

Zamieranie olszy czarnej *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. wzdłuż rzeki Narewki na terenie Nadleśnictwa Białowieża

Decline of Black Alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. along the Narewka River in the Białowieża Forest District

Tadeusz Malewski¹ , Robert Topor², Justyna Anna Nowakowska³ , Tomasz Oszako^{4*} 

¹Muzeum i Instytut Zoologii, PAN, Zakład Technik Molekularnych i Biometrycznych, ul. Wilcza 64, 00-679 Warszawa;

²Politechnika Białostocka, Instytut Nauk Leśnych, ul. Wiejska 45, 15-351 Białystok; ³Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, ul. Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa; ⁴Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3; 05-090 Raszyn

*Tel. +48 22 7150 402 e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

Abstract. Black Alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. is an important tree commonly growing in Poland. Alders are actinorhizal plants that play an important ecological role in riparian ecosystems through atmospheric nitrogen fixation, filtration and purification of waterlogged soils as well as providing a refuge for terrestrial and aquatic organisms thus helping to stabilize stream banks. Black Alder used to be considered a very pest and disease resistant species but, the situation changed in 2000, when an unprecedented decline of Alders was observed in Poland. In the Białowieża Forest District, this decline has been observed on wet meadow habitats and along rivers or watercourses.

Currently, there are several hypotheses explaining Alder dieback, among them climatic changes and *Phytophthora* infections. In terms of climate, Black Alder requires a high atmospheric humidity during all phases of its reproductive cycle. It tolerates neither long-term summer flooding nor a significant decrease in the groundwater level. In terms of pests, oomycete pathogens of the genus *Phytophthora* are the most destructive plant pathogens known and many of them are present in forests and nurseries all over Europe.

The aim of this study was to evaluate the health of Black Alder along the Narewka River in the Białowieża Forest District. Selected areas were monitored in 2012 and 2018, but no relationship between drought and alder health was found. A preliminary analysis of soil and water samples by real time PCR revealed the presence of two *Phytophthora* species: *P. alni* and *P. cactorum*. Further and more detailed research is required to elucidate the role of these pathogens in Alder dieback.

Keywords: alder, dieback, drought, *Phytophthora*, PCR

Słowa kluczowe: olsza, zamieranie, susza, *Phytophthora*, PCR

1. Wstęp

Olsza czarna *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. występuje w Europie, na Syberii, w Azji Mniejszej i w północnej Afryce. W Polsce jest gatunkiem ważnym z ekologicznego i gospodarczego punktu widzenia. Należy ona do drzew szybko rosnących, jest więc cenna w kontekście produkcji drewna (Jaworski 2011). Olsza czarna jest jedynym drzewem lasotwórczym w Polsce, którego korzenie mogą tworzyć aktynoryzę z promieniowcami z rodzaju *Frankia*, ektomykoryzę z wielkoowocnikowymi grzybami i mykoryzę arbuskularną

z grzybami z rodzaju *Glomus*. Duże zdolności przystosowawcze olszy czarnej umożliwiają wykorzystywanie jej do rekultywacji i zalesień zniszczonych gleb i trudnych do zalesienia gruntów (Pancer-Kotejowa, Zarzycki 1980; Jaworski 2011).

Spośród rodzimych drzew gatunek ten najlepiej znosi dużą wilgotność gleby oraz dobrze rozwija się na terenach, gdzie obecne są wody przepływowe, chociaż może też występować na terenach z wodą stagnującą. Nie znosi zarówno długotrwałych podtopień letnich, jak i znacznego obniżenia poziomu wód gruntowych (Sierota 2001), na-

tomiast potrzebuje wysokiej wilgotności powietrza utrzymującej we wszystkich fazach cyklu reprodukcyjnego (Claessens et al. 2010). Jeszcze do niedawna olszę czarną uważano w Polsce za gatunek o niskim poziomie podatności na szkodniki i choroby. Sytuacja zmieniła się na przełomie XX i XXI wieku, gdy zaobserwowano zamieranie drzewostanów olszowych (Piętka, Grzywacz 2018). W tym wieloczynnikowym zjawisku istotne znaczenie odgrywają czynniki abiotyczne, między innymi występujące anomalie pogodowe. Zjawisko masowego zamierania olszy po raz pierwszy stwierdzono w Wielkiej Brytanii w 1995 roku (Gibbs 1995). W krótkim czasie rozprzestrzeniło się ono na całą Europę, dotykając także olszy szarej i sercowatej w Niemczech, Austrii, na Węgrzech oraz w Polsce i na Słowacji (Brasier et al 1995; Orlikowski et al. 2003; Jung, Blaschke 2004). Jednym ze szkodliwych czynników biotycznych są lęgniowce (Oomycetes), które powodują fytoftorozę w sztykach korzeniowych u podstawy pni zarówno w szkółkach, jak i w drzewostanach leśnych. Jako przyczynę choroby uznano jeden z gatunków *Phytophthora*. Gibbs (1995) opisał go jako takson podobny do *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman, który jest powszechnym patogenem drzew liściastych. Następnie Brasier i in. (1999) wykazali, że patogen ten jest hybrydą międzygatunkową. Późniejsze badania dowiodły, że to hybryda trzech gatunków: *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk, *Phytophthora multiformis* Brasier & S.A. Kirk i *Phytophthora uniformis* (Brasier & S.A. Kirk) Husson, Ioos & Aguayo. Ten ostatni jest gatunkiem diploidalnym, *Phytophthora multiformis* jest allotetraploidem, a *Phytophthora alni* – allotriploidem zawierającym połowę genomu każdego z jego rodziców *Phytophthora multiformis* i *Phytophthora uniformis* (Husson et al. 2015). Gatunki *Phytophthora alni* i *Phytophthora multiformis* są szeroko rozpowszechnione w Europie, ale nie zidentyfikowano ich na innych kontynentach, natomiast *Phytophthora uniformis* wyizolowano zarówno w Europie, jak i w Ameryce Północnej (Navarro et al. 2015). Dotychczas w Polsce wykrywano tylko patogen *Phytophthora alni* (Trzewik et al. 2008). Oprócz wyżej wymienionych gatunków w ryzosferze i na pniach olch stwierdzono również obecność innych gatunków *Phytophthora*: *P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt., *P. cambivora*, *P. cinnamomi* Rands, *P. plurivora* T. Jung and T.I. Burgess, *P. gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman, *P. megasperma* Drechsler, *P. pseudosyringae* T. Jung & Delatour, *P. syringae* (Berk.) Kleb. i *P. lacustris* Brasier, Cacciola, Nechwatal, Jung & Bakonyi (Trzewik et al. 2008). Źródłem zakażenia może być zarówno woda, jak i gleba z sadzonkami, także asymptomatycznymi, które nie wykazują jeszcze objawów chorobowych (Orlikowski et al. 2013).

Jako przyczynę osłabienia drzew często wskazywano długotrwałe susze, dlatego celem niniejszych badań była ocena stanu zdrowotnego olsz rosnących wzdłuż cieków wodnych na terenie Nadleśnictwa Białowieża. Hipoteza

robocza zakładała, że więcej drzew obumarło w dalszej odległości od źródła wody, co świadczyłoby, że przyczyną zamierania mógłby być niedostatek wody w glebie (susza).

2. Materiał i metody

W celu określenia przyczyn zjawiska zamierania olszy czarnej *Alnus glutinosa* na terenie Nadleśnictwa Białowieża przeprowadzono badania wzdłuż brzegów rzeki Narewka. Wybrano 3 stanowiska obserwacyjne w ekosystemach nadrzecznych z przewagą olszy, pochodzenia odroślowego w wieku około 30–40 lat:

1. drzewostan olszowy na siedlisku olsu (52°69'N; 23°88'E), Nadleśnictwo Białowieża, leśnictwo Stoczek, oddział 476A;
2. olsze rosnące nad rzeką Narewka (52°70' N; 23°84' E);
3. drzewostan olszowy na terenie zalewowym (52°72'N; 23°74' E), Nadleśnictwo Białowieża, leśnictwo Batorówka, oddział 394 Ab.

Do lustracji wybrano odcinki rzeki o długości 100 m (punkty 1 i 2) oraz drzewostan olszowy (punkt 3), który został okresowo podtopiony przez rozlewające się wody rzeki.

Podczas prac terenowych liczone drzewa zdrowe, chore i martwe oraz mierzono odległość badanych drzew od brzegu rzeki. Za drzewa chore uznawano te z ażurową koroną wskutek zamierania pędów i drobienia liści, które przybierały jaśniejszy kolor (jasnożółtozielony). Badania prowadzono w 2012 roku oraz od lipca do września 2018 roku. W 2018 roku w celu zbadania obecności *Phytophthora* z każdego stanowiska pobrano po próbce gleby spod trzech olsz wykazujących symptomy choroby, jako najbardziej prawdopodobnego miejsca występowania tego patogenu, do analizy metodą real time PCR. Próbkę gleby pobierano szpadlem w odległości około 1 m od pni drzew z głębokości 20 cm w dwóch miejscach (około 0,5 kg) i mieszano razem.

Analiza obecności *Phytophthora* spp.

DNA z próbek gleby (0,5 g) wydzielano zestawem NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) zgodnie z instrukcją producenta. Obecność gatunków z rodzaju *Phytophthora* w badanych próbkach określano za pomocą real time PCR. Jako kontrolę dodatnią stosowano DNA wydzielone z odpowiedniego gatunku *Phytophthora* rosnącego na płytce Petriego. Jako kontrolę ujemną do reakcji zamiast DNA dodawano odpowiednią ilość wody. Reakcje zachodziły w mieszaninie zawierającej 2 µl roztworu DNA, 10 µl 2 × LuminoCt Master Mix (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2 µl F i R starterów (5 µM) i 0,2 µl sondy TaqMan (5 µM). Sekwencje sond i starterów stosowanych w analizie podano w tabeli 1. Profil termiczny reakcji: 3 min denaturacja wstępna w 95°C; następnie 40 cykli amplifikacji: denaturacja w 95°C, 30 s; przyłączanie starterów w 55°C, 30 s; synteza

w 72°C, 30 s (Nowakowska et al. 2016). Do identyfikacji *P. multiformis* (poprzednia nazwa *P. alni* subsp. *multiformis*) stosowano sondy i startery (Nowakowska et al. 2016), a do *P. cactorum* i *P. plurivora* sondy i startery opisane w publikacji (Nowakowska et al. 2017). Startery i sonda do identyfikacji *P. alni* zostały zaprojektowane w programie AlleleID (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) wg standardowych wytycznych dla sond typu TaqMan (Dorak 2006). Startery i sondę do detekcji *P. alni* zaprojektowano w oparciu o sekwencję ITS (JF300250.1) dostępną w banku genów NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sondy znakowano za pomocą fluorescencyjnego barwnika JOE na końcu 5' sondy oraz wyciszacza HBQ1 na końcu 3' (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Real time PCR przeprowadzono w aparacie RotorGene 6000 (Qiagen, Germany).

Do obliczeń statystycznych stosowano program Microsoft Excel 2019.

3. Wyniki

W obu inwentaryzacjach z 2012 i 2018 roku stwierdzono podobną liczbę drzew martwych (2012 – 11,4%; 2018 – 11,0%), natomiast w 2018 roku było 2,2 razy więcej drzew zdrowych (2012 – 27,8%; 2018 – 61,0%) (tab. 2). Zwiększeniu liczby drzew zdrowych towarzyszyło ponaddwukrotne zmniejszenie średniej odległości od wody z 23,3 m do 9,6 m. W przypadku drzew chorych i martwych średnia odległość od źródła wody nie zmieniła się. Drzewa rosnące 20 m od wody nie wykazywały żadnych objawów chorobowych, podczas gdy drzewa rosnące tuż przy brzegu były zazwyczaj martwe (tab. 2).

Tabela 1. Sekwencje starterów i sond stosowanych do identyfikacji *Phytophthora* w analizowanych próbkach

Table 1. Sequence of primers and probes used to identify *Phytophthora* in the analyzed samples

Gatunek Species	Starter F (5'–3') Primer F (5'–3')	Starter R (5'–3') Primer R (5'–3')	Sonda (5'–3') Probe F (5'–3')	Literatura References
<i>P. alni</i>	ctgtcgtatgcaagttg	atgggtttaaagataagg	accctaacgctcgccat	w tym badaniu in this study
<i>P. multiformis</i>	ccgtatcaaccacttag	cacagatgttcagtattcaa	cggcctggctgctgatatca	Nowakowska et al. 2016
<i>P. cactorum</i>	acgtgaaccgtttcaaac	cagccgccaacaataaag	cagccgccaccagacaagac	Nowakowska et al. 2017
<i>P. plurivora</i>	ccgtatcaacccttttag	gcagtataatcagtattgtaga	ccccgcagtataatcagtattgtagaa	Nowakowska et al. 2017

Tabela 2. Liczba zdrowych, chorych i martwych drzew w zależności od odległości do koryta rzeki Narewka

Table 2. Number of healthy, sick and dead trees depending on the distance to the bank of the Narewka River

Drzewa Trees	Średnia odległość od koryta rzeki [m] ± SEM w 2012 r. Mean distance from the bank of river [m] ± SEM in 2012	Liczba drzew Number of trees	Średnia odległość od koryta rzeki [m] ± SEM w 2018 r. Mean distance from the bank of river [m] ± SEM in 2018	Liczba drzew Number of trees
Drzewa zdrowe Healthy trees	23,3 ± 7,22	22	9,6 ± 3,38	50
Drzewa chore Sick trees	9,3 ± 4,58	48	9,3 ± 4,06	23
Drzewa martwe Dead trees	3,4 ± 1,60	9	3,4 ± 2,67	9
Razem Total		79		82

Drzewa zdrowe 2012–2018, $p < 0,01$ / Healthy trees 2012–2018, $p < 0,01$

Drzewa zdrowe – chore 2012, $p < 0,01$ / Healthy trees – sick trees 2012, $p < 0,01$

Drzewa chore – martwe 2012, $p < 0,05$ / Sick trees – dead trees 2012, $p < 0,05$

Drzewa chore – martwe 2018, $p < 0,01$ / Sick trees – dead trees 2018, $p < 0,01$

Real time PCR pozwala wykryć obecność *Phytophthora* w próbkach gleby. Wynik reakcji jest wyrażany jako wartość cyklu progowego C_t (threshold cycle), oznaczająca numer cyklu PCR, w którym aparat wykrył emisję fluorescencji sondy w badanej próbce. Im niższa wartość C_t , tym większa ilość patogenu. Wartość C_t powyżej 40 świadczyła o braku obecności DNA badanego gatunku w próbce. Analiza wykazała obecność w glebie dwóch patogenów: *P. alni* ($C_t=35,57$) na stanowisku 2 i *P. cactorum* ($C_t=36,77$) na stanowisku 3 (tab. 3). Analiza nie wykazała obecności *P. multiformis* i *P. plurivora* w badanych próbkach gleby.

4. Dyskusja

Początkowo sądzono, że zamieranie olsz może być spowodowane suszą (Oszako 2005), jednak obecne badania wykazały, że najwięcej drzew martwych jest nad brzegiem rzeki (tab. 2). Długa susza, występująca w Białowieży w 2015 roku (Nowakowska et al. 2020), mogła być przyczyną tego, że w 2018 r. zdrowe drzewa zlokalizowane były bliżej rzeki niż w 2012 r. W południowo-wschodniej Pol-

sce stwierdzono występowanie dziesięciu gatunków *Phytophthora*, w tym również *P. alni* i *P. cactorum* na pniach i w ryzosferze olszy (Trzewik et al. 2015). Występowanie *P. cactorum* odnotowano nad Zalewem Siemianówka położonym na terenie dwóch państw – Białorusi i Polski (Malewski et al. 2019). W olsach Białorusi stwierdzono występowanie *P. alni* (Zviagintsev et al. 2015). Narewka wypływa z uroczyska Dziki Nikor i Kuty na terytorium Białorusi na wysokości 159 m n.p.m. i wpływa do Narwi na wysokości 137 m n.p.m. (Górniak 2006). Zatem *Phytophthora* może przenosić się z jej wodami (Cahill et al. 2008), a różnica poziomów zapewnia zarodnikom płytkowym możliwość przemieszczania się wraz z prądem i infekowanie napotkanych drzew. Występowanie *P. cactorum* zaobserwowano również na odcinku polsko-ukraińskim w rejonie Włodzimierza Wołyńskiego, Jarosławia i Medyki (Matsiakh et al. 2016).

Phytophthora może być przenoszona nie tylko przez wodę, ale i przez ptaki. Szczególnie często *P. cactorum* przenoszą: czyż *Carduelis spinus*, dzwonec zwyczajny *Chloris chloris* L. i modraszka *Parus caeruleus* L. (Ma-

Tabela 3. Analiza obecności *Phytophthora* w próbkach gleby
Table 3. Analysis of the presence of *Phytophthora* in soil samples

Stanowisko Place	Próbka Sample	Wartość C_t C_t value			
		<i>P. alni</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. multiformis</i>	<i>P. plurivora</i>
Stanowisko 1 Place 1	Próbka 1 Sample 1	>40	>40	>40	>40
	Próbka 2 Sample 2	>40	>40	>40	>40
	Próbka 3 Sample 3	>40	>40	>40	>40
Stanowisko 2 Place 2	Próbka 1 Sample 1	>40	>40	>40	>40
	Próbka 2 Sample 2	>40	36,77	>40	>40
	Próbka 3 Sample 3	>40	>40	>40	>40
Stanowisko 3 Place 3	Próbka 1 Sample 1	35,57	>40	>40	>40
	Próbka 2 Sample 2	>40	>40	>40	>40
	Próbka 3 Sample 3	>40	>40	>40	>40

lewski et al. 2019). Biorąc pod uwagę występowanie *Phytophthora* nad Zalewem Siemianówka i wzdłuż polsko-ukraińskiej granicy, można oczekiwać, że występuje ona również w naturalnych zbiorowiskach leśnych Puszczy Białowieskiej. Stwierdzenie obecności *Phytophthora* w próbkach gleby pobranych spod chorych olsz sugeruje, że może ona być przyczyną ich zamierania w Nadleśnictwie Białowieża.

5. Wnioski

Największa liczba chorych i martwych olsz występuje najbliżej brzegu rzeki Narewka, co upoważnia do odrzucenia założonej hipotezy o niedostatku wody w glebie jako przyczynie ich zamierania.

W próbach gleby pobranych z terenu Nadleśnictwa Białowieża stwierdzono (metodą real time PCR) obecność dwóch patogenów: *P. alni* i *P. cactorum*.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

Źródło finansowania badań

W pracy wykorzystano wyniki badań Instytutu Badawczego Leśnictwa finansowanych ze środków Lasów Państwowych.

Literatura

- Cahill D.M., Rookes J.E., Wilson B.A., Gibson L., McDougall K.L. 2008. *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. *Australian Journal of Botany* 56: 279–310. DOI 10.1071/BT07159.
- Claessens H., Oosterbaan A., Savill P., Rondeux J. 2010. A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry* 83(2): 163–175. DOI 10.1093/forestry/cpp038.
- Brasier C.M., Rose J., Gibbs J.N. 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Great Britain. *Plant Pathology* 44: 999–1007. DOI 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02658.x.
- Brasier C.M., Cooke D.E.L., Duncan J.M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96(10): 5878–5883. DOI 10.1073/pnas.96.10.5878.
- Dorak M.T. 2006. Real time PCR (Advanced Methods Series). Taylor and Francis, Oxford, UK, 333 s. ISBN 041537734X.
- Gibbs J. 1995. *Phytophthora* root disease of alder in Britain. *EPPO Bulletin* 25: 661–664. DOI 10.1111/j.1365-2338.1995.tb01118.x.
- Górniak A. (red.) 2006. Ekosystem zbiornika Siemianówka w latach 1990–2004 i jego rekultywacja. Białystok, Zakład Hydrobiologii Uniwersytetu w Białymstoku, 235 s. ISBN 8374310936.
- Husson C., Aguayo J., Revellin C., Frey P., Ioos R., Marçais B. 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genetics and Biology* 77: 12–21. DOI 10.1016/j.fgb.2015.02.013.
- Jaworski A. 2011. Hodowla lasu. Tom 3. Charakterystyka hodowlana drzew i krzewów leśnych. Warszawa, PWRiL, 640 s. ISBN 978-83-09-01117-0.
- Jung T., Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197–208. DOI 10.1111/j.0032-0862.2004.00957.x.
- Malewski T., Brzezinska B., Lassaad B., Oszako T. 2019. Role of avian vectors in the spread of *Phytophthora* species in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 155(4): 1363–1366. DOI 10.1007/s10658-019-01840-w.
- Matsiakh I., Oszako T., Kramarets V., Nowakowska J.A. 2016. *Phytophthora* and *Pythium* species detected in rivers of the Polish-Ukrainian border areas. *Baltic Forestry* 22(2): 230–238.
- Navarro S., Sims L., Hansen E.M. 2015. Pathogenicity to alder of *Phytophthora* species from riparian ecosystems in western Oregon. *Forest Pathology* 45: 358–366. DOI 10.1111/efp.12175.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba A., Borys M., Oszako T. 2016. Molekularna diagnostyka wybranych patogenów z rodzaju *Phytophthora* w szkółkach dębu szypułkowego i buka zwyczajnego w ramach integrowanej ochrony roślin. *Sylwan* 160(5): 365–370. DOI 10.26202/sylwan.2015070.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba T., Borys M., Kubiak K., Tkaczyk M., Oszako T. 2017. Rapid diagnosis of pathogenic *Phytophthora* species in soil by real time PCR. *Forest Pathology* 47(2): e12303. DOI 10.1111/efp.12303.
- Nowakowska J.A., Hsiang T., Patynek P., Stereńczak K., Olejarski I., Oszako T. 2020. Health assessment and genetic structure of monumental Norway Spruce trees during a bark beetle (*Ips typographus* L.) outbreak in the Białowieża Forest District, Poland. *Forests* 11(6): 647. DOI 10.3390/f11060647.
- Orlikowski L.B., Oszako T., Szkuta G. 2003. Alder *Phytophthora* in Poland: occurrence and plants colonization. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 68(4 Pt B): 705–709.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2013. Woda jako źródło zagrożenia roślin w środowisku przez *Phytophthora* spp. *Polish Journal of Agronomy* 15: 8–13.
- Oszako T. 2005. Alder decline in Poland, in: Diseases and insects in forest nurseries. The sixth meeting of the IuFRo Working Party 7.03.04, 129–137.
- Sierota Z. 2001. Choroby lasu. Warszawa, CILP, 99 s. ISBN 83-88478-18-4.
- Trzewik A., Orlikowska T., Oszako T. 2008. Zagrożenie olszy czarnej przez *Phytophthora alni* w Polsce. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 529: 227–233.
- Trzewik A., Orlikowski L., Oszako T., Nowakowska J.A., Orlikowska T. 2015. The characterization of *Phytophthora* isolates obtained from diseased *Alnus glutinosa* in Poland. *Baltic Forestry* 21(1): 44–50.
- Pancer-Kotejowa E., Zarzycki K. 1980. Zarys ekologii, w: Białobok S. (red.). Olsze *Alnus* Mill. PWN, Warszawa – Poznań, 229–257.
- Piętka J., Grzywacz A. 2018. Grzyby wielkoowocnikowe stwierdzone na olszy czarnej *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. w drzewostanach olszowych wykazujących objawy zamierania. *Sylwan* 162(1): 22–31. DOI 10.26202/sylwan.2017109.

Zvyagintsev V.B., Baranov O.Yu., Pantelev S.V. 2015. Prodviženie invazii oomiceta *Phytophthora Alnibrasier* et s.a. Kirk na vostok – pervaa nahodka patogena v Belarusi www.belstu.by/Portals/0/Zviagintsev-Baranov-Pantelev--2015.pdf . [7.08.2020].

Wkład autorów

J.A.N. – analiza wyników, redakcja tekstu; R.T. – eksperyment, analiza wyników; T.M. – eksperyment, analiza wyników, redakcja tekstu; T.O. – koncepcja, analiza wyników, redakcja tekstu.

Decline of Black Alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. along the Narewka River in the Białowieża Forest District

Tadeusz Malewski¹ , Robert Topor², Justyna Anna Nowakowska³ , Tomasz Oszako⁴ 

¹Museum and Institute of Zoology of Polish Academy of Sciences, Department of Molecular and Biometric Techniques, ul. Wilcza 64, 00–679 Warsaw, Poland; ²Białystok University of Technology, Institute of Forest Sciences, 15–351 Białystok, Poland; ³Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Environmental Sciences, ul. Wóycickiego 1/3, 01–938 Warsaw, Poland; ⁴Forest Research Institute, Department of Forest Protection, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3; 05–090 Raszyn, Poland

*Tel. +48 227150 402 e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

Abstract. Black Alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. is an important tree commonly growing in Poland. Alders are actinorhizal plants that play an important ecological role in riparian ecosystems through atmospheric nitrogen fixation, filtration and purification of waterlogged soils as well as providing a refuge for terrestrial and aquatic organisms thus helping to stabilize stream banks. Black Alder used to be considered a very pest and disease resistant species but, the situation changed in 2000, when an unprecedented decline of Alders was observed in Poland. In the Białowieża Forest District, this decline has been observed on wet meadow habitats and along rivers or watercourses.

Currently, there are several hypotheses explaining Alder dieback, among them climatic changes and *Phytophthora* infections. In terms of climate, Black Alder requires a high atmospheric humidity during all phases of its reproductive cycle. It tolerates neither long-term summer flooding nor a significant decrease in the groundwater level. In terms of pests, oomycete pathogens of the genus *Phytophthora* are the most destructive plant pathogens known and many of them are present in forests and nurseries all over Europe.

The aim of this study was to evaluate the health of Black Alder along the Narewka River in the Białowieża Forest District. Selected areas were monitored in 2012 and 2018, but no relationship between drought and alder health was found. A preliminary analysis of soil and water samples by real time PCR revealed the presence of two *Phytophthora* species: *P. alni* and *P. cactorum*. Further and more detailed research is required to elucidate the role of these pathogens in Alder dieback.

Keywords: alder, dieback, drought, *Phytophthora*, PCR

1. Introduction

Common alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. is found in Europe, Siberia, Asia Minor and North Africa. In Poland, it is an important species from an ecological and economic point of view. It is a fast-growing tree, and thus valuable in the context of wood production (Jaworski 2011). Black alder is the only forest-forming tree in Poland whose roots can form actinorrhizae with actinomycetes of the genus

Frankia, ectomycorrhizae with large fruiting fungi and arbuscular mycorrhizae with fungi of the genus *Glomus*. The high adaptability of black alder allows it to be used for reclamation and afforestation on soils that are damaged and difficult to afforest (Pancer-Kotejowa, Zarzycki 1980; Jaworski 2011).

Of the native trees, this species tolerates high soil moisture best and thrives in areas where flowing water is present, although it can also occur in areas with stagnant

Received: 10.09.2020 r., accepted after revision: 12.10.2020 r.

water. It does not tolerate both long-term summer flooding and a significant reduction in groundwater levels (Orphanage 2001), but needs high air humidity for its maintenance in all phases of the reproductive cycle (Claessens et al. 2010). Until recently in Poland, black alder was considered to be a species with a low level of susceptibility to pests and diseases. This situation changed at the turn of the 21st century, when the dieback of alder stands was observed (Piętka, Grzywacz 2018). In this multifactorial phenomenon, abiotic factors, including weather anomalies, play an important role. The phenomenon of the mass dieback of alder stands was first confirmed in Great Britain in 1995 (Gibbs 1995). In a short period of time, it spread throughout Europe, also affecting grey and Italian alder in Germany, Austria, Hungary, Poland and Slovakia (Brasier et al 1995; Orlikowski et al. 2003; Jung, Blaschke 2004). One of the harmful biotic factors are oomycetes, which cause phytophthorosis in the root collar at the base of stems in both nurseries and forest stands. One of the *Phytophthora* species was identified as the cause of the disease. Gibbs (1995) described it as a taxon similar to *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman, which is a common pathogen of deciduous trees. Then, Brasier et al. (1999) demonstrated that this pathogen is an inter-species hybrid. Later studies proved that it is a hybrid of three species: *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk, *Phytophthora multiformis* and *Phytophthora uniformis* (Brasier & S.A. Kirk) Husson, Ioos & Aguayo. The latter *Phytophthora* is a diploid species, *Phytophthora multiformis* is an allotetraploid and *Phytophthora alni* is an allotriploid containing half the genome of each of its parents *Phytophthora multiformis* and *Phytophthora uniformis* (Husson et al. 2015). The species *Phytophthora alni* and *Phytophthora multiformis* are widespread in Europe, but have not been identified in other continents, while *Phytophthora uniformis* has been isolated both in Europe and North America (Navarro et al. 2015). So far, only the pathogen *Phytophthora uniformis* has been detected in Poland (Trzewik et al. 2008). Apart from the above-mentioned ones, other *Phytophthora* species have also been found in the rhizosphere and on the trunks of alder: *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt., *Phytophthora cambivora*, *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Phytophthora plurivora* T. Jung and T.I. Burgess, *Phytophthora gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman, *Phytophthora megasperma* Drechsler, *Phytophthora pseudosyringae* T. Jung & Delatour, *Phytophthora syringae* (Berk.) Kleb. and *P. lacustris* Brasier, Cacciola, Nechwatal, Jung & Bakonyi (Trzewik et al. 2008). The source of infection can be both water and soil with seedlings, also asymptomatic, which do not yet exhibit any symptoms (Orlikowski et al. 2013).

Long-term droughts have often been indicated as the cause of weakening trees; therefore, the aim of this study was to assess the health condition of alders growing along watercourses in the Białowieża Forest District. The working hypothesis assumed that more trees died further away from the water source, which would indicate that the cause of death could be the shortage of water in the soil (drought).

2. Material and methods

In order to determine the causes of the phenomenon of black alder *Alnus glutinosa* dieback in the Białowieża Forest District, research was conducted along the banks of the Narewka River. Three observation sites were chosen in riparian ecosystems with a predominance of alder trees of coppice origin at the age of about 30–40 years:

1. Alder stand in alder carr habitat (52°69'N; 23°88'E), Białowieża Forest District, Stoczek Forest Unit, Section 476A;

2. Alders growing along the Narewka River (52°70' N; 23°84' E);

3. Alder stand in a flood plain (52°72'N; 23°74' E), Białowieża Forest District, Batorówka Forest Unit, Section 394 Ab.

River sections of 100 m long (Sites 1 and 2) and the alder stand (Site 3), which was periodically flooded by water overflowing the river, were selected for the survey.

During the fieldwork, healthy, sick and dead trees were counted, and their distance from the river bank was measured. Sick trees were considered to be those with sparse crowns resulting from dying shoots and smaller than usual leaves, which took on a lighter colour (light yellowish-green). The research was conducted in 2012 and from July to September 2018. In order to examine the presence of *Phytophthora*, a soil sample was taken in 2018 at each site from under three alders with symptoms of disease (as the most probable location of this pathogen) for analysis by real-time PCR. Soil samples were taken with a spade in two locations at a distance of about 1 m from the tree trunks at a depth of 20 cm (about 0.5 kg) and mixed together.

Analysis of the presence of *Phytophthora* spp.

DNA from the soil samples (0.5 g) was isolated with the NucleoSpinSoil Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. The presence of species of the genus *Phytophthora* was determined by means of real-time PCR. As a positive control,

DNA isolated from the relevant *Phytophthora* species growing in Petri dishes was used. As a negative control, an appropriate amount of water was added to the reaction instead of DNA. Reactions took place in a mixture containing 2 µl DNA solution, 10 µl 2 × LuminoCt Master Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2 µl F and R starters (5 µM) and 0.2 µl TaqMan probe (5 µM). The probe and primer sequences used in the analysis are listed in Table 1. The Reaction Thermal Profile: 3 min predenaturation at 95°C; then 40 amplification cycles: denaturation at 95°C, 30 s; primer annealing at 55°C, 30 s; synthesis at 72°C, 30 s (Nowakowska et al. 2016). In order to identify *Phytophthora multiformis* (previous name *Phytophthora alni* sub sp. *multiformis*), probes and primers were used (Nowakowska et al. 2016), and for *Phytophthora cactorum* and *Phytophthora plurivora*, the probes and primers described in the publication (Nowakowska et al. 2017). The starters and probe to identify *Phytophthora alni* were designed in the Allele ID program (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) according to the standard guidelines for TaqMan-type probes (Dorak 2006). Starters and the probe to detect *Phytophthora alni* were designed based on the

ITS sequence (JF300250.1) available in the NCBI gene bank (www.ncbi.nlm.nih.gov). The probes were marked with the fluorescent dye JOE at the end of the 5' probe and an HBQ1 silencer at the end of 3' (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Real-time PCR was performed in the Rotor Gene 6000 cycler (Qiagen, Germany).

The Microsoft Excel 2019 program was used for the statistical calculations.

3. Results

Both inventories from 2012 and 2018 showed a similar number of dead trees (2012 – 11.4%; 2018 – 11.0%), while in 2018, there were 2.2 times more healthy trees (2012 – 27.8%; 2018 – 61.0%) (Table 2). The increase in the number of healthy trees was accompanied by a more than two-fold decrease in the average distance from water, from 23.3 m to 9.6 m. In the case of sick and dead trees, the average distance from the water source did not change. Trees growing 20 m from water did not show any symptoms of disease, while trees growing just along the banks were usually dead (Table 2).

Table 1. Sequence of primers and probes used to identify *Phytophthora* in the analyzed samples

Species	Primer F (5'–3')	Primer R (5'–3')	Probe F (5'–3')	References
<i>P. alni</i>	ctgtcgatgtcaaaagttg	atgggtttaaagataagg	acccaaacgctcgccat	in this study
<i>P. multiformis</i>	ccgtatcaaccacttag	cacagtatgttcagtattcaa	cggcctggctgtcgatatca	Nowakowska et al. 2016
<i>P. cactorum</i>	acgtgaaccgtttcaaac	cagccgccaacaataaag	cagccgccaccagacaagac	Nowakowska et al. 2017
<i>P. plurivora</i>	ccgtatcaacccttttag	gcagtataatcagtattgtaga	ccccgcagtataatcagtattgtaga	Nowakowska et al. 2017

Table 2. Number of healthy, sick and dead trees depending on the distance to the bank of the Narewka River

Trees	Mean distance from the bank of river [m] ± SEM in 2012	Number of trees	Mean distance from the bank of river [m] ± SEM in 2018	Number of trees
Healthy trees	23.3 ± 7.22	22	9.6 ± 3.38	50
Sick trees	9.3 ± 4.58	48	9.3 ± 4.06	23
Dead trees	3.4 ± 1.60	9	3.4 ± 2.67	9
Total		79		82

Healthy trees 2012–2018, $p < 0.01$

Healthy trees – sick trees 2012, $p < 0.01$

Sick trees – dead trees 2012, $p < 0.05$

Sick trees – dead trees 2018, $p < 0.01$

Real-time PCR allowed the presence of *Phytophthora* to be detected in the soil samples. The result of the reaction is expressed as the Ct (threshold cycle) value, which is the number of the PCR cycle in which the instrument detected the fluorescence emission of the probe in the tested sample. The lower the Ct value, the greater the amount of the pathogen. A Ct value above 40 indicated the absence of the tested species' DNA in the sample. The analysis showed the presence of two pathogens in the soil: *Phytophthora alni* (Ct=35.57) in Site 2 and *Phytophthora cactorum* (Ct=36.77) in Site 3 (Table 3). The analysis did not reveal the presence of *Phytophthora multififormis* or *Phytophthora plurivora* in the tested soil samples.

4. Discussion

It was initially thought that alder dieback may be caused by drought (Oszako 2005), but current research has shown that most of the dead trees are on the river bank (Table 2). The long drought occurring in Białowieża in 2015 (Nowakowska et al. 2020) may have been the cause of the observation that in 2018, healthy trees were located closer to the river than in 2012. In south-eastern Poland, ten *Phytophthora* species have been found, including *Phytophthora alni* and *Phytophthora cactorum*, on trunks and in the rhizosphere of alders (Trzewik et al. 2015). The occurrence of *Phytophthora cactorum* was recorded around the Siemianówka Reservoir, located in two countries – Belarus and Poland (Malewski et al. 2019). *Phytophthora alni*

(Zviagintsev et al. 2015) was found in the alder forests of Belarus. The Narewka River flows out of the Dziki Nikor and Kutry wilderness areas in Belarus at an altitude of 159 m and flows into the Narew River at an altitude of 137 m above sea level. (Górniak 2006). Thus, *Phytophthora* can move with its waters (Cahill et al. 2008), and the difference in the levels ensures that the buoyant spores can move with the current and infect encountered trees. The occurrence of *Phytophthora cactorum* was also observed along the Polish-Ukrainian river section in the area of Włodzimierz Wołyński, Jarosław and Medyka (Matsiakh et al. 2016).

Phytophthora can be carried not only by water but also by birds. *Phytophthora cactorum* is especially often carried by: the Eurasian siskin *Carduelis spinus*, the greenfinch *Chloris chloris* L. and the blue tit *Paruscaeruleus* L. (Malewski et al. 2019). Taking into account the presence of *Phytophthora* along the Siemianówka Reservoir and the Polish-Ukrainian border, it can be expected that it also occurs in the natural forest communities of the Białowieża Forest. Confirmation of *Phytophthora*'s presence in the soil samples taken from under the alder trees suggests that this may be the cause of their dieback in the Białowieża Forest District.

Conclusions

The largest number of sick and dead alders is closest to the bank of the Narewka River, which allows us to reject the assumed hypothesis of water shortage in the soil as the cause of their dying.

Table 3. Analysis of the presence of *Phytophthora* in soil samples

Place	Sample	C _t value			
		<i>P. alni</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. multififormis</i>	<i>P. plurivora</i>
Place 1	Sample 1	>40	>40	>40	>40
	Sample 2	>40	>40	>40	>40
	Sample 3	>40	>40	>40	>40
Place 2	Sample 1	>40	>40	>40	>40
	Sample 2	>40	36,77	>40	>40
	Sample 3	>40	>40	>40	>40
Place 3	Sample 1	35,57	>40	>40	>40
	Sample 2	>40	>40	>40	>40
	Sample 3	>40	>40	>40	>40

Two pathogens were found (using the real-time PCR method): *P. alni* and *P. cactorum* in soil samples taken from the Białowieża Forest District.

Conflict of interest

The authors declare the lack of potential conflicts of interest.

Funding sources

The study used the results of the research of the Forest Research Institute financed by State Forests.

References

- Cahill D.M., Rookes J.E., Wilson B.A., Gibson L., McDougall K.L. 2008. *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. *Australian Journal of Botany* 56: 279–310. DOI 10.1071/BT07159.
- Claessens H., Oosterbaan A., Savill P., Rondeux J. 2010. A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry* 83(2): 163–175. DOI 10.1093/forestry/cpp038.
- Brasier C.M., Rose J., Gibbs J.N. 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Great Britain. *Plant Pathology* 44: 999–1007. DOI 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02658.x.
- Brasier C.M., Cooke D.E.L., Duncan J.M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through inter specific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96(10): 5878–5883. DOI 10.1073/pnas.96.10.5878.
- Dorak M.T. 2006. Real time PCR (Advanced Methods Series). Taylor and Francis, Oxford, UK, 333 s. ISBN 041537734X.
- Gibbs J. 1995. *Phytophthora* root disease of alder in Britain. *EPPO Bulletin* 25: 661–664. DOI 10.1111/j.1365-2338.1995.tb01118.x.
- Górnjak A. (red.) 2006. Ekosystem zbiornika Siemianówka w latach 1990–2004 i jego rekultywacja. Białystok, Zakład Hydrobiologii Uniwersytetu w Białymstoku, 235 s. ISBN 8374310936.
- Husson C., Aguayo J., Revellin C., Frey P., Ioos R., Marçais B. 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genetics and Biology* 77: 12–21. DOI 10.1016/j.fgb.2015.02.013.
- Jaworski A. 2011. Hodowla lasu. Tom 3. Charakterystyka hodowlana drzew i krzewów leśnych. Warszawa, PWRiL, 640 s. ISBN 978-83-09-01117-0.
- Jung T., Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197–208. DOI 10.1111/j.0032-0862.2004.00957.x.
- Malewski T., Brzezinska B., Lassaad B., Oszako T. 2019. Role of avian vectors in the spread of *Phytophthora* species in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 155(4): 1363–1366. DOI 10.1007/s10658-019-01840-w.
- Matsiakh I., Oszako T., Kramarets V., Nowakowska J.A. 2016. *Phytophthora* and *Pythium* species detected in rivers of the Polish-Ukrainian border areas. *Baltic Forestry* 22(2): 230–238.
- Navarro S., Sims L., Hansen E.M. 2015. Pathogenicity to alder of *Phytophthora* species from riparian ecosystems in western Oregon. *Forest Pathology* 45: 358–366. DOI 10.1111/efp.12175.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba A., Borys M., Oszako T. 2016. Molekularna diagnostyka wybranych patogenów z rodzaju *Phytophthora* w szkółkach dębu szypułkowego i buka zwyczajnego w ramach integrowanej ochrony roślin. *Sylwan* 160(5): 365–370. DOI 10.26202/sylwan.2015070.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba T., Borys M., Kubiak K., Tkaczyk M., Oszako T. 2017. Rapid diagnosis of pathogenic *Phytophthora* species in soil by real time PCR. *Forest Pathology* 47(2): e12303. DOI 10.1111/efp.12303.
- Nowakowska J.A., Hsiang T., Patynek P., Stereńczak K., Olejarski I., Oszako T. 2020. Health assessment and genetic structure of monumental Norway Spruce trees during a bark beetle (*Ips typographus* L.) outbreak in the Białowieża Forest District, Poland. *Forests* 11(6): 647. DOI 10.3390/f11060647.
- Orlikowski L.B., Oszako T., Szkuta G. 2003. Alder *Phytophthora* in Poland: occurrence and plants colonization. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 68(4 Pt B): 705–709.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2013. Woda jako źródło zagrożenia roślin w środowisku przez *Phytophthora* spp. *Polish Journal of Agronomy* 15: 8–13.
- Oszako T. 2005. Alder decline in Poland, in: Diseases and insects in forest nurseries. The sixth meeting of the IuFRo Working Party 7.03.04, 129–137.
- Sierota Z. 2001. Choroby lasu. Warszawa, CILP, 99 s. ISBN 83-88478-18-4.
- Trzewik A., Orlikowska T., Oszako T. 2008. Zagrożenie olszy czarnej przez *Phytophthora alni* w Polsce. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 529: 227–233.
- Trzewik A., Orlikowski L., Oszako T., Nowakowska J.A., Orlikowska T. 2015. The characterization of *Phytophthora* isolates obtained from diseased *Alnus glutinosa* in Poland. *Baltic Forestry* 21(1): 44–50.
- Pancer-Kotejowa E., Zarzycki K. 1980. Zarys ekologii, w: Białobok S. (red.). Olsze *Alnus* Mill. PWN, Warszawa – Poznań, 229–257.
- Piętka J., Grzywacz A. 2018. Grzyby wielkoowocnikowe stwierdzone na olszy czarnej *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. w drzewostanach olszowych wykazujących objawy zamierania. *Sylwan* 162(1): 22–31. DOI 10.26202/sylwan.2017109.

Zvyagintsev V.B., Baranov O.Yu., Panteleev S.V. 2015. Prodviženie invazii oomiceta *Phytophthora Alnibrasier* et s.a. Kirk na vostok – pervaâ nahodka patogena v Belarusi www.belstu.by/Portals/0/Zviagintsev-Baranov-Panteleev--2015.pdf [7.08.2020].

Authors' contribution

K.S. – concept, experiment, analysis of results, text editing; T.O. – concept, text editing; K.K. – experiment, analysis of results, text editing; J.A.N.– concept, analysis of results, text editing; T.M. – analysis of results, text editing.