, K. M., Miller, O. K. & Turner, B. J. 1993. Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Population Biology* 90: 9159-9163. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*.
- Jahn, H. & Jahn, M-A. 1987. Konstans och fluktuation i svampvegetationen på Norra Warleda, Uppland. Iakttagelser på en svensk bondgård 1945-1980. *Jordstjärnan* 8(2): 13-31, 1987 s. 21. Medlemsskrift för Sveriges Mykologiska Förening.
- Jeppson, M. 2005. Åtgärdsprogram för bevarande av vit stjälnkröksvamp (*Tulostoma niveum*). Rapport 5512. ISBN 91-620-5512-7. Naturvårdsverket.
- Jeppson, M. 2006. *Tulostoma melanocyclum* – mörk stjälnkröksvamp. Arfaktablad. ArtDatabanken, SLU. Uppsala. Hämtad 2009-05-11 [http://www.artdata.slu.se/rodlista/Faktablad/tul_mela.PDF].

Kreisel, H. 2001. Checklist of the gasteral and secotioid Basidiomycetes of Europe, Africa and Middle East. *Österr. Z. Pilzkunde* 10:213–313.

Nitare, J. 2006a. *Tulostoma brumale* – stjälskröksvamp. Arfaktablad. ArtDatabanken, SLU. Uppsala. Hämtad 2009-05-11 [http://www.artdata.slu.se/rodlista/Faktablad/tul_brum.PDF].

Nitare, J. 2006b. *Tulostoma squamosum* – fjällig stjälskröksvamp. Arfaktablad. ArtDatabanken, SLU. Uppsala. Hämtad 2009-05-11 [http://www.artdata.slu.se/rodlista/Faktablad/tul_squa.PDF].

Peay, KG., Kennedy, PG. Bruns, TD. 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BIOSCIENCE*. 58(9): 799-810.

Petersen, J. H. 1998. Svamperiget. Det naturvidenskablige Fakultet – Aarhus Universitet. Gads Forlag, 344 sidor.

Sesli, E., Wright J. E. & Türkecul, I. 2000. The Genus *Tulostoma* Pers.: Pers. (Gasteromycetes) in Turkey. *Turkish Journal of Botany* 24: 269-272.

Smith, M. L., Bruhn, J. N. & Anderson, J. B. 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*. 356: 428-431.

Stenlid, J. 1985. Population structure of *Heterobasidion annuosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility and isoenzyme patterns. *Canadian Journal of Botany* 63: 2268-2273.

Sunhede, S. 1989. Geastraceae (Basidiomycotina). Morphology, ecology, and systematics with special emphasis on the North European species. Synopsis fungorum, vol 1. Fungiflora, Oslo.

Wilson, J. 1999. *Biological Individuality: The Identity and Persistence of Living Entities*. New York: Cambridge University Press.

Wilson, R. A. 2007. The Biological Notion of Individual. Stanford Encyclopedia of Philosophy. [<http://plato.stanford.edu/entries/biology-individual/>].

Wright, J. E. 1987. The genus *Tulostoma* (Gasteromycetes). A world monograph *Bibliotheca Mycologica*. 113:1–338.