

MARCIN WIT, ZBIGNIEW SIEROTA, TOMASZ OSZAKO, EWA MIRZWA-MRÓZ,  
WOJCIECH WAKULIŃSKI

## *Fusarium* spp. na nadziemnych organach zamierających dębów – nowe zagrożenie?\*

*Fusarium* spp. on the above-ground organs of dying oaks – a new threat?

### ABSTRACT

Wit M., Sierota Z., Oszako T., Mirzwa-Mróż E., Wakuliński W. 2015. *Fusarium* spp. na nadziemnych organach zamierających dębów – nowe zagrożenie? Sylwan 159 (5): 403-410.

Oak decline is insufficiently described problem. Declining oaks are in various age and the most commonly observed symptoms of the disease include growth inhibition and buds mortality. The dieback occurs periodically, mainly because of the impact of abiotic factors (drought, frost and the lowering of the groundwater level). In this complex phenomenon the biological factors, including numerous species of *Chromista* (*Chromakaeolata*) and fungi play important role as well. The list of pathogens responsible for the dieback includes numerous species of *Pythium* and *Phytophthora*, as well as *Biscogniauxia*, *Discula*, *Pleurophoma*, *Botryosphaeria* and *Diplodia*. Among other organisms responsible for the oak decline are fungi belonging to *Fusarium* species. The aim of this study was to investigate the species composition of pathogens colonizing the dying oak buds including undeveloped or dying shoots obtained from Łomża, Rudka and Czarna Białostocka forest districts (eastern Poland). Sampling of symptomatic shoots of *Quercus robur* L. was performed in 2013, respecting different parts of tree crowns (top, central and bottom). Mycological material for analysis included mycelium growing on dying shoots after incubation in a chamber and tissue collected from symptomatic shoots and placed on PDA medium. For selected isolates of fungi the identification was confirmed by the PCR analysis using ITS1 and ITS4 primers. Among analyzed fungi *Fusarium* spp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Botryosphaeria quercuum* and *Coniothyrium* spp. required special attention. The *Fusarium* spp. group of fungi dominated with an average frequency of 32%. The molecular analysis revealed the presence of several species including *Fusarium avenaceum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Lophiostoma corticola* and *Nectria mauritica*.

### KEY WORDS

oak decline, *Fusarium* spp.

### ADDRESSES

Marcin Wit <sup>(1)</sup> – e-mail: marcin\_wit@sggw.pl

Zbigniew Sierota <sup>(2)</sup> – e-mail: Z.Sierota@ibles.waw.pl

Tomasz Oszako <sup>(2, 3)</sup> – e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

Ewa Mirzwa-Mróż <sup>(1)</sup> – e-mail: ewa\_mirzwa\_mroz@sggw.pl

Wojciech Wakuliński <sup>(1)</sup> – e-mail: wojciech\_wakulinski@sggw.pl

<sup>(1)</sup> Samodzielny Zakład Fitopatologii, SGGW w Warszawie; ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

<sup>(2)</sup> Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

<sup>(3)</sup> Zamiejscowy Wydział Leśny, Politechnika Białostocka; ul. Piłsudskiego 8, 17-200 Hajnówka

\*Badania wykonano w ramach tematu BLP321 zleconego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych.

## Wstęp

Zamieranie dębów stanowi bardzo istotny i nadal nie w pełni zdiagnozowany problem zarówno w Polsce [Oszako i in. 2009, 2013], jak i w Europie, Azji oraz Ameryce Północnej i Łacińskiej [Montecchio i in. 2004; Denman, Webber 2009; McConnell, Balci 2014]. Jedne z pierwszych opisów silnych uszkodzeń drzewostanów dębowych w Polsce pochodzą z lat 50. ubiegłego stulecia z Nadleśnictwa Krotoszyn. Przybierające na znaczeniu w tym regionie zjawisko było przedmiotem także późniejszych doniesień [Oszako i in. 2009, 2013]. Porażeniu ulegają rośliny o zróżnicowanej strukturze wiekowej, a najczęściej obserwowanymi pierwszymi objawami choroby, czyli zmian w „normalnym” funkcjonowaniu drzewa, jest zahamowanie wzrostu roślin oraz zamieranie pąków.

Kowalski [1996] wyróżnia pięć grup symptomów, które mogą towarzyszyć zamieraniu dębów. Są to: lokalne rany rakowate, rozległe rany rakowate tworzące pasy i obejmujące znaczną część obwodu pędów, eliptyczne nekrozy penetrujące do tkanek drewna, spękania kory na zamarłych i żywych pędach. Ragazzi i in. [1989] uważają, że brak jest zależności pomiędzy typem objawów a wiekiem drzew, natomiast czynnik ten w istotny sposób jest skorelowany ze stopniem porażenia i dynamiką przebiegu choroby. Widoczna jest jednak tendencją gwałtownego zamierania dębów w młodych nasadzeniach (do 25 lat), nawet w przeciągu jednego sezonu wegetacyjnego. W przypadku drzew starszych proces rozciągnięty jest na 2-3 lata.

Zamieranie dębów przypisywane jest także oddziaływaniu okresowo występujących niekorzystnych czynników abiotycznych (susze, mrozy) oraz obniżającemu się poziomowi wód gruntowych [Andrzejczyk 2009; Oszako i in. 2013; Corcobado i in. 2014]. Przyczyną zamierania dębów mogą być także czynniki etiologiczne, w tym liczne gatunki należące do królestwa *Chromista* (*Chromalveolata*) oraz grzybów. W kompleksie patogenów odpowiedzialnych za zamieranie dębów wymienia się wiele gatunków z rodzaju *Pythium* i *Phytophthora*, jak również *Biscogniauxia*, *Discula*, *Pleurophoma*, *Botryosphaeria* oraz *Diplodia* [Luque, Girbal 1989; Brasier 1996; Frisullo i in. 2000; Sanchez i in. 2003; Orlikowski, Wiejacha 2005; Oszako, Orlikowski 2005; Romero i in. 2007; Maddau i in. 2011; Corcobado i in. 2014].

Do grupy czynników uczestniczących w zjawisku zamierania dębów zalicza się także gatunki *Fusarium*. O występowaniu *Fusarium solani* na korze dębów (*Quercus robur* L.) donosił Kowalski [1996]. *Fusarium eumartii* został rozpoznany jako przyczyna tracheomykozy *Quercus robur* [Ragazzi i in. 2001]. Przyczyną zamierania dębów może być też *F. oxysporum* [Gallego i in. 1999]. Natomiast Bartnik [1997] obserwował objawy zgnilizny korzeni dębów powodowane przez kompleks grzybów, w tym *Fusarium* spp.

Celem przeprowadzonych badań było poznanie składu gatunkowego patogenów zasiedlających zamierające pąki dębu szypułkowego pochodzące z materiału roślinnego, w skład którego wchodziły pędy z niewykształconymi i obumarłymi pąkami.

## Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły zamierające wieloletnie, zdrewniałe pędy *Quercus robur* L. pobierane w 2013 roku z różnych części korony drzewa. Ogółem w badaniach wykorzystano 51 pędów (tab. 1), w tym z Nadleśnictwa Rudka 6 pędów z drzewostanu w wieku 68 lat, z Nadleśnictwa Łomża po 5 pędów pochodzących z dwóch oddziałów – drzewostanu w wieku 49 lat oraz z drzewostanu 60-letniego – oraz z Nadleśnictwa Czarna Białostocka 30 pędów pobranych po 10 z wierzchołkowej, środkowej i dolnej części korony drzewostanu w wieku około 40 lat.

Materiał do analizy mykologicznej stanowiła grzybnia rozwijająca się na porażonych pędach dębów po ich inkubacji w komorze wilgotnościowej oraz izolaty uzyskane z pędów wyłożonych

Tabela 1.

Pochodzenie prób materiału roślinnego

Source of samples of the plant material

Nadleśnictwo, leśnictwo (oddział)	Pochodzenie materiału roślinnego	Wiek [lata]	Liczba pędów
Forest district, range (compartment)	Plant material origin	Age [years]	Number of shoots
Rudka	hodowla wazonowa culture	68	3
Rudka	drzewostan stand	68	3
Łomża, Zaręby Kościelne (16)	drzewostan stand	49	5
Łomża, Zaręby Kościelne (17)	drzewostan stand	49	5
Łomża, Żabikowo (95)	drzewostan stand	60	5
Czarna Białostocka	drzewostan, wierzchołkowa część korony stand, top part of the crown	±40	10
Czarna Białostocka	drzewostan, środkowa część korony stand, central part of the crown	±40	10
Czarna Białostocka	drzewostan, dolna część korony stand, bottom part of the crown	±40	10

na podłoże PDA w płytkach Petriego. Analizę mykologiczną przeprowadzono w oparciu o 10 15-milimetrowych fragmentów, które pobierano z każdego pędu. Pobrane fragmenty wykładano w płytkach Petriego na bibułę filtracyjną wysyconą wodą destylowaną. Inkubację materiału prowadzono przez 4 doby w temperaturze 20°C. Po przewidzianym okresie inkubacji uzyskane kolonie poddawano analizie makro- i mikroskopowej w preparatach bezpośrednich. Pędy, z których pozyskiwano kultury akseniczne, płukano 20 minut pod bieżącą wodą wodociągową, po czym odkażano 5 minut w 10-procentowym podchlorynie sodu, następnie płukano 3-krotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Izolację grzybów z materiału roślinnego przeprowadzono z 5-milimetrowych fragmentów, które po pobraniu z pędu wykładano na podłoże PDA (ang. Potato Dextrose Agar) w płytkach Petriego, po 5 fragmentów na płytce, a następnie inkubowano w temperaturze 20°C przez 10 dni. Z każdego pędu do analizy pobierano 30 fragmentów. Uzyskane kultury diagnozowano. W preparatach sprawdzano obecność struktur mikroskopijnych grzybów i diagnozowano je [Marcinkowska 2012]. Grzyby z rodzaju *Fusarium* oznaczano w oparciu o klucze [Marasas i in. 1984; Kwaśna i in. 1991; Leslie, Summerell 2006]. W badaniach uwzględniono wygląd kolonii, rewersu i awersu, a przede wszystkim struktury morfologiczne o szczególnym znaczeniu w taksonomii *Fusarium* spp.

Dla wybranych izolatów grzybów wiarygodność przeprowadzonej taksonomii weryfikowano metodą molekularną. Analizę tę przeprowadzono za pomocą techniki PCR, przy zastosowaniu zestawu Phire Plant Direct PCR Kit (producent Thermo Scientific) umożliwiającego amplifikację DNA bezpośrednio, bez potrzeby jego izolacji z plechy grzyba.

Początkową denaturację przeprowadzono przez 5 minut w temperaturze 94°C. Następna denaturacja trwała 30 sekund (również 94°C). Przyłączanie startera odbywało się w 40 cyklach

po 30 sekund (temperatura 52°C). Wydłużanie startera przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 30 sekund i potem przez 7 minut. Proces kończono schładzaniem w 4°C. Procesy denaturacji, hybrydyzacji i elongacji zostały wykonane w cyklu 40 powtórzeń. Analizy PCR prowadzono przy zastosowaniu starterów ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') oraz ITS4 (5'-TCCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (ang. Internal Transcribed Spacer) [White i in. 1990]. Obecność produktów reakcji PCR o wielkości około 470 par zasad potwierdzano za pomocą elektroforezy.

Dla analizowanych izolatów uzyskane produkty reakcji PCR sekwencjonowano z wykorzystaniem starterów ITS w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Odczytane sekwencje nukleotydów poddano analizie porównawczej przy pomocy programu BLAST zamieszczonego w serwisie internetowym NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information). Zastosowany program umożliwił obliczenie istotności dopasowań sekwencji (E-value), czyli oczekiwanej liczby losowych dopasowań o takim samym podobieństwie do sekwencji kwerendowej, jakie uzyskano w ocenianym przypadku.

## Wyniki

Wśród wszystkich prób materiału roślinnego badanych metodami mykologicznymi nie zanotowano deformacji pędów. Stwierdzono natomiast zdrobnienie oraz brak rozwoju pąków, które wewnątrz, po przekrojeniu, charakteryzowały się zieloną barwą.

W pędach dębów pochodzących z drzew Nadleśnictw Rudka, Łomża i Czarna Białostocka stwierdzono występowanie grzybów: *Fusarium* spp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Botryosphaeria quercuum* i *Coniothyrium* spp. (tab. 2). Dominującą grupę grzybów stanowiły gatunki z rodzaju *Fusarium* (ryc. 1). Występowały one ze średnią frekwencją 32%. Najczęściej patogeny te były izolowane z pędów pozyskanych na terenie Nadleśnictwa Czarna Białostocka (34%), natomiast istotnie rzadziej *Fusarium* spp. zasiedlały pędy pochodzące z regionu Nadleśnictwa Łomża (26%). Na uwagę zasługuje także częste występowanie *A. alternata*. Gatunek ten stwier-

**Tabela 2.**

Liczba (N) i udział (%) gatunków grzybów wyizolowanych z badanych pędów  
Number (N) and share (%) of fungi species isolated from investigated shoots

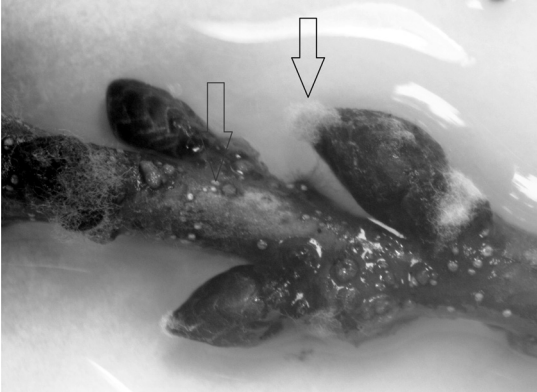
Gatunek Species	Rudka		Łomża		Czarna Białostocka		Razem	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	10	17,86	24	31,58	50	18,32	84	20,74
<i>Botryosphaeria quercuum</i> sensu Dingley ( <i>Botryosphaeria obtusa</i> (Schwein.) Shoemaker)	0	0,00	17	22,38	62	22,71	79	19,50
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	5	8,93	4	5,26	12	4,40	21	5,19
<i>Coniothyrium</i> sp.	11	19,64	0	0,00	0	0,00	11	2,72
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	9	16,07	18	23,68	43	15,75	70	17,28
<i>Fusarium</i> spp.	9	16,07	2	2,63	51	18,68	62	15,31
Kolonie niezarodnikujące bez cech diagnostycznych Collonies without diagnostic features	12	21,43	11	14,47	55	20,14	78	19,26
Ogółem Total	56	100,00	76	100,00	273	100,00	405	100,00

dzono z frekwencją 17,86, 31,58 i 18,32%, odpowiednio z terenu Nadleśnictw Rudka, Łomża i Czarna Białostocka. Nie stwierdzono znaczących różnic w strukturze patogenów występujących na terenie poszczególnych nadleśnictw.

W wyniku przeprowadzonej diagnostyki molekularnej z zastosowaniem starterów ITS uzyskano w reakcji PCR 5 produktów o wielkości zbliżonej do oczekiwanej wartości 470 par zasad. Analiza sekwencji uzyskanych amplikonów wykazała występowanie 4 gatunków: *Fusarium avenaceum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Lophiostoma corticola* i *Nectria maurititcola* (tab. 3, ryc. 2).

## Dyskusja

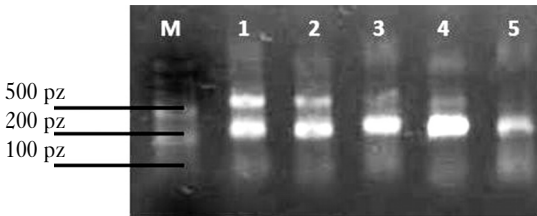
Pędy dębów są bogatym siedliskiem grzybów patogenicznych oraz saprotroficznych. Mikrobiota pędów jest uzależniona od działania niekorzystnych czynników abiotycznych. Wśród zdiagnozowanych gatunków najczęściej stwierdzano grzyby z rodzaju *Fusarium* oraz gatunki *Alternaria*



Ryc. 1.

Pęd dębu, różowa grzybnia oraz sporodochia z zarodnikowaniem *Fusarium avenaceum* (fot. M. Wit)

Oak stem, the pink mycelium and sporodochia with abundant *Fusarium avenaceum* spores (photo M. Wit)



Ryc. 2.

Żel agarowy otrzymany po elektroforezie produktów amplifikacji przy użyciu pary starterów ITS

Agar gel after electrophoresis and amplification products obtained using the pair of ITS primers

M – marker molekularny Fermentas Gene Ruler 100 pz plus (#SM0323); 1-5 – produkty amplifikacji PCR (1, 2 – *Fusarium avenaceum*, 3 – *Nectria maurititcola*, 4 – *Lophiostoma corticola*, 5 – *Cladosporium cladosporioides*)

M – molecular marker Fermentas Gene Ruler 100 bp plus (#SM0323); 1-5 – PCR amplification product (1, 2 – *Fusarium avenaceum*, 3 – *Nectria maurititcola*, 4 – *Lophiostoma corticola*, 5 – *Cladosporium cladosporioides*)

Tabela 3.

Liczba (LS), istotność dopasowania (E) oraz identyczność sekwencji nukleotydowych (I [%]) grzybów rozpoznanych metodą molekularną

Number (LS), expect value (E) and identity (I [%]) of fungal nucleotide sequences recognized by molecular method

	LS	E	I
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1	0,0	97
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	2	3e-83 2e-47	86 95
<i>Nectria maurititcola</i> (Henn.) Seifert & Samuels	1	2e-74	93
<i>Lophiostoma corticola</i> (Fuckel) E.C.Y. Liew, Aptroot & K.D. Hyde	1	0,0	98

*alternata* i *Botryosphaeria quercuum*. *Fusarium* spp. były izolowane z pędów pochodzących z terenu trzech badanych nadleśnictw. Cechą, która wyróżniała porażone pędy, były zamarłe pąki, na których w trakcie inkubacji w komorze wilgotnościowej widoczne były typowe dla *Fusarium* spp. oznaki etiologiczne. Miały one postać sporodochiów oraz obfitej watowatej, białoróżowej grzybni.

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są na ogół polifagami, zasiedlającymi rośliny w różnych fazach wzrostu, czego konsekwencją są różne postacie chorób. Mogą one być przyczyną zgorzeli, plamistości, więdnienia oraz zamierania roślin o dość gwałtownym przebiegu. *Fusarium* spp. mogą także zasiedlać rośliny bezobjawowo. Spośród gatunków *Fusarium* wymienianych jako patogeny *Quercus* sp. podkreślane jest znaczenie *F. oxysporum* f.sp. *quercus* [Gordon 1965], *F. eumartii* [Ragazzi i in. 2002], *F. solani* [Bosso i in. 2012] oraz *F. avenaceum* – gatunku, który dość powszechnie był izolowany z porażonych pędów i jest stosunkowo rzadko wymieniany w literaturze jako patogen dębów. O jego występowaniu na pędach dębów donosiły Szykiewicz i Kwaśna [2004], które izolowały *F. avenaceum* z fragmentów pędów *Q. rubra* wykazujących objawy zgnilizny. *F. avenaceum*, aczkolwiek oryginalnie został wyizolowany z owsa, jest polifagiem. Jego występowanie stwierdzono między innymi na korzeniach i kłosach zbóż, bulwach ziemniaka oraz porażonych sadzonkach wielu gatunków roślin [Desjardins 2006]. Jest to słaby patogen występujący głównie na roślinach osłabionych w wyniku silnego stresu abiotycznego.

Powszechne występowanie *A. alternata* na zamarłych pędach może być wynikiem wtórnego zasiedlenia przez ten gatunek pędów już zamarłych. *A. alternata*, chociaż zasiedla rośliny dość pospolicie, charakteryzuje się bardzo słabymi właściwościami patogenicznymi. Gatunek ten był stwierdzany m.in. na liściach *Q. palustris* [Levetin, Dorsey 2006].

Wyniki te potwierdzone są przez innych autorów w wielu badaniach [Kowalski 1996; Szykiewicz, Kwaśna 2004]. *A. alternata* i *A. tenuissima* izolowano z fragmentów tkanek *Q. robur* z objawami nekroz. Grzyby te stanowiły odpowiednio 1,9 i 1,2% otrzymanych izolatów i występowały w koegzystencji z innymi: *Acremonium* cf. *curvulum*, *Aposphaeria* spp., *Mortierella isabellina*, *Ophiostoma quercus*, *Pezizula cinnamomea*, *Phialocephala* cf. *dimorphospora*, *Phoma cava*, *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. i *Cladosporium cladosporioides* [Kowalski 1996].

Jak wynika z badań Szykiewicz i Kwaśnej [2004], *A. alternata* był najczęściej izolowanym grzybem z fragmentów pędów *Quercus robur*, *Q. petraea* i *Q. rubra* umieszczonych w komorach wilgotnościowych. Na fragmentach pędów z objawami nekroz zanotowano także występowanie *Fusarium torulosum*, *F. avenaceum* oraz sporadycznie *Cladosporium cladosporioides*.

Wśród rozpoznanych gatunków, które mogą być przyczyną zamierania pędów dębu, na uwagę zasługuje *Botryosphaeria quercuum*. O możliwości porażania dębów przez gatunki z rodzaju *Botryosphaeria*, w tym *B. stevensii* i *B. quercuum*, donosili między innymi Alves i in. [2004]. Gatunki te identyfikowano jako sprawców raka oraz zamierania dębów na zachodnich terenach leśnych basenu Morza Śródziemnego.

Uwzględniając skalę zamierania pędów dębów oraz nieliczne (jak dotychczas) informacje w piśmiennictwie na temat szkodliwości *F. avenaceum* w stosunku do dębów, a zwłaszcza jako patogena pąków, niezbędne wydaje się prowadzenie badań nad ustaleniem etiologii tego zjawiska. Wstępne wyniki analiz mykologicznej i molekularnej mogą upoważniać do takiego stwierdzenia, zwłaszcza że symptomy występowania tego grzyba odnotowano w 40-60-letnich drzewostanach dębowych.

## Wnioski

✦ Wśród grzybów zasiedlających pędy dębów z objawami etiologicznymi dominującą grupę stanowią gatunki z rodzaju *Fusarium*.

✦ Występowanie i wysoka frekwencja *Fusarium avenaceum* w pędach dębów jest zjawiskiem jakościowo nowym i wskazuje na potrzebę podjęcia szczegółowych prac z zakresu znaczenia wspomnianego gatunku w etiologii choroby.

## Literatura

- Alves A., Correia A., Luque J., Phillips A. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. Mycologia 96 (3): 598-613.
- Andrzejczyk T. 2009. Dąb szypułkowy i bezszypułkowy. Hodowla. PWRiL, Warszawa. 37-40.
- Bartnik C. 1997. Symptomy chorobowe i uszkodzenia w systemach korzeniowych zamierających dębów oraz grzyby im towarzyszące. Materiały z sympozjum „Fitopatologia wczoraj, dziś i jutro”, 75 lat katedry Fitopatologii SGGW w Warszawie, 23-24 września. 3-10.
- Bosso L., Senatore M., Varlese R., Ruocco M., Garonna A. P., Bonanomi G., Mazzoleni S., Cristinzio G. 2012. Severe outbreak of *Fusarium solani* on *Quercus ilex* vectored by *Xylosandrus compactus*. J. Plant Pathol. 94 (4): 4-99.
- Brasier C. M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. Ann. Sci. For. 53: 347-358.
- Corcobado T., Cubera E., Juárez E., Moreno G., Solla A. 2014. Drought events determine performance of *Quercus ilex* seedlings and increase their susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. Agricultural and Forest Meteorology 192-193: 1-8.
- Denman S., Webber J. 2009. Oak declines new definitions and new episodes in Britain. Quarterly Journal of Forestry: 285-290.
- Desjardins A. E. 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics, and biology. The American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, Minnesota.
- Frisullo S., Camele I., Carlucci A., Lops F. 2000. Micromiceti dei generi *Botryosphaeria* e affini su querce deperienti in Puglia e Basilicata. Petria 10: 1-10.
- Gallego F. J., Perez de Algaba A., Fernandez-Escobar R. 1999. Etiology of oak decline in Spain. Eur. J. For. Path. 29: 17-27.
- Gordon W. L. 1965. Pathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Botany 43 (11): 1309-1318.
- Kowalski T. 1996. Oak decline II. Fungi associated with various types of lesions on stems and branches of young oaks (*Quercus robur*). Österr. Z. Pflzk. 5: 51-63.
- Kwaśna H., Chelkowski J., Zajkowski P. 1991. Grzyby (*Mycota*), Grzyby niedoskonałe (*Deuteromycetes*), Strzępczakowe (*Hyphomycetales*), Gruźelkowate (*Tuberculariaceae*), Sierpik (*Fusarium*). Inst. Botaniki PAN, Warszawa – Kraków. T. XXII.
- Leslie J. F., Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Ames, IA, USA.
- Levetin E., Dorsey K. 2006. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. Aerobiologia. 22: 3-12.
- Luque J., Girbal J. 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. Eur. J. For. Path. 19: 7-13.
- Maddau L., Perrone C., Andolfi A., Spanu E., Linaldeddu B. T., Evidente A. 2011. Phytotoxins produced by the oak pathogen *Discula quercina*. For. Pathol. 41: 85-89.
- Marasas W. F. O., Nelson P. E., Toussoun T. A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Marcinkowska J. 2012. Oznaczanie rodzajów grzybów *sensu lato* ważnych w fitopatologii. PWRiL, Warszawa.
- McConnell M. E., Balci Y. 2014. *Phytophthora cinnamomi* as a contributor to white oak decline in Mid-Atlantic United States Forests. Plant Disease. 98 (3): 319-327.
- Montecchio L., Causin R., Rossi S., Mutto Accordi S. 2004. Changes in ectomycorrhizal diversity in a declining *Quercus ilex* coastal forest. Phytopathol. Mediterr. 43: 26-34.
- Orlikowski L. B., Wiejacha K. 2005. *Phytophthora ramorum*, nowy inwazyjny czynnik chorobotwórczy dla roślin na świecie i w Polsce. Post. Nauk Rol. 6: 3-14.
- Oszako T., Hilszczański J., Orlikowski L. B., Nowakowaska J. 2009. Zamieranie drzewostanów liściastych. Notatnik Naukowy IBL 5 (85): 1-6.
- Oszako T., Kubiak K., Tkaczyk M. 2013. Fosforyny i monitoring lotniczy – przeciw fytoforozom. Las Polski. 20: 10-11.
- Oszako T., Orlikowski L. B. 2005. Pierwsze dane o występowaniu *Phytophthora cinnamomi* na dębie szypułkowym w Polsce. Sylwan 149 (10): 47-53.
- Ragazzi A., Dellavalle Fedi I., Mesturino L. 1989. The oak decline: a new problem in Italy. Eur J For Pathol 19: 105-110.
- Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I., Turco E. 2001. *Fusarium eumartii* Growth in Resistant and Susceptible Oak Species. J. Phytopathology 149: 503-507.
- Ragazzi A., Moricca S., Turco E., Dellavalle I. 2002. Dendroclimatic analysis of *Quercus robur* infected with *Fusarium eumartii*. Phytopathologia Mediterranea 41: 131-137.

- Romero M. A., Sanchez J. E., Jiminez J. J., Belbahri L., Trapero A., Lefort F., Sanchez M. E. 2007. New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in south-west Spain and Portugal. J. Phytopathol. 155: 289-295.
- Sanchez M. E., Venegas J., Romero M. A., Phillips A. J. L., Trapero A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. Plant Dis 87: 1515-1521.
- Szynkiewicz A., Kwaśna H. 2004. The effects of fungi from acorns with symptoms of black rot and necrotic twigs of oak on *Quercus* seedlings. Phytopathol. Pol. 32: 49-59.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: Innis M. A. i in. [red.]. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, Calif. 315-322.