

PHYTOPHTHORA SPP. V DUBOVÝCH MLAZINÁCH

PHYTOPHTHORA SPP. IN OAK THICKETS

JOLANA KYSELÁKOVÁ – MARIE BENEDÍKOVÁ

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., VS Kunovice

ABSTRACT

A survey of five experimental oak (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) provenance areas and sampling of their rhizospheres for *Phytophthora* spp. were done during the spring and autumn of 2008 and the spring of 2009. *Phytophthora* spp. were detected from the rhizosphere soil of forty-five areas. Based on morphological features five *Phytophthora* spp. were detected, i. e. *P. quercina* T. JUNG, *P. cactorum* (LEBERT and COHN) J. SCHRÖT, *P. citricola* SAWADA, *P. pseudosyringae* JUNG and DELATOUR, and *P. syringae* (BERK) KLEB. As well, the results showed that *Phytophthora* spp. are present on oak coppice as young as 20 - 25 years.

Klíčová slova: *Phytophthora* spp., *Quercus robur*, *Q. petraea*, provenienční plochy dubu, hodnocení symptomů, metody izolace *Phytophthora* spp.
Key words: *Phytophthora* spp., *Quercus robur* L., *Q. petraea* (MATT.) LIEBL., provenance areas of oaks, assessment of symptoms, methods of *Phytophthora* spp. isolation

ÚVOD

V několika posledních desetiletích došlo v lesích celé Evropy k nárůstu výskytu chřadnutí a odumírání dubových porostů. Jejich zkoumání přineslo poznatky o zvýšeném podílu patogenních plísňů druhů rodu *Phytophthora* v rhizosféře dubových lesů. Proto jsou často prováděny výzkumy zaměřené na *Phytophthora* spp. Většinou byly zkoumány a zjišťovány příznaky a působení těchto patogenů na stromy v dospělých porostech. Naše pokusné provenienční plochy jsou záměrně vybrány ve věku mlazin, tedy ve věku mezi 20 - 25 lety. Je zde tedy předpoklad, že by se ještě nemusely výrazně projevit symptomy výskytu patogenů *Phytophthora* spp., i když dojde k izolaci těchto patogenů.

Obecně je uznáváno, že málokdy jsou přímými původci odumírání dubových lesů pouze samotné druhy rodu *Phytophthora*. Existují významná pozorování, že patogeny, které způsobují zvýšené poškození náchylných rostlin stresem, jsou obvykle přítomné na jejich hostiteli ještě před stresem jako saprofyty nebo endofyty (DESPREZ-LOUSTEAU et al. 2006).

Ve většině případů hubí *Phytophthora* kořenové vlášení, které stromy v běžných podmínkách prostředí nahradí bez většího úbytku. V Evropě mohou druhy rodu *Phytophthora* přispívat opakovaným výskytem k chronické chorobě nazvané komplex chřadnutí dubů (oak decline complex). Chřadnutí dubů je však především spojeno se střídáním období neobvyklého sucha a zamokření, často propojených s invazí fytofágních druhů hmyzu a následnou defoliací. V takových stresujících podmínkách působením fytoftóry ubývá dodatečného zakořenění, což přispívá ke chřadnutí stromů (HANSEN 2008, JUNG et al. 2000).

Symptomy chřadnutí dubů jsou následující: zředování koruny způsobené nadměrným odumíráním a odpadávaním pupenů a větví v horní části koruny, drobné žlutavé listy někdy se zvýrazněnou

sytě zelenou žilnatinou, nahloučené v chomáčích na konci výhonů, omezená listová plocha, kmenové výstřelky, slizovitý výtok na kmelech; postupující nekrózy borky a kambia a omezení růstu (např. HARTMANN et al. 1989, HARTMANN, BLANK 1992, SCHLAG 1994, HARTMANN et al. 1995). Různé symptomy se nemusí vyskytovat současně a ve stejné intenzitě projevu. Postupně během chřadnutí odumírají části korun nebo celé stromy. Stejně symptomy mohou být pozorovány na jednotlivých stromech nebo skupinách stromů uvnitř porostů a vzácně na celých porostech. Pokud se stromy nemohou zotavit, pak během jednoho nebo několika málo let odumírají (SCHLAG 1994).

Výskyt chřadnutí je sledován u obou běžných druhů dubů, tj. dubu letního *Quercus robur* L. a dubu zimního *Quercus petraea* (MATT.) LIEBL. Ve Francii, Polsku a Německu je silněji napadán dub letní než dub zimní (OSZAKO 2000). To nepochybně souvisí s podmínkami, ve kterých se oba druhy dubů běžně vyskytují. Dub zimní totiž obvykle neroste na zaplavovaných či zamokřených lokalitách.

Výskyt kořenových hnilob způsobených *Phytophthora* spp. byl větší a počet lézí vyšší na rostlinách vystavených vodnímu stresu, suchu, nebo podmáčení vodou (MARÇAIS et al. 1993, 1996, MOREIRA et al. 2000, SÁNCHEZ et al. 2002, ROBIN et al. 2001, JUNG et al. 2003). Účinky sucha jsou pravděpodobně větší u infikovaných dospělých stromů, které mají v důsledku omezené vodní kapacity půdy podstatně zredukovaný kořenový systém. Podobně někteří autoři tvrdí, že pro rozvinutí choroby vyžaduje *Phytophthora* spp. neobvyklé kombinace vlivů životního prostředí na duby (HANSEN, DELATOUR 1999, BALCI, HALMSCHLAGER 2003).

Podle JUNGA et al. (2000) ubývá s věkem stromů hostitelská tolerance, mění se na citlivost a tím se zvyšuje náchylnost k patogenu. Takže v příznivých podmínkách pro druhy rodu *Phytophthora* převyšuje infekce kořenového vlášení nárůst vlášení nového. To vede k postupnému rozrušení celého kořenového systému a předurčuje je oslabené stromy k většímu napadení sekundárními patogeny

a k jejich poškození suchem. Výsledky izolačních testů potvrzují předpoklad, že citlivost kořenového vlášení se s věkem stromů zvyšuje, což je důsledek hromadění inokula fytoftóry. JUNG et al. (2000) dále uvádí, že ve sledovaném porostu bylo chřadnutí dubů napadených *P. quercina* omezeno na dospělé stromy. Po jejich vytěžení z porostu byly zbylé 25leté stromy zdravé a nebyla z nich izolována žádná *Phytophthora* spp. i když rostly ve stejně zamořeném prostředí.

Z uvedených citací vyplývá, že na námi zkoumaných vybraných provenienčních plochách (s porosty ve věku mezi 20 - 25 lety) by se neměla *Phytophthora* spp. na kořenovém vlášení vyskytovat. Cílem našeho výzkumu je ověřit, případně vyvrátit výskyt *Phytophthora* spp. v dubových mlazinách a sledovat rozdíly v napadení a projevu symptomů.

MATERIÁL A METODY

Zkoumané provenienční plochy byly založeny v letech 1984 až 1986 výsadbou sazenic vypěstovaných z osiva pocházejícího ze semenného roku 1982, z toho dvě jsou lokalizovány v Čechách (Plasy, Netolice) a tři na Moravě (Malenovice, Troubky, Tvrdonice). Celkem 46 proveniencí dubu letního a dubu zimního ze 16 lesních pěstebních oblastí bylo na plochy vysazeno ve čtyřech opakováních. V každém opakování roste jednotlivá provenience na parcele o ploše 7 x 7 m. Charakteristiku provenienčních ploch obsahuje tabulka 1.

V září r. 2008 proběhlo vizuální hodnocení symptomů spojených s výskytem druhů *Phytophthora* spp., které bylo prováděno u všech proveniencí na všech pokusných plochách. Vizuální hodnocení spočívá ve sledování viditelného výtoků exudátu na dolní části kmenů, výskytu drobných listů v horní části koruny, žlutavé barvy listů a nápadně zelené žilnatiny těchto listů. Uvedené symptomy byly hodnoceny na každé parcele a zaznamenána procenta jejich výskytu následujícím způsobem: 0 - bez příznaků, 5 - výskyt do 5 %, 10 - výskyt 6 až 10 %, 15 - výskyt 11 až 15 %, 20 - výskyt 16 až 20 %, atd.

První odběr vzorků rhizosféry byl proveden v květnu 2008 na provenienčních plochách Malenovice, Troubky, Netolice a Plasy. Provenienční plocha Tvrdonice byla v té době zaplavena a voda sahala do výše 1 metru, takže nebylo možno provést odběr ve stejném období. Na této ploše byly proto první vzorky odebírány téhož roku až v září současně s druhým odběrem na ostatních plochách. Třetí odběr vzorků proběhl v květnu r. 2009, pro opětovné dlouhodobé

zaplavení plochy Tvrdonice byly odebrány vzorky vody a bahna teprve v polovině července a to pouze na okraji porostu, kam bylo možno vstoupit s ohledem na rozbahnění. Protože *Phytophthora* spp. je na dubech převážně kořenovým patogenem, byly vzorky odebírány kolem stromů vykazujících symptomy chřadnutí. Zaměřili jsme se na okolí stromů s vytékajícím exudátem a jinými příznaky napadení *Phytophthora* spp. (žloutnoucí, řídkší a drobnější listy v koruně) nebo jinými nespécifickými příznaky chřadnutí jako prosvětlení koruny a prosýchání drobných výhonů a větviček v koruně. Vzorky půdní rhizosféry byly odebírány kolem chřadnoucích stromů ve vzdálenosti přibližně 1 m od jejich báze a to až do hloubky 30 cm. Jednalo se vždy o směsný vzorek půdy a živých kořinek odebraný z minimálně čtyř různých míst okolo vybraného stromu. U téměř odumřelých jedinců se prováděl odběr od nejbližšího dosud zdravého stromu pro získání živého kořenového vlášení.

První odběry vzorků rhizosféry na jaře roku 2008 byly orientační pro zjištění, zda se na pokusných plochách druhu *Phytophthora* spp. vyskytují. Proto byly z každého ze čtyř opakování na každé ploše odebírány průměrné vzorky, které byly získávány smícháním vzorků z pěti různých odběrových míst v daném opakování. Při dalších odběrech byl každý vzorek opatřen číslem provenience a číslem opakování a v laboratoři zpracováván zvlášť. Pro následnou izolaci bylo použito přibližně 10 g průměrného vzorku, zbytek byl uložen v chladničce při teplotě 4 °C v plastovém sáčku z důvodu udržení potřebné vlhkosti. V případě nezdařené či nezjištěné izolace druhů *Phytophthora* spp. bylo možné provést opakovanou izolaci pro potvrzení výsledku. Vzorky rhizosféry byly uchovány do doby dalších odběrů.

K izolaci druhů *Phytophthora* spp. byla použita metoda přímé izolace z napadených pletiv a metoda izolace přes nástrahová pletiva. V případě přímé izolace se kořinky z odběrového vzorku dobře propláchnou pod tekoucí vodou, sterilizují vložením na 0,5 – 1 min. do 70% etanolu, poté opláchnou v destilované vodě, osuší a přímo vloží na základní agarovou půdu. Po objevení mycelia je třeba jeho špičky ihned přenést na základní agarovou půdu obsahující antibiotika (PARPNH agar podle JUNG 1996). Po 1 - 3 dnech je nutné odebrat konce vytvořeného mycelia a přeočkovat na V8 juice agar (V8A) k vyvolání tvorby sexuálních orgánů (oogonia, oospóry, anteridia). Na V8A roste kultura nejméně 14 dní, ale většinou déle, než se vytvoří první sexuální orgány. Poté je třeba odebrat část kultury s agarom o velikosti cca 1 x 1 cm a vložit do Petriho misky s destilovanou

Tab. 1.

Charakteristika provenienčních ploch
Characterization of provenance areas

Proven. plocha/ Provenance area	Počet proveniencí/ Number of provenances		Prům. pH (H ₂ O)	PLO/ Natural forest zone	Nadm. výška/ Elevation (m n. m.)	SLT/ Group of forest type
	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>				
Malenovice	24	16	4,5	38	310	3H2 <i>Querceto-Fagetum</i>
Netolice	22	14	4,9	15	410	3O5 <i>Querceto-Abietum</i>
Plasy	21	14	4,1	6	430	2K3 <i>Fagetum-quercium</i>
Troubky	28	14	5,4	34	200	1L2 <i>Ulmeto-Fraxinetum</i>
Tvrdonice	23	13	5,4	35	155	1L9 <i>Ulmeto-Fraxinetum</i>

vodou nebo sterilizovaným půdním výluhem desetkrát zředěným. Miska se vloží nejméně na 1 hodinu do chladničky, kde by se měla při teplotě 4 °C na kultuře začít vytvářet sporangia nutná k morfologickému určení druhu. Půdní výluh vytvoříme sterilizací v autoklávu 200 - 300 g půdy v 1 litru vody a přefiltrováním usazeného roztoku.

Nástrahový způsob izolace (JUNG et al. 1996, JÖNSSON 2004, THEMANN, WERRES 2008) se provádí ponořením omytých sterilních kořínků do misky s destilovanou vodou s mladými sterilními lístky dubu plovoucími na hladině, které slouží jako nástraha. Misky jsou ponechány při pokojové teplotě 3 dny až týden, dokud se na listech nevytvoří léze naznačující napadení patogenem. Z nich se odebrá část obsahující rozhraní mezi zdravým a odumřelým pletivem. Po následné sterilizaci (voda, etanol, destilovaná voda) a osušení se kousky listů s rozhraním zdravého a napadeného pletiva vloží do základního agarů obsahujícího antibiotika (PARPNH agar podle JUNGA 1996). Dále je pokračováno přenesením části kultury na V8A a do vodního půdního výluhu obdobně, jak je uvedeno výše u metody přímé izolace.

Jiný způsob nástrahy je možný vložením omytých a etanolem sterilizovaných kořínků do zářezu nezralého jablka, zářez byl uzavřen utažením parafilmem a ve tmě byla jablka inkubována při pokojové teplotě. Po vytvoření nekrotických pletiv byl stejně jako u dubového listu odebrán kousek z rozhraní zdravého a nekrotického pletiva a vložen na základní agar. Dále bylo postupováno

stejně jako u jiného typu nástrahy. Tento způsob uvádí ve své práci např. JÖNSSON (2004).

Určování druhů probíhalo podle dostupných morfologických klíčů a popisů druhů (WATERHOUSE 1963, DRENTH, SENDALL 2001, JUNG 2003, BUSH et al. 2006, GALLEGLY, HONG 2008). Za tímto účelem byla měřena a hodnocena oogonia, oospóry a anteridia získaná na V8A a sporangia vytvořená v 10krát zředěném půdním výluhu. Každá úspěšná kultura byla po převedení do zředěného půdního výluhu reizolována pomocí nástrahy dubového listu. Po objevení nekrózy bylo opět přeneseno rozhraní zdravého a napadeného pletiva na základní agar a postup izolace se opakoval způsobem, jak je uvedeno výše.

Statistické zpracování shromážděných dat nebylo prováděno, protože charakter dosud získávaných údajů to neumožňoval.

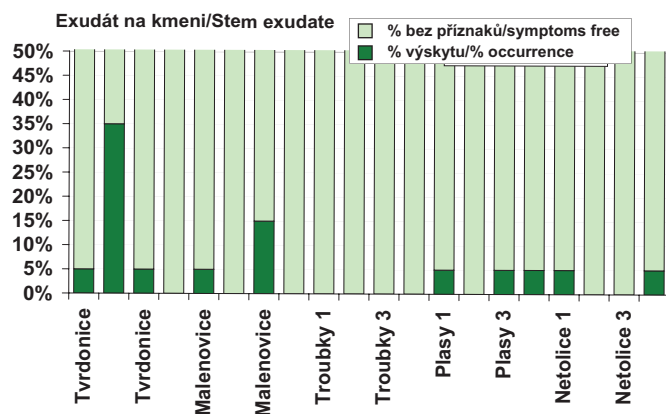
VÝSLEDKY A DISKUSE

Výskyt symptomů napadení patogenem *Phytophthora* spp. byl poměrně malý, většinou nepřesahoval 5 % na parcelu. V mnoha případech byly zjištěny příznaky velmi podobné symptomům způsobovaným zvýšeným výskytem podkorního hmyzu nebo poškození stromů jinými druhy patogenů a vzájemně se zastíraly. Příznaky podobné poškození stromů infekcí *Phytophthora* spp. v porostech

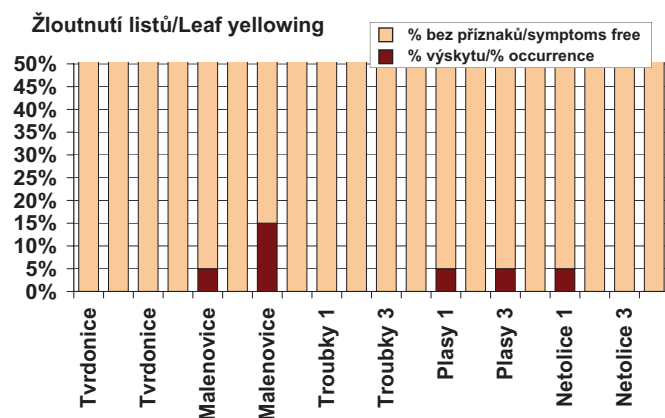
Tab. 2.

Shrnutí výsledků hodnocení symptomů infekce *Phytophthora*
Summarization of *Phytophthora* infection symptoms

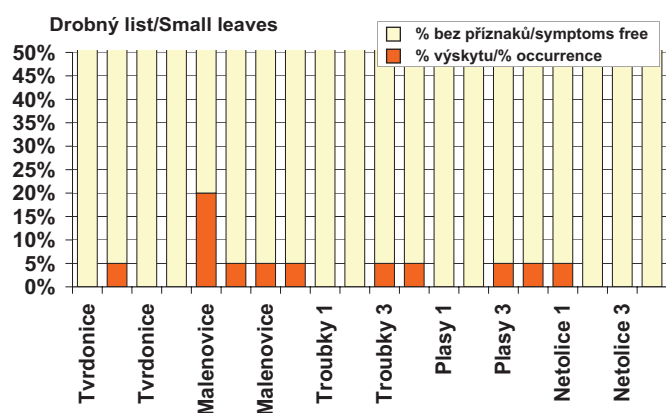
Provenienční plocha/ Provenance area	Počet hodn. parcel/ Surveyed plots	Intenzita výskytu/ Frequency of occurrence	Počet parcel s příznaky/Size plots with symptoms			
			exudát/ exudate	žlutý list/ yellow leaf	drobný list/ small leaf	výrazná žilnatina/ marked nervation
Malenovice	160	do 5 %	70	53	76	42
		6 – 10 %	2	11	23	12
		11 – 20 %	4	5	4	15
		více než 20 %	-	1	-	5
Netolice	127	do 5 %	40	29	52	48
		6 – 10 %	11	4	8	12
		11 – 20 %	4	1	5	10
		více než 20 %	-	2	1	3
Plasy	135	do 5 %	63	41	36	41
		6 – 10 %	18	14	9	16
		11 – 20 %	18	19	1	19
		více než 20 %	15	6	1	7
Troubky	164	do 5 %	3	8	31	10
		6 – 10 %	-	2	5	2
		11 – 20 %	-	1	-	1
		více než 20 %	1	1	-	1
Tvrdonice	144	do 5 %	62	12	10	14
		6 – 10 %	11	1	-	1
		11 – 20 %	6	1	-	1
		více než 20 %	2	-	-	-



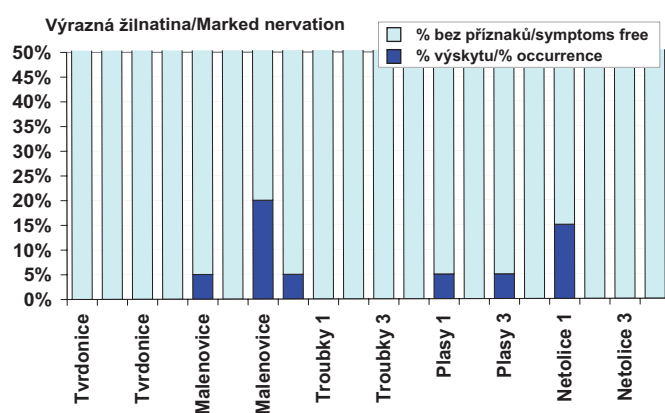
Graf 1.



Graf 2.



Graf 3.



Graf 4.

Graf 1 - 4.

Výsledky hodnocení sledovaných symptomů v procentech u stejné provenience na všech plochách
Assessment survey of some provenance symptoms on all research areas in percentage

na všech plochách tvořily lokálně ohniska kolem již odumřelých stromů. Tabulka 2 uvádí počty parcel na jednotlivých plochách s výskytem příznaků podobných projevu *Phytophthora* spp. Lépe hodnotitelné byly tyto příznaky na konci sezony, kdy byl jejich projev jasnější a spolehlivěji rozpoznatelný.

Na části plochy Malenovice se objevují podobné symptomy, ale bez exudátu, které připomínají napadení *Ophiostoma* spp. (stanovení patogena nebylo provedeno). Na ploše Plasy, která se při vizuálním hodnocení jevila jako nejvíce postižená, byly sledované příznaky poškození korun stromů ovlivněny výskytem fytofágního hmyzu (např. píďalka podzimní, bekyně velkohlavá, obaleč dubový). Omezený projev symptomů *Phytophthora* spp. na ploše Troubky mohl být způsoben značným rozšířením hub rodu *Armillaria* (václavka). Hodnocení plochy Tvrdonice bylo ovlivněno následkem dlouhodobého zaplavení (v letech 2008 i 2009 byla plocha zaplavena v období od března do července).

Pro velké množství hodnocených parcel zde není možné uvádět podrobné výsledky. Projev příznaků napadení byl na jednotlivých plochách u jednotlivých proveniencí rozdílný, stejně jako v různých

opakováních na jedné pokusné ploše. Pro ilustraci je zařazeno grafické zpracování výskytu sledovaných symptomů jedné provenience dubu letního (z LS Vodňany, PLO 10) na všech plochách (grafy 1 - 4).

Sledované příznaky, jako drobné a žlutavé listy, jsou často překrývány podobnými příznaky způsobenými jinými mikroorganismy a hmyzem, což je v hustém porostu mlaziny hůře rozeznatelné. Z výsledků vizuálního hodnocení se nedá usuzovat ani na případný výskyt náchylných či tolerantních jedinců. Také z důvodu nestejně zamořených ploch není vypovídací hodnota projevu těchto symptomů dostatečná. Z toho vyplývá, že vizuální příznaky jsou pouze orientační a vždy musí nutně následovat potvrzení výskytu *Phytophthora* spp. izolací patogenů z porostu.

Někdy byly sledované symptomy pozorovány na více sousedních parcelách. Na malé ploše se pravděpodobně zdravé i chřadnoucí stromy dělí víceméně o tutéž rhizosféru, je tedy možné očekávat podobné populace *Phytophthora* spp. (JUNG, BLASCHKE, OSSWALD 2000). Z toho důvodu bylo v takové mikrolokalitě vybráno vždy jedno odběrové místo s charakteristickými symptomy.

Obvyklé metody izolace patogena jsou založeny na morfolo- gických a kultivačních vlastnostech a tím vyžadují odbornou kva- lifikaci a specializaci. Tyto metody jsou časově velmi náročné na shromáždění výsledků a výsledky nejsou vždy přesvědčivé, zejména pak tehdy, když je třeba rozlišit poměrně blízké druhy organismů. Kromě toho nemusí být obvyklé metody ke zjiště- ní předsymptomatické infekce dosti citlivé. Všeobecně se uznává, že neúspěch detekce druhů *Phytophthora* nástrahovými metodami nemusí nezbytně znamenat jejich absenci (ERWIN, RIBEIRO 1996). Napadený materiál pro odběr vzorků by měl být ve stavu činné infekce, protože schopnost *Phytophthora* spp. soupeřit s jinými mik- roorganismy je omezená (ERWIN, RIBEIRO 1996, MARTIN et al. 2004, LILJA et al. 2006). Z předchozí citace vyplývá, že odběr vzorků musí pro daný účel probíhat v nevhodnějším období, což představují jarní a podzimní měsíce, kdy je aktivita patogena vyšší. Jenže i v průbě- hu vhodného období někdy nebývá jeho aktivita dostatečně silná. Obvyklá příčina izolačního neúspěchu je také suchý rok nebo příliš suchý vzorek (Kox et al. 2002, GARBELOTTO 2003).

V literatuře je popsáno mnoho způsobů izolace patogena z ode- braného materiálu (JUNG et al. 1996, JÖNSSON 2004, THEMANN, WERRES 2008). Přímá izolace, kdy se kořinky dobře sterilizují a přímo vloží na základní agarovou půdu, nese velké riziko kontaminace druhy rodu *Pythium* vyskytujícími se rovněž v rhizosféře, které na agaro- vé půdě druhy *Phytophthora* spp. předrůstají nebo na nich cizopasí. Z toho důvodu se nám lépe osvědčil takzvaný nástrahový způsob izolace. S úspěchem jsme využily oba způsoby nástrahové izolace, přičemž u nástrahy na listová pletiva se ukázaly vhodné také listy jahodníku (dobré pro izolaci např. *P. cactorum*) a magnolie.

Reizolací přes živá listová pletiva vytvořené sexuální a ase- xuální orgány prokázaly původně izolované druhy. Tento proces bylo možno stále opakovat. Navzdory údajům v literatuře se v našem případě nedařilo vytvoření oogonií okamžitě při prvním přene- sení na V8A, ale přibližně až po třetí reizolaci přes živá pleti- va listů a po opakovaném postupu kultivace. Zpočátku byl použí- ván MEA (malt extract agar) a PDA (potato dextrose agar) jako základní živná půda ke srovnání vzhledu kultur na různých kultivačních médiích. Později bylo pokračováno v kultivaci na PDA, která byla vyhovující. Při izolaci ze živých pletiv byla použita také metoda nástrahy na nezralá jablka. Výhodou to- hoto způsobu izolace je dobrá rozeznatelnost pletiva kontamino- vaného bakteriemi. Na rozdíl od suchého vzhledu pletiva napade-

ného *Phytophthora* spp. je pletivo napadené bakteriemi rozředlé a hnilobné.

Z výsledků izolací z prvních odběrů vzorků na jaře r. 2008 vyplynulo, že kromě pokusné plochy Plasy se u všech ostatních potvrdil výskyt *Phytophthora* spp., pozitivní výsledek byl získán v 10 případech. Při podzimním vzorkování r. 2008 bylo z pěti ploch odebráno celkem 47 vzorků. Pozitivní výskyt *Phytophthora* spp. byl zjištěn opět na všech plochách mimo pokusnou plochu Plasy, celkem v 16 případech. Na jaře 2009 bylo odebráno celkem 80 vzor- ků, výskyt patogena se potvrdil u 35 z nich, a to opět mimo pokus- nou plochu Plasy. Výsledky izolací na jednotlivých plochách jsou shrnuty v tabulce 3.

Vzhledem k poloze a charakteru lokality provenienční pokus- né plochy Plasy zde výskyt *Phytophthora* spp. nebyl očekáván a také izolační analýzy odebraných vzorků jemných kořinků tento předpoklad potvrdily. Jde o lokalitu s propustnou písčitou půdou se šterkovitým podložím. Naopak na lokalitách Netolice, Troubky a Tvrdonice se potvrdil očekávaný výskyt *Phytophthora* spp. Všech- ny tyto tři plochy mají vysokou hladinu spodní vody. Pokusná plocha Tvrdonice byla navíc v posledních čtyřech až pěti letech (podle sdělení pracovníků LZ Židlochovice) dlouhodobě zaplave- na. Voda zde zůstávala od jarního tání až do konce června. Půda byla i po většinu léta nasycená vodou, což jsou ideální podmínky pro šíření *Phytophthora* spp. Na ploše Malenovice se sice výskyt *Phytophthora* spp. prokázal, byl zde ale lokálně soustředěn pře- devším do terénní deprese uprostřed porostu. Tato plocha nemá typicky vysokou hladinu podzemní vody.

Konkrétní výskyt jednotlivých druhů na provenienčních plo- chách shrnuje tabulka 4.

Mimo uvedené pokusné provenienční plochy byly odebrány vzorky rhizosféry v dubových mlazinách se symptomy chřadnutí, na které nás upozornili pracovníci LS Bučovice (revír Bílý Vlč) a LS Buchovice (revír Kvasice). Provedenou izolací se prokázal výskyt *P. quercina* (vzorek z porostu Bílý Vlč) a *P. pseudosyringae* (Kvasice).

Výzkumy *Phytophthora* v dubových lesích v Evropě a přilehlých zemích přinesly poznatky o výskytu druhů *P. cinnamomi*, *P. cambivora*, *P. citricola*, *P. gonapodyides*, *P. megasperma*, *P. cactorum* a *P. cryp- togea*. Dodatečně bylo objeveno 5 nových druhů: *P. quercina*, *P. europaea*, *P. uliginosa*, *P. psychrophila* a *P. pseudosyringae*, očekává se popsání některých podobných druhů. Některé druhy

Tab. 3.
Výsledky izolací ze vzorků
Results of samples isolation

Provenienční plocha/ Provenance area	Jaro 2008/Spring 2008		Podzim 2008/Autumn 2008		Jaro 2009/Spring 2009	
	počet vzorků/ number of samples	pozitivní výskyt/ positive occurrence	počet vzorků/ number of samples	pozitivní výskyt/ positive occurrence	počet vzorků/ number of samples	pozitivní výskyt/ positive occurrence
Malenovice	4	3	10	5	28	11
Troubky	4	2	8	4	20	6
Tvrdonice	4	3	9	4	10	10
Netolice	4	2	11	3	13	8
Plasy	4	0	9	0	9	0
Celkem/Totally	20	10	47	16	80	35

Tab. 4.

Výskyt druhů *Phytophthora* spp. na provenienčních plochách
Occurrence of species of *Phytophthora* spp. on provenance areas

Provenienční plocha/ Provenance area	Pozitivní výsledky/ Positive results	Izolované druhy <i>Phytophthora</i> spp./ Isolation species of <i>Phytophthora</i> spp.
Malenovice	19	<i>Phytophthora citricola</i> , <i>P.°cactorum</i> , <i>P.°syringae</i>
Troubky	12	<i>P.°quercina</i> , <i>P.°citricola</i>
Tvrdonice	17	<i>P.°quercina</i> , <i>P.°cactorum</i> , <i>P.°citricola</i> ,
Netolice	13	<i>P.°syringae</i> , <i>P.°quercina</i>
Plasy	0	Izolace byla negativní/Negative isolation
Celkem	61	

se vyskytly v široké geografické oblasti, zatímco jiné byly izolovány ze zvláštních lokalit. Dva nejobvyklejší druhy byly *P. quercina*, následovaná *P. citricola* (BALCI 2004). Nám se prozatím podařilo izolovat 5 druhů *Phytophthora* spp. uvedených výše v tabulce 4. Ačkoliv jsou tyto druhy poměrně agresivními patogeny, jsou pouze sezonně aktivní a mohou být v hostitelských pletivech a v půdě rychle předrůstány jinými mikroorganismy. Z toho důvodu musí být nepřítomnost druhů *Phytophthora* v přirozených ekosystémech vykládána s opatrností, protože jejich populace může ve velmi krátké době kolísat od neznámé až k vysoké hustotě inokula (COOKE et al. 2007).

Přes všechny obtíže s izolací a kultivací druhů rodu *Phytophthora* náš průzkum prokázal, že tyto patogeny jsou schopny vyvolat některé typické symptomy v dubových porostech již ve věku mlazín (v našem případě 25 let), i když JUNG et al. (2000) tvrdí, že po vytěžení starého napadeného porostu byly duby ve věku 25 let zdravé a nebyla z nich izolována žádná *Phytophthora* spp., přestože rostly ve stejně zamořeném prostředí. Podle jejich výsledků bychom neměly z našich pokusných ploch *Phytophthora* spp. vůbec izolovat. Tento předpoklad se nepotvrdil. I když podle naší zkušenosti je možno tyto patogeny izolovat i z dubových mlazín, nemusí být hlavní příčinou chřadnutí a odumírání. V našich porostech byly druhy rodu *Phytophthora* spp. vždy doprovázeny dalšími stresory, jako jsou zaplavení porostu vodou a kolísání hladiny spodní vody, napadení listožravými a podkorními hmyzími škůdci a nakonec také vysokými letními teplotami, které následně způsobily stres ze sucha, jakož i větší hustotou porostů. Kombinace těchto faktorů se projevuje jako komplex chřadnutí dubů (oak decline complex), jak je popisován v celé Evropě.

ZÁVĚR

Naše výsledky prokázaly, že i ve věku mlazín kolem 25 let je již rhizosféra v porostu dubů infikována *Phytophthora* spp. Přesto se i na zamořené lokalitě někdy nezdařila izolace patogena ze zdánlivě infikovaných stromů. To jednak souviselo s podobnými symptomy výskytu jiných houbových chorob či napadení stromových jedinců hmyzem a na druhé straně je i sama izolace patogena závislá nejen na správném odebrání vzorků a jejich sterilizaci před vložením na základní izolační půdu či nástrahu, ale také na momentální aktivitě patogena, která je sezonně proměnná. V konečném důsledku záleží na správném přenesení mycelia na další médium pro vytvoření sexuálních orgánů a sporangii nutných k morfologickému určení patogenního druhu.

Poděkování:

Příspěvek byl zpracován s finanční podporou MZe v rámci výzkumného projektu č. QH82305. Zvláštní poděkování RNDr. Michalu Ondřejovi, CSc. (Agritec, Šumperk) za cenné rady a připomínky a ochotu při poskytování odborných konzultací v průběhu zpracování.



Foto 1.

Zaplavená provenienční plocha Tvrdonice v květnu 2009 (foto BENE-
DÍKOVÁ)

Flooded provenance area (locality) Tvrdonice in May 2009



Foto 3.; Foto 3 – detail.

Vytékající exudát na dolní části kmene dubu na ploše Tvrdonice
(foto BENE-
DÍKOVÁ)

An effluence of the exudate at lower part of stem – locality Tvrdonice



Foto 2.

Plocha Tvrdonice na podzim 2008 (foto BENE-
DÍKOVÁ)

Locality Tvrdonice in autumn 2008



Foto 4.
Sporangium *P. quercina* - papilární neopadavé sporangium, měřítko 20 μm (foto KYSELÁKOVÁ)
Papilate noncaducous sporangium



Foto 6.
Sporangium *P. cactorum* - papilární opadavé sporangium, měřítko 20 μm (foto KYSELÁKOVÁ)
Papilate caducous sporangium



Foto 5.
Oogonium *P. quercina* - oogonium se silnostěnnou oosporou, měřítko 20 μm (foto KYSELÁKOVÁ)
Oogonium with thickwalled oospore

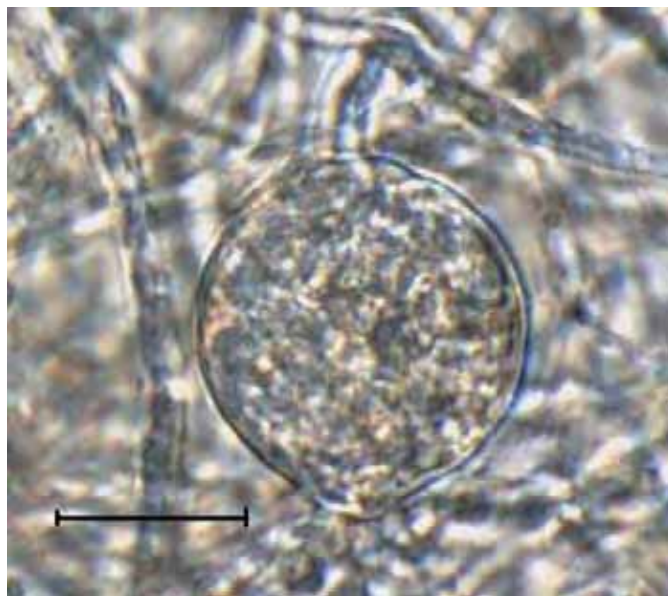
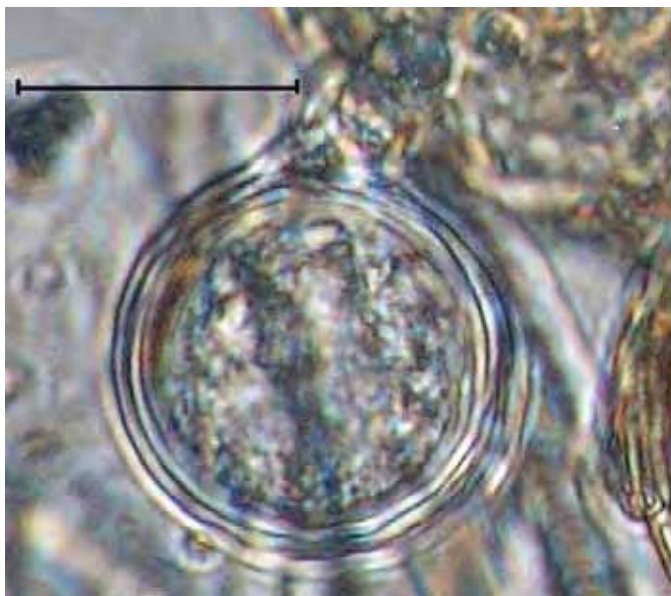


Foto 7.

Oogonium *P. cactorum* - oogonium s paragynným anterídiem uchyceným k oogoniální stopce, měřítko 20 μm (foto KYSELÁKOVÁ)
Oogonium with paragynous antheridium, affixed to the oogonial stalk

Foto 8.

Sporangium *P. citricola* - semipapilátní neopadavé sporangium, měřítko 20 μm (foto Kyseláková)
Semipapillate noncaducous sporangium



Foto 9.

Oogonium *P. citricola* - oogonium s deformovaným paragynným anterídiem uchyceným blízko oogoniální stopky, měřítko 20 μm (foto KYSELÁKOVÁ)
Oogonium with misshaped paragynous antheridium, affixed near the oogonial stalk

LITERATURA

- BALCI Y. 2004. *Phytophthora* diseases of oak in Europe. In: Proceedings, XV USDA Interagency Research Forum on Gypsy Moth and Other Invasive Species: 4-5.
- BALCI Y., HALMSCHLAGER E. 2003. *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. *Plant Pathology*, 52: 694-702.
- BUSH E. A., STROMBERG E. L., HONG CH., RICHARDSON P., KONG P. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia Nursery Irrigation Water. *Plant Health progress. Plant Management Network*. Published in 21 June 2006. 10.
- COOKE D. E. L., SCHENA L., CACCIOLA S. O. 2007. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology*: 89/1: 13-28.
- ERWIN D. C., RIBEIRO O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA, APS Press: 562.
- DESPREZ-LOUSTEAU M., MARÇAIS B., NAGELEISEN L.-M., PIOUS D., VANNINI A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Ann. For. Sci.*, 63: 597-612.
- DRENTH A., SENDALL B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. Brisbane, Australia, CRC for Tropical Plant Protection: 41 s.
- GALLEGLY M. E., HONG CH. 2008. *Phytophthora*, identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathological Society, St.: 158.
- GARBELOTTO M., DAVIDSON J. M., IVORS K., MALONEY P. E., HUBER-LI D., KOIKE S. T., RIZZO D. M. 2003. Nonoak native plants are main hosts for sudden oak death pathogen in California. *California Agriculture*, 57: 18-23.
- HANSEN E. M. 2008. Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal Env.Res.*, 13: 33-41.
- HANSEN E., DELATOUR C. 1999. *Phytophthora* species in oak forest of North-East France. *Ann. For. Sci.*, 56: 539-547.
- HANSEN E., DELATOUR C. 1999. *Phytophthora* in a French oak forest. In: IUFRO Working Party 4. 2. 09. Proceedings from the First International Meeting on *Phytophthoras* in Forest and Wildland Ecosystems, Grants Pass, Oregon USA. *Phytophthora Diseases of Forest Trees*: 116-117.
- HARTMANN G., BLANK R., LEWARK S. 1989. Eichensterben in Norddeutschland: Verbreitung, Schadbilder, mögliche Ursachen. *Forst und Holz*, 44: 475-487.
- HARTMANN G., BLANK R. 1992. Winterfrost, Kahlfrass und Prachtkäpferbefall als Faktoren im Ursachenkomplex des Eichensterbens in Norddeutschland. *Forst und Holz*, 47: 443-452.
- HARTMANN G. 1995. Wurzelhalsfaule der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) - Eine bisher unbekannte Pilzkrankheit durch *Phytophthora cambivora*. [Collar rot of common alder caused by *Phytophthora cambivora*.] *Forst und Holz*, 50: 555-557.
- JÖNSSON U. 2004. *Phytophthora* and oak decline – impact on seedlings and mature trees in forest soils. Academic dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Ecology, in Blå Hallen at the Department of Ecology, Ecology Building, Sölvegatan 37, Lund, by permission of the Faculty of Natural Sciences of the University of Lund.
- JUNG T. 2003. *Phytophthora quercina*. European and Mediterranean Plant Protection Organization Draft, Data Sheets on Quarantine Pests.
- JUNG T., BLASCHKE H., NEUMANN P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Path.*, 26: 253-272. ISSN 0300-1237.
- JUNG T., BLASCHKE H., OSSWALD W. 2000. Involvement of soil-borne *Phytophthora* species in central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology*, 49: 706-718.
- JUNG T., NECHWATAL J., COOKE D. E. L., HARTMANN G., BLASCHKE M., OBWALD W. F., DUNCAN J. M., DELATOUR C. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research*, 107: 772-789.
- KOX L., DE GRUYTER H., GARBELOTTO M., VAN BROUWERSHAVEN I., ADMIRAAL J., BAAYEN R. 2002. Validation of a PCR method for detection and identification of *Phytophthora ramorum*. Poster abstract. Sudden oak death science symposium, Monterey, California.
- LILJA A., KOKKOLA M., HANTULA J., PARIKKA P. 2006. *Phytophthora* spp. a new threat to tree seedlings and trees. *Aktuell fra Skogforskningen*, 1-06: 48-53.
- MARTIN F. N., TOOLEY P., BLOMQUIST C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology*, 94: 621-631.
- MARÇAIS B., DUPUIS F., DESPREZ-LOUSTEAU M. L. 1993. Influence of water stress on the susceptibility of red oak (*Quercus rubra* L.) to *Phytophthora cinnamomi* RANDB. *Eur. J. For. Path.*, 23: 295-305.
- MARÇAIS B., DUPUIS F., DESPREZ-LOUSTEAU M. L. 1996. Susceptibility of the *Quercus rubra* root system to *Phytophthora cinnamomi*; comparisons with chestnut and other oak species. *European Journal of Forest Pathology*, 26: 133-143.
- MOREIRA A. C., FERRAZ J. F. P., CLEGG J. 2000. The involvement of *Phytophthora cinnamomi* in cork and holm oak decline in Portugal. In: Hansen E. M., Sutton W. (eds.): First Int. Meeting on *Phytophthoras* in Forest and Wildland Ecosystems, Grand Pass, OR, USA, August 30 – September 3, 1999. s. 132-135.
- OSZAKO T. 2000. Oak declines in Europe's forest – history, causes and hypothesis. In: Oszako T., Delatour C. (eds.): Recent advances on oak health in Europe. Warsaw, Poland, Forest Research Institute: 11-40.
- ROBIN C., CAPRON G., DESPREZ-LOUSTEAU M. L. 2001. Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathology*, 50: 708-716.
- SANCHEZ M. E., CAETANO P., FERRAZ J., TRAPERO A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*, 32: 5-18.
- SCHLAG M. G. 1994. Das europäische 'Eichensterben' und seine Ursachen – von einem phytopathologischen Standpunkt aus gesehen. *Centralblatt für das gesamte Forstwesen*, 111: 243-266.
- THEMANN K., WERRES S. 2008. Guidelines for the handling of the *Rhododendron* leaf test to detect *Phytophthora* spp. in root, soil and water samples. Braunschweig, Julius Kühn Institut (JKI) - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau und Forst: 5 s.
- WATERHOUSE G. M., 1963. Key to the species of *Phytophthora* (DE BARY). *Mycol Papers*, 92: 1-22.

PHYTOPHTHORA SPP. IN OAK THICKETS

SUMMARY

The aim of our work was to determine presence of *Phytophthora* spp. on oak trees (*Quercus petraea*, *Quercus robur*). *Phytophthora* spp. is an important plant pathogen that can cause serious damage in forestry. Evaluation of symptoms was provided for two years. There were 25-year-old trees of five localities (Plasy, Netolice, Malenovice, Troubky, Tvrdonice) evaluated. For the identification of the mentioned pathogen exudate on the bottom parts of the trunk was observed, as well as occurrence of small and yellow leaves in upper part of crown, and marked nervation of leaves.

Overall, three sampling procedures were provided within the period from May 2008 to July 2009. Samples of soil rhizosphere were taken around declining tree at a distance approximately 1 m and at a depth of 30 cm. For detection of *Phytophthora* spp. methods like direct isolation from infected rootlets and baiting method of leaf tissues were used.

The 2008 results of experiments proved presence of *Phytophthora* spp. in all the localities except for the Plasy locality. *Phytophthora* spp. was observed in 26 cases of 67 samples whereas in the year 2009 in 35 cases of 80 samples. The presence of *Phytophthora* spp. in the year 2009 was proven in the some localities as in the year preceding. There were four species of *Phytophthora* spp. determined: *Phytophthora quercina* in the localities Troubky, Tvrdonice and Netolice, *P. citricola* in the localities Malenovice, Troubky and Tvrdonice, *P. syringae* in the localities Malenovice and Netolice and *P. cactorum* in the localities Malenovice and Tvrdonice.

According to the present research no *Phytophthora* spp. should be found in 25-year-old oak stand, however, our findings in these stands presence of *Phytophthora* spp. confirmed.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Jolana Kyseláková, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., VS Kunovice
Na Záhonech 601, 686 04 Kunovice, Česká republika
tel.: 572 420 916; e-mail: kyselakova@vulhmuh.cz