

Leszek B. ORLIKOWSKI¹, Tomasz OSZAKO², Barbara DUDA², Grażyna SZKUTA³

WYSTĘPOWANIE *PHYTOPHTHORA CITRICOLA* NA JESIONIE WYNIOSŁYM (*FRAXINUS EXCELSIOR*) W SZKÓLKACH LEŚNYCH

OCCURRENCE OF *PHYTOPHTHORA CITRICOLA*
ON ASH (*FRAXINUS EXCELSIOR*) IN FOREST NURSERIES

Abstract. *Phytophthora citricola* was found in 2 forest nurseries on 2-year old ash seedlings with stem and/or root rot symptoms. Additionally, among others 2 *Fusarium* species, *Phomopsis* sp. and *Trichoderma* spp. were isolated from diseased tissues. Isolates of *P. citricola* from ash, silver fir, beech, birch and rhododendron colonised leaf blades and stem parts of ash. In greenhouse trials 4 pathogen isolates from various plants caused stem base rot of ash seedlings. Necrosis spread about 0,65 mm per 24 hrs. This is the first report on the occurrence of *P. citricola* on ash seedlings in Poland.

Key words: seedlings, ash, isolation, *Phytophthora*, colonisation.

¹ Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, 96–100 Skierniewice, ul. Pomologiczna 18

² Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Las, 05–090 Raszyn

³ Główny Inspektorat Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa
– Centralne Laboratorium, 87-100 Toruń, Żwirki i Wigury 73

1. WSTĘP

Jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior* L.), jeden z komponentów lasów mieszanych i parków, jest drzewem chętnie sadzonym wzdłuż dróg. W latach 1997–2003 obserwowano często zamieranie pojedynczych konarów jesionów lub nawet całych drzew. W lasach, często już na kilkuletnich drzewach, obserwowano zgniliznę korzeni i podstawy pnia, prowadzącą do zamierania. Dotychczas brakuje potwierdzonych doświadczeniami infekcyjnymi danych o czynnikach chorobotwórczych wywołujących omówione symptomy chorobowe. Obumieranie wierzchołków pędów oraz zgniliznę korzeni i podstawy pędu stwierdzano również w szkółkach leśnych na 1–3-letnich siewkach, a straty z powodu ich zamierania wynosiły od 1 do 10%. Ocenę stanu zdrowotnego siewek jesionu prowadzono przy okazji obserwacji zdrowotności sadzonek roślin iglastych oraz buka, dębu i jarzębu pospolitego. Brązowienie, brunatnienie i zamieranie części lub całych korzeni i częsta zgnilizna podstawy pędu przypominały symptomy chorobowe powodowane przez organizmy grzybopodobne z rodzaju *Phytophthora* na siewkach innych roślin. Między innymi na buku zwyczajnym (*Fagus sylvatica* L.) i jodle pospolitej (*Abies alba* Mill.) stwierdzono występowanie *P. citricola* Sawada (Orlikowski i in. 2004, Werres 1995), a na sośnie zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) – *P. cinnamomi* Rands var. *cinnamomi* (Duda i in. 2004). W monografii dotyczącej *Phytophthora* Novotelnova (1974) wymienia jesion wyniosły wśród żywicieli *P. citrophthora* (Smith et Smith) Leonian.

Celem niniejszych badań* było określenie przyczyny zamierania siewek jesionu wyniosłego w 6 szkółkach leśnych oraz określenie chorobotwórczości *P. citricola* dla siewek i pojedynczych organów.

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. Lustracja szkółek i badanie mikologiczne chorych roślin

Lustrację stanu zdrowotnego jesionu prowadzono w latach 2002–2004 od kwietnia do października w szkółkach województw mazowieckiego, lubelskiego i małopolskiego. W badaniach oceniano barwę liści, występowanie nekrozy na pędzie głównym i odgałęzieniach oraz na systemie korzeniowym. W przypadku siewek kilkumiesięcznych do dwuletnich pobierano do badań mikologicznych całe rośliny, natomiast ze starszych roślin tylko chore ich części. Próbkę przewożono w workach foliowych do laboratorium i płukano dokładnie pod wodą bieżącą, suszono pomiędzy warstwami bibuły filtracyjnej i wycinano z nich te części, które

* Badania były finansowane przez Komitet Badań Naukowych w ramach grantu 0635/PO6/2002/22

miały być przedmiotem dalszej analizy. Fragmenty roślin odkażano nad płomieniem palnika, a następnie skrawki grubości ok. 5 mm pobierano – jeśli było to możliwe – na granicy chorej i zdrowej tkanki. Wykładano je na pożywkę ziemniaczano-glukozową (PDA) oraz wkładano do jabłek z grupy odmian o zielonej barwie. Już po 48 godzinach od wyłożenia fragmentów tkanek na pożywkę i przez następne 4–5 dni wyrastające kolonie przeszczepiano na skosy z PDA. W przypadku jabłek, po zbrązowieniu miąższu wokół miejsca, gdzie wyłożono fragment chorej tkanki, po odkażeniu jego powierzchni nad płomieniem palnika, ścinano skórkę i niewielkie cząstki zbrunatniałego miąższu przenoszono na skosy z PDA. Po kilkunastu dniach inkubacji w temperaturze 24 °C, skosy segregowano na podstawie podobieństwa kolonii grzybów i organizmów grzybopodobnych na grupy, dodatkowo przeglądano je pod mikroskopem i wybrano izolaty reprezentacyjne. Po doprowadzeniu do kultur jednozarodnikowych, grzyby i organizmy grzybopodobne oznaczano do rodzaju i gatunku, posługując się kluczami i opracowaniami monograficznymi.

2.2. Badanie chorobotwórczości *Phytophthora citricola*

Do badań użyto izolaty *P. citricola* pozyskane z jesionu wyniosłego oraz z buka zwyczajnego, jodły pospolitej i różanecznika. W doświadczeniach laboratoryjnych zakażano blaszki liściowe i 10-centymetrowe odcinki jednorocznych pędów jesionu krążkami grzybni *P. citricola* średnicy 3 mm pobieranymi z brzegu kolonii 7-dniowych kultur rosnących na pożywce ziemniaczano-glukozowej w ciemności, w temp. 24 °C. Nanoszono je na środek pojedynczych liści i łodyg, po czym umieszczano w kuwetach wyłożonych sterylną, wilgotną bibułą filtracyjną przykrytą siatką nylonową. Kuwety przykrywano szczelnie folią i umieszczano w temp. 24 °C. Po 4 i 6 dniach mierzono średnicę nekrotycznych plam na liściach i łodygach. W następnym doświadczeniu użyto do inokulacji tylko izolatu z jesionu wyniosłego, a jako roślin testowych użyto brzozy (*Betula pendula* Roth.), buka zwyczajnego i jesionu. Kolonizację zakażonych organów określano po 2 i 4 dniach inkubacji w temperaturze 22–25 °C. Doświadczenia założono w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach po 10 liści i części łodyg i powtórzono je dwukrotnie w odstępach trzytygodniowych.

W doświadczeniu szklarniowym inokula *P. citricola* nanoszono na nasady pędów trzymiesięcznych siewek jesionu, lekko naciętych skalpelem. Dla utrzymania wysokiej wilgotności, pojemniki z siewkami ustawiano na parapecie pod namiotem foliowym. Inkubowano je w temp. 19–25 °C przez 15 dni. Średnicę nekrozy mierzono po 15 i 28 dniach inkubacji. Doświadczenie założono w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach po 5 roślin i powtórzono je dwukrotnie w odstępach 2-tygodniowych.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

3.1. Analiza mikologiczna chorych roślin

W dwóch z sześciu lustrowanych szkótek jesionu wyniosłego stwierdzono występowanie gatunku grzybopodobnego *P. citricola*. Gatunek ten izolowano z roślin pobranych do analizy tylko w 2003 roku. W obu szkótkach wymieniony gatunek stwierdzono na 1/3 analizowanych roślin (tab. 1). Z siewek uzyskano również 9 innych rodzajów i gatunków grzybów i organizmów grzybopodobnych. Spośród nich *Botrytis cinerea* występował tylko na siewkach w jednej szkótkie, natomiast *Fusarium culmorum* stwierdzono w obu lustrowanych obiektach. Na uwagę zasługuje również fakt izolacji *Pythium ultimum* z 1/3 analizowanych roślin (tab. 1). Jest prawdopodobne, że w czasie wschodów i po wschodach, przy wilgotnej pogodzie, gatunek ten może powodować zgorzel siewek jesionu wyniosłego. Na 1/4 siewek pobranych ze szkółki nr 1 stwierdzono występowanie *Phomopsis* sp., czynnika powodującego zrakowacenia na pędach. Przeprowadzone testy in vitro na jednorocznych pędach jesionu nie wykazały jednak ich zasiedlenia przez *Phomopsis* sp. W obu szkótkach na 1/3–1/4 analizowanych siewek stwierdzono występowanie *Trichoderma* spp., znanych antagonistów szeregu patogenów roślin (Denis i Webster 1971), w tym *Phytophthora* spp. (Orlikowski 1995).

Tabela 1. Grzyby i organizmy grzybopodobne wyizolowane z 2-letnich siewek jesionu wyniosłego z objawami zgnilizny korzeni i podstawy pędu (izolacja: 2002–2004)

Table 1. Fungi and fungi-like organisms isolated from two-year old seedlings of ash (*Fraxinus excelsior*) with stem base and root rot symptoms (isolation: 2002–2004)

Rodzaj/gatunek Genera/ species	Numer szkółki leśnej No of forest nurseries			
	I (25 roślin 25 plants)		II (18 roślin 18 plants)	
	liczba zasiedlo- nych roślin number of colo- nised plants	liczba uzyska- nych izolatów number of ob- tained isolates	liczba zasiedlo- nych roślin number of colonised plants	liczba uzyska- nych izolatów number of obtained isolates
<i>Alternaria alternata</i> Nees	2	3	–	–
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	–	–	2	4
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	–	–	3	5
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	3	8	2	6
<i>Mucor</i> spp.	3	7	4	8
<i>Penicillium</i> sp.	–	–	1	2
<i>Phomopsis</i> sp.	6	9	–	–
<i>Phytophthora citricola</i> Sawada	8	23	6	13
<i>Pythium ultimum</i> Trow.	9	13	–	–
<i>Trichoderma</i> spp.	6	11	5	12

3. 2. Ocena chorobotwórczości *Phytophthora citricola*

W doświadczeniu laboratoryjnym 4 badane izolaty *P. citricola* zasiedlały liście (z wyjątkiem kultury z buka) i części łodyg jesionu z tym, że nekroza rozwijała się wolno, średnio ok. 1,6 mm/dobę (tab. 2). Nekrotyczne plamy na liściach rozwijały się istotnie szybciej, gdy liście te zainokulowano izolatem z jesionu (tab. 2). O wolnym zasiedlaniu liści i części łodyg świadczy drugie doświadczenie, w którym do inokulacji użyto izolatu *P. citricola* pobranego z jesionu, a jako rośliny testowe – dodatkowo brzozę i buk (tab. 3). Po 4 dniach inkubacji średnica plam na liściach brzozy była około dwukrotnie większa niż na jesionie, a na łodygach jeszcze większa.

W doświadczeniu szklarniowym, po 15 dniach inkubacji, stwierdzono rozwój nekrozy na siewkach zakażonych 4 izolatami *P. citricola* pobranymi z różnych

Tabela 2. Kolonizacja liści i łodyg jesionu wyniosłego przez różnego pochodzenia izolaty *Phytophthora citricola*; średnica/długość nekrozy w mm po 4 i 6 dniach inkubacji (inokulacja: 2003.07.11)

Table 2. Ash (*Fraxinus excelsior*) leaves and stems colonisation by isolates *Phytophthora citricola* from different host plants; diameter/length of necrosis in mm (inoculation: 2003.07.11)

Źródło izolatów Isolate sources	Liście Leaves		Części łodyg Parts of stems	
	po 4 dniach inkubacji after 4 days of incubation	po 6 dniach inkubacji after 6 days of incubation	po 4 dniach inkubacji after 4 days of incubation	po 6 dniach inkubacji after 6 days of incubation
<i>Abies alba</i>	5,0 b	7,5 b	7,2 b	11,0 bc
<i>Fagus sylvatica</i>	0 a	0 a	5,0 a	10,3 b
<i>Fraxinus excelsior</i>	7,8 c	10,9 c	6,2 ab	8,5 a
<i>Rhododendron</i> sp.	6,0 b	8,3 b	5,8 a	9,6 ab

Uwaga: Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5% wg testu Duncana)

Notes: Means in columns, marked with the same letter, are not differ significantly (5% according to Duncan test)

Tabela 3. Kolonizacja liści i łodyg przez *Phytophthora citricola*, izolat z jesionu (inokulacja: 2003.08.12)

Table 3. Colonisation of leaves and stems by *Phytophthora citricola* isolate from ash (inoculation: 2003.08.12)

Gatunki roślin Plant species	Liście Leaves		Części łodyg Parts of stems	
	Długość nekrozy (mm) Necrosis length (mm)			
	po 2 dniach od inokulacji after 2 days from inoculation	po 4 dniach od inokulacji after 4 days from inoculation	po 2 dniach od inokulacji after 2 days from inoculation	po 4 dniach od inokulacji after 4 days from inoculation
<i>Betula pendula</i>	8,4 c	20,7 c	7,5 c	16,3 b
<i>Fagus sylvatica</i>	0 a	0 a	4,8 b	23,8 c
<i>Fraxinus excelsior</i>	4,8 b	9,0 b	0 a	5,8 a

Uwaga: patrz tab. 2 Notes: see table 2

Tabela 4. Rozwój nekrozy na siewkach jesionu wyniosłego, zainokulowanego przez *Phytophthora citricola* (doświadczenie szklarniowe, inokulacja: 2003.07.08)

Table 4. Spread of necrosis on ash (*Fraxinus excelsior*) seedlings inoculated by *Phytophthora citricola*; (greenhouse trial, inoculation: 2003.07.08)

Źródło izolatów Sources of isolates	Długość nekrozy (mm) Necrosis length (mm)	
	po 15 dniach od inokulacji after 15 days from inoculation	po 28 dniach od inokulacji after 28 days from inoculation
<i>Abies alba</i>	5,3 a	16,6 ab
<i>Fagus sylvatica</i>	6,5 a	14,0 a
<i>Fraxinus excelsior</i>	8,9 b	17,5 b
<i>Rhododendron</i> sp.	9,6 b	21,3 c

Uwaga: patrz tab. 2 Notes: see table 2

roślin żywicielskich (tab. 4). W przypadku, gdy do inokulacji użyto izolatów z jesionu i różanecznika, nekroza rozwijała się istotnie szybciej niż na siewkach zakażonych pozostałymi kulturami. Po 28 dniach stwierdzono podobną tendencję. Po tym czasie badane izolaty kolonizowały tkanki jesionu z prędkością ok. 0,5–0,8 mm na dobę.

O sporadycznej izolacji *Phytophthora* sp. z porażonych korzeni trzyletnich siewek jesionu donosi Przybył (2002). Jest prawdopodobne, że izolacja *P. citricola* i być może innych gatunków z rodzaju *Phytophthora* z jesionu w okresie wegetacji jest trudna lub niemożliwa z powodu bardzo wysokiej koncentracji inhibitorów wzrostu w roślinach (Hemberg 1949), które być może hamują rozwój tej grupy patogenów. W niniejszych badaniach *P. citricola* wyizolowano z roślin pobranych do badań wiosną, na początku okresu wegetacji, gdy na siewkach nie było jeszcze liści, a więc aktywność substancji wzrostowych była niewielka. Jest możliwe, że bardzo ograniczona kolonizacja siewek jesionu w szklarni oraz liści i części łodyg w doświadczeniach *in vitro* przez 4 badane izolaty *P. citricola* związana była również z oddziaływaniem inhibitorów wzrostu na analizowany czynnik chorobotwórczy. Powstaje pytanie, jakie było potencjalne źródło *P. citricola* w szkółkach, gdzie stwierdzono występowanie tego patogena? W szkółce nr 1 gatunek ten stwierdzono w latach 2002–2003 na monokulturze buku, natomiast w drugiej, buk był jednym z uprawianych gatunków, ale nie stwierdzono na nim *P. citricola*. Jest prawdopodobne, że mimo płodozmianu, patogen może przetrwać w glebie i na resztkach roślin w formie oospor lub też może być przenoszony na narzędziach w czasie odchwasczania roślin. Wśród innych gatunków grzybów Worf i in. (1994) jako przyczynę zamierania liści i części pędów wymieniają *Verticillium dahliae*. Tego grzyba wyizolowano z porażonej podstawy pędu tylko w jednej ze szkółek (dane niepublik.), ale objawy zamierania wierzchołków lub bocznych pędów stwierdzano często na obserwowanych siewkach. Dodatkową przyczyną takich objawów mógł być gatunek *Gnomoniella fraxini* – sprawca antraknozy jesionu (Ash 2001).

4. PODSUMOWANIE

1. Wśród mikroorganizmów uzyskanych z zamaryłych korzeni i siewek jesionu często izolowano *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Phomopsis* sp., *Pythium ultimum* oraz gatunki z rodzaju *Trichoderma*.

2. Organizm grzybopodobny *Phytophthora citricola* stwierdzono na siewkach w 2 szkółkach i gatunek ten wyizolowano wiosną, przed ruszeniem wegetacji.

3. W doświadczeniach laboratoryjnych i szklarniowych izolaty *P. citricola* pozyskane z buka, jesionu, jodły i różanecznika kolonizowały zarówno liście, części jednorocznych łodyg, jak i siewki. Nekroza rozwijała się z prędkością 0,5–0,8 mm/dobę.

4. Niniejsza praca stanowi pierwsze doniesienie o występowaniu *P. citricola* na siewkach jesionu w Polsce i na świecie.

Praca została złożona 30.04.2004 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 16.06.2004 r.

OCCURRENCE OF *PHYTOPHTHORA CITRICOLA* ON ASH (*FRAXINUS EXCELSIOR*) IN FOREST NURSERIES

Summary

The objective of this paper was isolation of fungi and fungi-like organisms from dying seedlings of ash (*Fraxinus excelsior*) in forest nurseries and estimation of pathogenesis of potential disease agents. The survey of six forest nurseries showed, in two of it, occurrence of *Phytophthora citricola* on ash seedlings. In both nurseries the species mentioned above was recorded on 1/3 analyzed ash seedlings. Except this agent, nine other kinds and species were obtained among which *Pythium ultimum* was the most often isolated. There was *Phomopsis* sp. in one of nurseries reported, species caused canceration of sprouts. However the *in vitro* tests on one-year old ash stems did not show colonisation by *Phomopsis* sp. There were also representatives of *Trichoderma* spp. among obtained isolates, which is known as antagonistic species to many pathogens like *Phytophthora* spp. Pathogenesis tests made with different isolates of *P. citricola* on needles, leaves and parts of stems of fir, birch, beech, ash and rhododendron showed differentiation in rate of tissues colonisation. Necrosis developed faster on leaves after inoculation by *P. citricola* isolate received from ash. Ash leaves and stems colonisation by isolate from this plant was slower than on birch. In greenhouse trials, after 15 days from ash seedlings inoculation by *P. citricola* isolates from fir, beech, ash and rhododendron, development of basic stem necrosis was recorded, and the rot developed faster on ash seedlings after inoculation by ash and rhododendron isolates. The similar tendency after 28 days was recorded. After this time, isolates colonised tissues about 0,5-0,8 mm per twenty-four hours. Difficulties in isolation of *P. citricola* or other species of *Phytophthora* from ash, could be caused by high concentration of growth inhibitors in plants. In given surveys, *P. citricola* was isolated from seedlings taken at the beginning of vegetation, when leaves have not developed yet and the activity of auxo-substances has been low.

(transl. M. T.)

LITERATURA

- Ash C. L. 2001: Ash diseases. [W:] Diseases of woody ornamentals and trees in nurseries (R. K. Jones i D. M. Benson), APS Press, St. Paul, Minnesota: 72-76.
- Denis C., Webster J. 1971: Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 1. Production of volatile antibiotics. Trans. Brit. Mycol. Soc., 57: 363-369.
- Duda B., Orlikowski L. B., Szkuta G. 2004: Zasiadlanie siewek sosny przez *Phytophthora cinnamomi* w szkółkach leśnych. Postępy w Ochronie Roślin/Progress in Plant Protections (w druku).
- Hemberg T. 1949: Growth-inhibiting substances in terminal buds of *Fraxinus*. Physiol. Plant, Copenhagen, 2: 37-44.
- Novotel'nova N. S. 1974: Fitoflorovye griby. Vyd. Nauka, Leningrad, p. 86.
- Orlikowski L. B. 1995: Studies on the biological control of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. et Laff. II. Effectiveness of *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. in the control of *Phytophthora* foot rot of gerbera. J. Phytopathol., 143: 341-343.
- Orlikowski L. B., Duda B., Szkuta G. 2004: *Phytophthora citricola* on European beech and silver fir in Polish forest nurseries. J. Plant Prot. Res., 44, 1: 57-64.
- Przybył K. 2002: Fungi associated with decay in root systems of *Fraxinus excelsior* L. trees. Proc. of the 5th Int. Conference "Problems of forest phytopathology and mycology", Moskva, 2002.10.07-10: 192-195.
- Worf G. L., Spear R. N., Heimann M. F. 1994: *Verticillium*-induced scorch and chlorosis in ash. J. Environ. Hort., 12, 3: 124-130.
- Werres S. 1995: Influence of *Phytophthora* isolate and the seed source on the development of beech (*Fagus sylvatica*) seedling blight. Eur. J. For. Path., 25: 381-390.