

PATOGENICZNE LĘGNIOWCE W SZKÓŁCE LEŚNEJ TRAWICE W NADLEŚNICTWIE LIPUSZ

Marta Bełka^{1✉}, Marlena Baranowska², Katarzyna Breza¹

¹Katedra Fitopatologii Leśnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71C, 60-625 Poznań

²Katedra Hodowli Lasu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71A, 60-625 Poznań

ABSTRAKT

Wstęp. Celem pracy była detekcja lęgniowców bytujących w glebie dwóch kwater z dębem bezszypułkowym w szkółce leśnej Trawice w Nadleśnictwie Lipusz.

Materiał i metody. Zastosowano trzy metody detekcji patogenów, umieszczając próby gleby: (1) w otworach wydrążonych w jabłkach, (2) z jabłkami w wodzie, (3) wykorzystując pułapki liściowe na powierzchni wody, którą zalano badaną glebę.

Wyniki i wnioski. W glebie szkółki Trawice zidentyfikowano: *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, *Pythium ultimum* var. *ultimum* i *Phytophthora vexans*. Najczęściej występującym gatunkiem był *P. ultimum*, a najrzadziej *P. sylvaticum*. Przedstawione sposoby detekcji patogenów są łatwo dostępne, szybkie i tanie. Wykorzystywanie ich w szkółkach leśnych byłoby pomocne przy określaniu występowania Oomycetes.

Słowa kluczowe: lęgniowce, *Phytophthora*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Quercus* spp., szkółka leśna

WSTĘP

Lęgniowce (Oomycetes), grzybopodobne organizmy eukariotyczne, zaliczane do królestwa Chromista powodują porażenia wielu gatunków drzew leśnych. Patogeny porażają nie tylko siewki i sadzonki w szkółkach i na uprawach (zgorzele), ale także pojedyncze drzewa, a nawet całe kompleksy leśne (Sawicki, 2009). Infekcje wywoływane przez te patogeny określa się mianem fytoftoroz (Orlikowski i Szkuta, 2002). Mimo postępu w ochronie roślin przed chorobami, gatunki z rodzaju *Phytophthora* mogą przyczyniać się aż do 50% strat w uprawach niektórych roślin (Orlikowski i Szkuta, 2008) i są organizmami ściśle związanymi z wodą (Baker i Matkin, 1978; Holdich i Reeve, 1991; Orlikowski i in., 2011a; 2011b; 2013; Ptaszek i in., 2015; Yang i in., 2016). Niektóre gatunki z rodzaju *Phytophthora*

mają jedną roślinę żywicielską, np. *P. quercina* poraża jedynie dęby. Z kolei inne mają szerokie spektrum roślin-gospodarzy, np. *P. cactorum*, *P. cryptogea* czy *P. cinnamomi*. Ostatni gatunek infekuje ponad 1000 gatunków roślin (Gruenwald i in., 2008; Lamour i in., 2012). W Polsce najbardziej patogenicznymi w szkółkach leśnych, lasach, szkółkach czy nasadzeniach są gatunki: *P. lateralis*, *P. plurivora* (dawniej *P. citricola*), *P. quercina*, *P. ramorum*, *P. cinnamomi* (Oak i in., 2004; Wiejacha i in., 2004). Istnieje przekonanie, że ocieplanie się klimatu wpływa na zwiększanie zasięgu fytoftoroz z południa na północ Europy (Brasier, 1996; Brasier i Scott, 1994). Dotychczasowe obserwacje potwierdzają rozprzestrzenianie się fytoftoroz i jego kierunek, ale spowodowany jest on głównie

✉ marta.belka@up.poznan.pl, <https://orcid.org/0000-0001-6851-7864>

handlem roślinami ozdobnymi (Migliorini i in., 2015; Oszako, 2002). Zniesienie granic, wolny rynek i wymiana handlowa roślin i nasion przyczynia się do zawleczenia groźnych patogenów, w tym lęgniowców. W Polsce i w Europie po 1981 roku były one jedną z przyczyn obumierania dębów, kiedy to sezon wegetacyjny był deszczowy, a następnie panowały dotkliwe susze. Przeprowadzone w Niemczech i Francji badania wykazały, że pierwotną przyczyną zamierania drzew było występowanie patogenów z rodzaju *Phytophthora* i *Pythium* (Oszako i in., 2009; Thomas i in., 2002).

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie obecności patogenów należących do lęgniowców bytujących w glebie szkółki leśnej Trawice (Nadleśnictwo Lipusz) i identyfikacja najliczniej występujących gatunków w glebie pobranej z kwater z dębem bezszypułkowym (*Quercus petraea*) wysianych w latach 2012 i 2013.

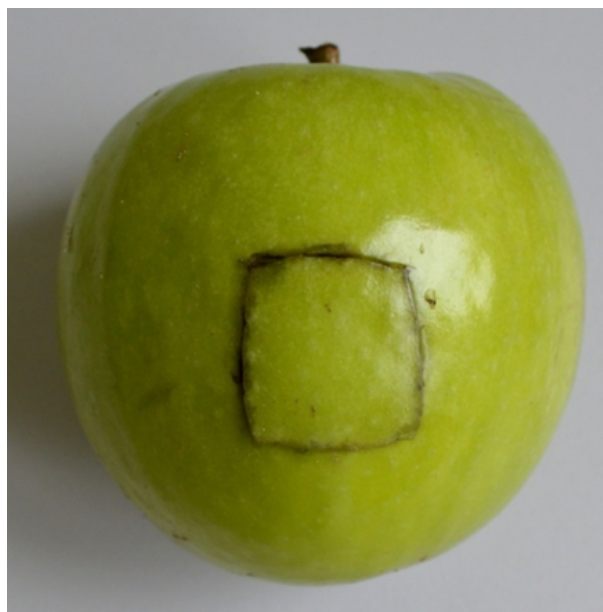
MATERIAŁ I METODY

Szkółkę leśną Trawice (54°03'18"N i 17°44'44"E) założono w 1981 roku w południowej części Nadleśnictwa Lipusz. Woda do basenu w szkółce czerpana jest z jeziora Wielkie Sarnowicze. Na terenie szkółki corocznie stwierdza się występowanie patogenów zgorzelowych należących między innymi do rodzajów *Fusarium* i *Rhizoctonia*.

W marcu 2016 roku pobrano po 10 prób gleby z dwóch kwater z dębem bezszypułkowym wysianym w 2012 i 2013 roku. Z każdej kwatery pobrano po pięć prób ze środkowych rzędów w losowo wybranych miejscach. Próby gleby pobierano do głębokości 10–15 cm, a ich waga wynosiła ok. 1 kg. Dąb bezszypułkowy wysiany jesienią 2012 roku zebrano z drzewostanu nr MP/1/44166/05. Dąb bezszypułkowy wysiany jesienią 2012 i 2013 roku pochodził z tego samego drzewostanu. Kwatery, na których wysiany był dąb otaczały krzewy i drzewa biocenotyczne takich gatunków, jak: lipa, jawor, klon, jarząb, grab, kruszyna. Żołędzie przed siewem zostały zaprawione środkiem chemicznym, po wysianiu zabezpieczone siatką cieniującą, a w sezonie kwatery były regularnie pielone. Sadzonki były zabezpieczane matami z agrowłókniny przed późnymi przymrozkami oraz były deszczowane. Na pękające pąki i podczas sezonu wegetacyjnego wykonano opryski przeciwko mączniakowi prawdziwemu dębu.

Zastosowano trzy metody detekcji patogenów: (1) w otworach wydrążonych w jabłkach, (2) z jabłkami w wodzie, (3) wykorzystując pułapki liściowe na powierzchni wody. Do izolacji zakażonego materiału roślinnego wykorzystano pożywkę PARPH (Papavizas i in., 1981), która ogranicza wzrost bakterii oraz większości grzybów, pozwalając jednak rozwijać się lęgniowcom, które są na nie niewrażliwe.

Pierwsza metoda (1) polegała na umieszczeniu gleby w wyciętych otworach w jabłkach (rys. 1). Do każdej z pobranych prób gleby zostały użyte po dwa zielone jabłka odmiany 'Golden Delicious'. Jabłka musiały mieć jednolity zielony kolor, co ułatwia szybkie wykrywanie pojawiających się nekroz. Jabłka myto płynem do mycia naczyń i osuszano. Następnie za pomocą skalpela w każdym z nich wycięto po trzy otwory o wielkości około 2 cm². W każdym otworze po usunięciu miąższu umieszczono glebę, następnie lekko nawilżono wodą destylowaną, przykryto wyciętą skórką jabłka i zabezpieczono parafilmem. Po stwierdzeniu występowania nekrozy (rys. 2) jabłka krojono w celu wyszczepienia tkanek na szalki



Rys. 1. Jabłko po umieszczeniu w nim gleby (fot. Karina Maria Anklewicz)

Fig. 1. An apple with the soil sample placed inside (photo Karina Maria Anklewicz)



Rys. 2. Jabłko po pojawieniu się zgnilizny (fot. Karina Maria Anklewicz)

Fig. 2. An apple with visible necrosis (photo Karina Maria Anklewicz)



Rys. 3. Jabłka umieszczone w pojemniku z wodą i glebą (fot. Karina Maria Anklewicz)

Fig. 3. Apples placed in a soil and water filled container (photo Karina Maria Anklewicz)

Petriego z pożywką PARPH. Wykładanie części miąższu na wcześniej przygotowaną pożywkę odbywało się w warunkach sterylnych w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Szalki Petriego dodatkowo zostały zabezpieczone parafilmem.

Druga metoda (2) polegała na wyłożeniu jabłek na pobraną próbkę gleby i zalania jej wodą (rys. 3). W tym celu do każdej z 10 prób przygotowano pojemnik o objętości 3 l. Na dno każdego pojemnika wysypano glebę i zalano ją do połowy pojemnika wodą. Następnie w każdym z nich umieszczono dwa jabłka. Po zaobserwowaniu tkanek nekrotycznych pobrano inokula, które przeniesiono na płytki Petriego z pożywką PARPH i poddawano kolejnym czynnościom opisanym przy pierwszej metodzie.

Trzecia metoda (3) była oparta na detekcji patogenów z użyciem liści dębu (rys. 4). Dla każdej z 10 prób przygotowano pojemnik o objętości ok. 3 l. Następnie na dno wysypano ok. jednej łyżki gleby i zalano wodą do połowy pojemnika. Na zalaną glebę wyłożono po pięć liści dębu odwróconych górną stroną blaszki liściowej ku dołowi. Kiedy na liściach pojawiły się



Rys. 4. Pułapka z wykorzystaniem liści dębu (fot. Karina Maria Anklewicz)

Fig. 4. Oak leaves baiting technique (photo Karina Maria Anklewicz)



Rys. 5. Zainfekowany liść dębu z nekrotycznymi plamami (fot. Karina Maria Anklewicz)

Fig. 5. Infected oak leaf with visible necrosis (photo Karina Maria Anklewicz)

plamy (rys. 5), pobrano z nich próby i przeniesiono na płytkę Petriego z pożywką PARPH. Oznaczanie uzyskanych izolatów przeprowadzono metodą klasyczną na podstawie cech morfologicznych izolowanych

kultur widocznych pod mikroskopem świetlnym Primo Star Zeiss w odpowiednim powiększeniu.

WYNIKI

W wyniku identyfikacji lęgnowców występujących w glebie szkółki Trawice zidentyfikowano następujące gatunki lęgnowców: *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, *Pythium ultimum* var. *ultimum* i *Phytophthium vexans*. Najczęściej występującym gatunkiem w badanych próbach był *P. ultimum*, natomiast najrzadziej *P. sylvaticum*. W próbach 1/12, 2/12, 5/12, 2/13 i 3/13 zidentyfikowano te same gatunki lęgnowców za pomocą trzech zastosowanych metod (tab. 1).

DYSKUSJA I WNIOSKI

W badaniach zidentyfikowano następujące gatunki patogenicznych lęgnowców mogących wywoływać zgorzel siewek: *Pythium sylvaticum*, *P. ultimum*, *P. ultimum* var. *ultimum* (Weiland i in., 2014) i *Phytophthium vexans* (Lehtijärvi i in., 2017; Schroeder, 2006).

Tabela 1. Lęgnowce zidentyfikowane za pomocą roślin pułapkowych

Table 1. Oomycetes identified with baiting

Numer próby Sample no.	Metoda – Baiting technique		
	jabłka apples	jabłka w wodzie apples in water	liście dębu oak leaves
1/12	<i>P. sylvaticum</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. sylvaticum</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. sylvaticum</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>
2/12	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>Phytophthium vexans</i>	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>P. vexans</i>	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>P. vexans</i>
3/12	<i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i>	<i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i>
4/12	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i>	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i>	<i>P. vexans</i> , <i>P. sylvaticum</i> , <i>P. ultimum</i>
5/12	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>P. ultimum</i>	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>P. ultimum</i>	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>P. ultimum</i>
1/13	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>
2/13	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i>	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i>	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i>
3/13	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. vexans</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>
4/13	<i>P. ultimum</i>	<i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i>	<i>P. ultimum</i> , <i>P. sylvaticum</i> , <i>P. vexans</i>
5/13	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>P. ultimum</i>	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> , <i>P. ultimum</i>

Uzyskane wyniki wskazują, że w obu kwaterach z dębem bezszypułkowym występują takie same patogeny, które powszechnie powodują zgorzele siewek w szkółkach (Jarvis, 1992). Zanurzając jabłka w wodzie i wykorzystując pułapki liściowe, wykryto najwięcej patogenów. Najmniej patogenów zidentyfikowano, wykorzystując metodę detekcji poprzez umieszczenie gleby w otworach jabłek. Potwierdza to fakt, że woda jest optymalnym miejscem do rozwoju lęgniowców (Chandelier i in., 2006; Ptaszek i in., 2015). Należy zatem w szkółkach leśnych zwrócić uwagę na właściwy sposób nawadniania roślin (Lee i Oki, 2013; Orlikowski i in., 2013).

Identyfikacja patogenów powodujących zgorzele siewek niesie ze sobą wiele problemów. W detekcji lęgniowców często nie wystarcza używanie tradycyjnych pożywek agarowych, korzysta się zatem z pożywek selekcyjnych oraz roślin pułapkowych. Roślina pułapkowa musi spełniać określone warunki, takie jak: wrażliwość na patogen, łatwa dostępność przez cały sezon wegetacyjny i niewielkie koszty związane z jej wykorzystaniem. Pułapkami do izolacji organizmów powodujących fytoftorozę są owoce, siewki i liście. Lepsze efekty identyfikacji uzyskuje się z tkanek świeżo zasiedlonych przez gatunki *Phytophthora* (Oszako, 2002). Detekcje patogenów z wykorzystaniem pułapek liściowych i jabłek są metodami łatwo dostępnymi, szybkimi i tanimi. Wykorzystywanie ich w szkółkach leśnych może być pomocne przy wykrywaniu patogenicznych lęgniowców i z powodzeniem można je wykorzystać w praktyce.

PIŚMIENNICTWO

- Baker, K. F., Matkin, O. A. (1978). Detection and control of pathogens in water. *Ornam. Norw. Newsl.*, 2(2), 12–13.
- Brasier, C. M. (1996). *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Sci. For.*, 53, 347–358.
- Brasier, C. M., Scott, J. (1994). European oak declines and global warming a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *Bull. OEPP/EPPO*, 24, 221–232.
- Chandelier, A., Abras, S., Laurent, F., Debruxelles, N., Cavelier, M. (2006). Effect of temperature and bacteria on sporulation of *Phytophthora alni* in river water. *Comm. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 71, 873–880.
- Gruenwald, N. J., Goss, E. M., Press, C. M. (2008). *Phytophthora ramorum*: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and ramorum blight on woody ornamentals. *Mol. Plant Pathol.*, 9(6), 729–740.
- Holdich, D. M., Reeve, I. D. (1991). Distribution of freshwater crayfish in the British Isles, with particular reference to crayfish plague, alien introductions and water quality. *Aquatic Conserv.*, 1, 139–158.
- Jarvis, W. R. (1992). *Managing diseases in greenhouse crops*. APS Press.
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., Huitema, E. (2012). The oomycete broadhost-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Pathol.*, 13(4), 329–337.
- Lee, E., Oki, L. R. (2013). Slow sand filters effectively reduce *Phytophthora* after a pathogen switch from *Fusarium* and a simulated pump failure. *Water Res.*, 15, 47(14), 5121–5129.
- Lehtijärvi, A., Aday Kaya, A. G., Woodward, S., Jung, T., Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Osswald, W. (2017). Oomycota species associated with deciduous and coniferous seedlings in forest tree nurseries of Western Turkey. *For. Pathol.*, 47(5), e12363.
- Migliorini, D., Ghelardini, L., Tondini, E., Luchi, N., Santini, A. (2015). The potential of symptomless potted plants for carrying invasive soilborne plant pathogens. *Divers. Distrib.*, 21, 1218–1229.
- Oak, S. W., Smith, W. D., Tkacz, B. M. (2004). *Phytophthora ramorum* detection surveys for forests in the United States. W: *Progress in research on phytophthora diseases of forest trees. Proceedings of the Third International IUFRO Working Party S07.02.09 Meeting at Freising* (s. 11–18).
- Orlikowski, L. B., Szkuta, G. (2002). Fytoftorozę w szkółkach roślin ozdobnych w Polsce [Phytophthorosis in ornamental plant nurseries in Poland]. *Pr. Inst. Bad. Leśn. Ser. A*, 2, 134–137 [in Polish].
- Orlikowski, L. B., Szkuta, G. (2008). Zagrożenie szkółek pojemnikowych roślin ozdobnych przez *Phytophthora* spp. w minionym piętnastolecu [The threat to container nurseries of decorative plants by *Phytophthora* spp. in the past fifteen years]. *Sylwan*, 152 (9), 44–50 [in Polish].
- Orlikowski, L. B., Ptaszek, M., Trzewik, A., Orlikowska, T. (2011a). Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody [Applicability of leaf traps to detect *Phytophthora* spp. from water]. *Sylwan*, 155(7), 493–499.
- Orlikowski, L. B., Ptaszek, M., Trzewik, A., Orlikowska, T., Meszka, B., Sadowski, C. (2011b). Woda jako źródło przeżywania i rozprzestrzeniania gatunków *Phytophthora* [Water as a source of survival and spread of

- Phytophthora* species]. Infrastruk. Ekol. Teren. Wiejs., 5, 251–261.
- Orlikowski, L. B., Ptaszek, M., Trzewik, A., Orlikowska, T. (2013). Woda jako źródło zagrożenia roślin w środowisku przez *Phytophthora* spp. [Water as a source of environmental threat to plants by *Phytophthora* spp.]. Pol. J. Agron., 15, 8–13.
- Oszako, T. (2002). Rola organizmów z rodzaju *Phytophthora* w zamieraniu drzew liściastych [The role of *Phytophthora* organisms in the dieback of deciduous trees]. Pr. Inst. Bad. Leśn. Ser. A, 2, 128–130.
- Oszako, T., Hilszczańska, D., Nowakowska, J., Sikora, K., Szmidla, H., Tkaczyk, M., ..., Olchowik, J. (2014). Zintegrowana ochrona szkółek przed nowymi, inwazyjnymi patogenami w warunkach ograniczonego wyboru fungicydów [Integrated protection of nurseries against new, invasive pathogens at a limited selection of fungicides]. Warszawa: Instytut Badawczy Leśnictwa.
- Oszako, T., Hilszczański, J., Orlikowski, L. B., Nowakowska, J. (2009). Zamieranie drzewostanów liściastych [Dieback of deciduous stands]. Notat. Nauk. Inst. Bad. Leśn., 5, 1–6.
- Papavizas, G. C., Bowers, J. H., Johnston, S. A. (1981). Selective isolation of *Phytophthora capsici* from soils. Phytopathology, 71, 129.
- Ptaszek, M., Orlikowski, L. B., Treder, W. (2015). Skażenie cieków i zbiorników wodnych przez gatunki *Phytophthora*. Infrastruk. Ekol. Teren. Wiejs., 2/1, 209–220.
- Sawicki, A. (2009). Fytoftoroza – zdemaskowana po latach [Phytophthora – uncovered after years]. Tryb. Leśn., 9, 8–10.
- Schroeder, K. L., Okubara, P. A., Tambong, J. T., Lévesque, C. A., Paulitz, T. C. (2006). Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in Eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. Ecol. Epidemiol., 96(6), 637–647.
- Thomas, F. M., Blank, R., Hartmann, G. (2002). Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. Forest Pathol., 32, 4–5, 277–307.
- Weiland, J. E., Santamaria, L., Grünwald, N. J. (2014). Sensitivity of *Pythium irregulare*, *P. sylvaticum*, and *P. ultimum* from forest nurseries to mefenoxam and fosetyl-Al, and control of *Pythium* damping-off. Plant Dis., 98, 937–942.
- Wiejacha, K., Szkuta, G., Orlikowski, L. B., Orlikowska, T. (2004). *Phytophthora* – patogeny drzew i krzewów. Detekcja i identyfikacja [Phytophthora – pathogens of trees and shrubs. Detection and identification]. Biotechnologia, 3, 55–68.
- Yang, X., Balci, Y., Brazeel, N. J., Loyd, A. L., Hong, C. X. (2016). A unique species in *Phytophthora* clade 10, *Phytophthora intercalaris* sp. nov., recovered from stream and irrigation water in the eastern USA. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol., 66, 845–855.

OOMYCETES IN THE TRAWICE FOREST NURSERY (LIPUSZ FOREST DISTRICT)

ABSTRACT

Introduction. The purpose of the study was to detect Oomycetes living in the soil of two beds with sessile oak in the Trawice forest nursery in the Lipusz Forest District.

Material and methods. Three baiting techniques for pathogen detection were applied by: (1) placing soil samples in holes drilled in apples, (2) placing apples in watered soil samples, and (3) using leaf traps.

Results and conclusions. In the soil of the Trawice forest nursery, the following Oomycetes were identified: *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, *Pythium ultimum* var. *ultimum* and *Phytophthora vexans*. The most frequently occurring species was *P. ultimum*, and the least frequent was *P. sylvaticum*. The above pathogen detection methods are readily available, fast and affordable. Using them in forest nurseries might be helpful in determining the occurrence of Oomycetes.

Keywords: Oomycetes, *Phytophthora*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Quercus petraea*, forest nursery