

## **Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego i wody do oceny laboratoryjnej na obecność *Phytophthora ramorum***

Testowane rośliny: **Borówka wysoka - *Vaccinium L.***

### Termin pobierania prób

Oceny polowej materiału szkółkarskiego kategorii elitarny w stopniu przedbazowy oraz elitarny w stopniu bazowy dokonuje się dwa razy w roku w trakcie sezonu wegetacyjnego, natomiast kategorii kwalifikowany oraz CAC raz w roku. Z każdej przedbazowej rośliny macecznej pięć lat po jej dopuszczeniu jako przedbazowej rośliny macecznej, a następnie co pięć lat, należy pobrać próby roślin do badań laboratoryjnych pod kątem obecności *P. ramorum*. W przypadku pozostałych kategorii i stopni kwalifikacji, w razie podejrzenia wystąpienia objawów fytoftorazy podczas polowej oceny wizualnej materiału szkółkarskiego, należy pobrać próby i wykonać ocenę laboratoryjną na obecność *P. ramorum*. W przypadku wykrycia *P. ramorum* na materiale kategorii kwalifikowany oraz CAC po upływie trzech miesięcy od dnia wykrycia należy pobrać próby i wykonać ocenę laboratoryjną (Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia z 31 marca 2017 r. w sprawie szczegółowych wymagań dotyczących wytwarzania i jakości materiału szkółkarskiego; Dz.U. 2017 poz. 757 z późniejszymi zmianami). Optymalnie próby do badań należy pobierać wiosną (V-VI) lub jesienią (IX-X), przed nastaniem długotrwałych wysokich lub niskich temperatur powietrza.

### Wybór tkanki/części rośliny

Patogeny z rodzaju *Phytophthora*, w tym *P. ramorum* są najczęściej wprowadzane na nowe obszary z porażonymi bezobjawowo sadzonkami, a następnie ich zarodniki rozprzestrzeniają się wraz ze spływającą wodą opadową, wzdłuż systemów nawadniających, za pomocą narzędzi i maszyn uprawowych, wiatru czy na podeszwach butów. Rozwojowi *P. ramorum* sprzyjają temperatury w granicach 10–30°C i wysoka wilgotność powietrza (62–100%). Gatunek ten poraża głównie nadziemne części roślin. Porażone krzewy borówki zazwyczaj wykazują objawy w postaci ciemnobrązowych plam na liściach. Nekroza rozwija się od wierzchołkowej części liścia (w miejscu gromadzenia się wody sprzyjającej infekcjom), następnie

rozprzestrzenia się, pokrywając z czasem całą jego powierzchnię (Putnam, 2017). Infekcje liści prowadzą do ich przedwczesnego opadania i osłabienia roślin. W warunkach wysokiej wilgotności powietrza patogen wytwarza zarodniki (chlamydospory, zoospory) na wcześniej zainfekowanych liściach. Zoospory są następnie łatwo rozprzestrzeniane przez wiatr i wodę, dokonując infekcji nowych roślin - gospodarzy. Chlamydospory *P. ramorum* kolonizują korzenie roślin nie wywołując na nich objawów chorobowych. Stanowią także formę przetrwalnikową patogena w glebie (Colburn & Shishkoff, 2006). W przypadku gatunków z rodzaju *Phytophthora* przyjmuje się, że ich jednostki propagacyjne występują w glebie nierównomiernie, w skupieniach. Należy dokonać ogólnej oceny pola w poszukiwaniu roślin z objawami brązowienia liści lub defoliacji, szczególnie w obniżeniach terenu, gdzie może zbierać się woda. W przypadku braku występowania objawów inspekcję należy wykonać oddzielnie dla każdej odmiany (bloku). Próby pobierać losowo, poruszając się liniowo w kształcie litery W.

W szkółkach pojemnikowych wskazane jest przeprowadzenie analizy wody wykorzystywanej do podlewania roślin. W tym celu, do wykrycia obecności zoospor lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* można zastosować zbiorniki pułapkowe zbierające wodę (fot. 1), która została wykorzystana do podlewania sadzonek według metodyki Swiecki i in. (2018). Szczegółowy opis protokołu jest dostępny pod adresem [http://phytosphere.com/BMPsnursery/test3\\_4bench.htm](http://phytosphere.com/BMPsnursery/test3_4bench.htm).



Fot. 1. Zbiornik – pułapka do wychwytywania zoospor *Phytophthora* spp. z wody, która została wykorzystana do podlewania roślin w szkółce (<http://dx.doi.org/10.3733/ca.2018a0026>)

#### Sposób pobierania prób:

**Przy pobieraniu prób należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:**

1. W pierwszej kolejności należy wykopać rośliny lub pobrać ich pędy, wykazujące następujące symptomy: brązowienie liści, defoliacja.
2. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) miejsca w mateczniku, z którego pobrano rośliny do badania, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.

3. W przypadku pobierania prób wody lub gleby, każda z nich powinna pochodzić z pojedynczej kwatery, na której znajduje się materiał szkółkarski oraz posiadać etykietę umożliwiającą identyfikację opisanej kwatery.

4. Próby gleby i materiału roślinnego pobierać do szczelnie zamykanych i trwale oznakowanych foliowych torebek. Wodę umieszcza się w plastikowej butelce. W przypadku wyższych temperatur (powyżej 25°C) zaleca się umieszczenie prób w tzw. lodówce turystycznej, pojemniku styropianowym albo "torbie na mrożonki" z wkładem chłodzącym. Nie dopuszczać do zamrożenia prób!

Pobrane próby należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na ich wykonanie (formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa, gov.pl/piorin). Dodatkowo należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz pisemną informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu":

Data pobrania próby (dd mm rrrr)	
Dane producenta: <ul style="list-style-type: none"><li>• Imię i nazwisko</li><li>• Adres kontaktowy</li><li>• Telefon</li><li>• Adres e-mail</li></ul>	
Adres plantacji	
Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: liście)	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobierano próby	
Dodatkowe informacje dotyczące m.in. występowania podejrzanych symptomów, chorób, szkodników lub rozpoznanych źródeł infekcji w pobliżu badanych roślin	

#### Metody laboratoryjne badania obecności *P. ramorum*

Po dostarczeniu do laboratorium próby materiału roślinnego umieścić w chłodzie (+4°C do +10°C). Próby mogą być przechowywane w lodówce (chłodni) maksymalnie przez okres kilku dni. W przypadku prób wody i gleby należy je przechowywać w temperaturze od +10 do +18°C przez okres maksymalnie kilkunastu dni.

Badania pod kątem obecności patogena w materiale roślinnym można przeprowadzić poprzez jego izolację na pożywki agarowe, a następnie identyfikację wyrosłych kolonii na podstawie morfologii oraz reakcji PCR lub bezpośrednią

identyfikację patogena w porażonym materiale roślinnym z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR.

W celu izolacji patogena należy zdezynfekować powierzchniowo tkanki materiału roślinnego zanurzając je w 1% roztworze NaOCl. Następnie wyciąć z pogranicza tkanki zdrowej i chorej małe fragmenty materiału (ok. 0,5-1 cm<sup>2</sup> każdy), wypłukać w sterylnej wodzie (10 sek.), następnie zanurzyć w 50% alkoholu etylowym na 10 sek., ponownie przemyć sterylną wodą i wysuszyć. Przygotowane fragmenty roślin umieścić na pożywce mikrobiologicznej. Zalecana pożywka do selektywnej izolacji łęgniowców z rodzaju *Phytophthora* to pożywka stała P<sub>5</sub>ARP[H] (Jeffers & Martin, 1986), zawierająca agar kukurydziany oraz antybiotyki (Pimarycynę, Ampicylinę, Ryfampicynę oraz PCNB) a także jej późniejsze modyfikacje. Po wyłożeniu fragmentów tkanki na pożywkę należy je inkubować przez około 7 dni w temperaturze 20-25°C, aż do momentu uzyskania wzrostu grzybni. Wyrosłe kultury należy przeszczepić na czyste podłoża, dedykowane do przeprowadzenia charakterystyki morfologicznej łęgniowców, umożliwiającej ich klasyfikację do rodzaju *Phytophthora* według klucza [np. Werres i in., 2001 lub EPPO PM 7/66(1)].

W celu potwierdzenia, że wyrosłe kolonie należą do rodzaju *Phytophthora*, jak również do identyfikacji łęgniowców bezpośrednio w porażonym materiale roślinnym, można przeprowadzić test PCR. Do izolacji kwasów nukleinowych, zarówno z aksenicznych kultur patogena, jak i materiału roślinnego (fragmenty liści) z wyraźnymi objawami choroby, można wykorzystać komercyjne zestawy, jak np. GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx). W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta. Z DNA grzyba uzyskanym z aksenicznych kultur należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami ITS1 : 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' oraz ITS4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (White et al., 1990), a następnie odczytać sekwencję produktu i porównać ją z wynikami dostępnymi w bazie danych GenBank dla łęgniowców *Phytophthora*. Do identyfikacji *P. ramorum* zarówno z kultur, jak i z materiału roślinnego można stosować dwie równoważne i zwalidowane metody TaqMan®-PCR opracowane przez Hughes i wsp., (2006) lub Hayden i wsp., (2004). Dane z przebiegu reakcji TaqMan® analizuje się zgodnie z protokołem opisanym przez autorów publikacji. Warunki do przeprowadzenia reakcji PCR ze starterami do regionów ITS oraz DNA *Phytophthora*, jak i stężenia poszczególnych reagentów zostały wymienione w metodyce EPPO PM 7/66(1).

Jeżeli z jakichś przyczyn nie można uzyskać żywych kultur *P. ramorum* z materiału roślinnego należy zbadać próbę gleby lub/i wody ze szkółki na obecność łęgniowców z rodzaju *Phytophthora*. W tym celu należy przeprowadzić test pułapkowy, a jako pułapkę wykorzystać liście różanecznika odm. Nova Zembla dla prób gleby i liście różanecznika odm. Cunningham White dla prób wody (Themann & Werres, 1998; Themann i in., 2002). Do badania pobiera się próbę gleby o wadze 1-1,5 kg, pobraną ze szkółki do głębokości 15-20 cm, jeśli to możliwe z bliskiego sąsiedztwa systemu korzeniowego chorujących roślin lub/i, co najmniej 1 litr wody włączając w to osad i wszelkie resztki pływające na jej powierzchni. Pobraną glebę umieszcza się w plastikowych kuwetach, zalewa się wodą kranową do wysokości 2 cm nad

powierzchnią gleby, a następnie na lustrze wody ostrożnie umieszcza się 5-10 liści różanecznika. Pobraną próbkę wody umieszcza się w plastikowej kuwecie, a następnie na lustrze wody ostrożnie umieszcza się liście różanecznika. Próby należy inkubować w temperaturze pokojowej przez 7 dni. Po tym czasie należy oczyścić liście pod bieżącą wodą przy użyciu miękkiej szczoteczki, przesunąć szybkim ruchem nad płomieniem palnika obie strony blaszki liścia i pokroić na fragmenty 5 x 5 mm oraz wyłożyć na pożywkę P<sub>5</sub>ARP[H], w ilości 25 fragmentów na jedną szalkę; łącznie przygotować pięć takich szalek na próbkę. Zaszczepione podłoża P<sub>5</sub>ARP[H] należy inkubować w temperaturze pokojowej. Po 48 godzinach należy ocenić morfologię wyrosłych kolonii oraz odszczepić je na czyste podłoża stałe w celu charakterystyki ich morfologii wg klucza, oraz poddać dalszej identyfikacji metodami biologii molekularnej.

W szkółkach pojemnikowych można przeprowadzić test pułapkowy z modyfikacją () polegającą na umieszczeniu liści różanecznika odm. Cunningham White na spodzie doniczki, pod bryłą korzeniową testowanej rośliny. Następnie doniczki zalewa się wodą do wysokości około 2 cm na okres 5 dni. Po tym czasie wyjmuje się liście i wykłada na podłoże selektywne według metody opisanej powyżej.

#### Literatura:

Colburn G.C., Shishkoff N. (2006). Detection of *Phytophthora ramorum* chlamydospores in soil. *Phytopathology* 96, S190.

Hayden K.J., Rizzo D., Tse J. & Garbelotto M. (2004). Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 94, 1075–1083.

Hughes K.J.D., Griffin R.L., Tomlinson J.A., Boonham N., Inman A.J. & Lane C.R. (2006). Development of a one-step real-time PCR assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 96, 975–981.

Jeffers S.N., & Martin S.B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70, 1038–1043.

Putnam M.L. (2017). Compendium of blueberry, cranberry, and lingonberry diseases and pests (No. Ed. 2). American Phytopathological Society (APS Press).

Swiecki T.J., Quinn M., Sims L., Bernhardt E., Oliver L., Popenuk T., & Barbelotto M.M. (2018). Three new *Phytophthora* detection methods, including training dogs to sniff out the pathogen, prove reliable. *California Agriculture*, 72(4).

Themann K. & Werres S. (1998). [Use of rhododendron leaves to test for *Phytophthora* spp. in root and water samples]. *Nachrichtenblatt Des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50, 37–45.

Themann K., Werres S., Diener H-A. & Lüttmann R., (2002). Comparison of different methods of detecting *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries. *Journal of Plant Pathology* 84, 41–50.

van Leeuwen G.C.M. (2005). Protokół diagnostyczny EPPO PM 7/66(1) dla *Phytophthora ramorum*. Tłumaczenie na język polski Grażyna Szkuta (GIORiN CL).

Vercauteren A., Riedel M., Maes M., Werres S., Heungens K. (2013). Survival of *Phytophthora ramorum* in rhododendron root balls and in rootless substrates. *Plant Pathology* 62, 166–176.

Werres S., Marwitz R., Man i't Veld W.A., de Cock A.W.A.M., Bonants P.J.M., De Weerd M., Themann K., Ilieva E., & Baayen R.P. (2001). *Phytophthora ramorum* sp. Nov., a new pathogen on Rhododendron and Viburnum. *Mycological Research* 105, 1155–1165.

White T.J., Bruns T., Lee S., & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (ed.) Academic Press, San Diego, CA.: 315–322.

#### Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

---

Opracowanie: dr inż. Anna Poniatowska, e-mail: [anna.poniatowska@inhort.pl](mailto:anna.poniatowska@inhort.pl)