

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do oceny laboratoryjnej na obecność *Verticillium dahliae* Klebahn (1913)

Testowane rośliny: **Poziomka – *Fragaria* L.,
Truskawka – *Fragaria* × *ananassa* D.**

Termin pobierania prób

Oceny polowej materiału szkółkarskiego wszystkich kategorii dokonuje się dwa razy w roku w trakcie sezonu wegetacyjnego. W przypadku podejrzenia wystąpienia *Verticillium dahliae* lub gdy obserwowane objawy nie są jednoznaczne, należy pobrać próby i dokonać oceny laboratoryjnej na obecność tego grzyba (wg. Rozporządzenia 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). Próby do badań na obecność patogena w materiale roślinnym należy pobierać latem (VI-VII), szczególnie w trakcie lub po nastaniu długotrwałych wysokich temperatur powietrza i jesienią (IX-X), w okresie ukorzenia sadzonek rozłogowych.

Wybór tkanki/części rośliny

Grzyb *V. dahliae* powoduje chorobę zwaną wertycyliozą. Zwykle pierwsze objawy choroby w postaci więdnienia i zasychania najstarszych liści obserwuje się podczas upalnej pogody. W dalszej kolejności obserwuje się zasychanie całych roślin mącznych. Patogen ten jest najczęściej wprowadzany na nowe obszary z porażonymi sadzonkami. Grzyb zimuje w glebie w postaci grzybni oraz form przetrwalnych – mikrosklerocjów. W obecności rośliny żywicielskiej mikrosklerocja kiełkują i infekują korzenie, najczęściej uprzednio uszkodzone mechanicznie (przez nicianie, owady, zabiegi). Infekcjom sprzyjają temperatury od 12° do 30°C. Wewnątrz korzenia patogen przerasta do tkanki naczyniowej, dalej do rozłogów i młodych roślin. Przy silnym porażeniu, na przekroju podłużnym korony widoczne są ciemne plamy lub brązowienie tkanki naczyniowej, a podstawy ogonków liściowych przebarwiają się na czerwono-brązowo. Wierzchołki korzeni, przez które wniknął grzyb, zamierają, a wraz z ich rozpadem następuje uwolnienie propagul grzyba do gleby. Mikrosklerocja

pozostają żywotne w środowisku glebowym przez kilkanaście lat. W uprawie truskawki i poziomki wertycylioza powoduje największe straty w pierwszym roku po posadzeniu roślin.

W przypadku gatunków z rodzaju *Verticillium* przyjmuje się, że ich jednostki propagacyjne występują na plantacjach nierównomiernie, w skupieniach. Należy dokonać ogólnej oceny pola w poszukiwaniu roślin z objawami takimi, jak więdnienie liści i czerwienienie ogonków liściowych. Należy przeprowadzić wizualną inspekcję systemu korzeniowego pod kątem jego gnicia i rozpadu oraz brązowych smug/przebarwień w koronie (podłużne cięcie sekatorem) z symptomatycznych roślin. Należy zwrócić uwagę, że nekrozy w koronie mogą być objawem infekcji przez inne patogeny, jak np. *Phytophthora cactorum*, *Colletotrichum acutatum*, i in. W przypadku podejrzenia wystąpienia objawów powodowanych przez *V. dahliae*, rośliny należy poddać analizie laboratoryjnej. Obecność *V. dahliae* można także stwierdzić na podstawie badania prób gleby z matecznika. Największe stężenie mikrosklerocjów jest obserwowane w górnej warstwie gleby, na głębokości 5 - 10 cm (Meszka, 2013).

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu prób należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. W pierwszej kolejności należy wykopać całe rośliny wykazujące symptomy więdnienia liści oraz czerwono-brązowe przebarwienia ogonków liściowych, a następnie przeprowadzić ocenę makroskopową podziemnych części roślin pod kątem wystąpienia gnicia i rozpadu korzeni oraz ciemnych plam i smug widocznych na podłużnym przekroju korony.
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 gleby, każda z nich powinna pochodzić z pojedynczej kwatery, na której znajduje się materiał szkółkarski oraz posiadać etykietę umożliwiającą identyfikację opisanej kwatery. Glebę należy pobierać z pobliża systemu korzeniowego roślin za pomocą laski glebowej, wbijając ją na głębokość 10—15 cm (20-30 pobrań na badany sektor). Glebę z danego sektora należy dokładnie wymieszać i rozdrobnić, a następnie przygotować próbę do analizy laboratoryjnej o wadze 500 g.
4. Zarówno próby roślin jak i gleby należy pobierać losowo z wyznaczonych sektorów, poruszając się liniowo w kształcie litery W. Próby powinny zawierać sadzonki mateczne oraz ukorzenione sadzonki rozłogowe.
5. Próby pobierać do trwale oznakowanych foliowych torebek i zabezpieczyć przez ich zamknięcie. 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 przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na ich wykonanie (formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji

Ochrony Roślin i Nasiennictwa, www.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">• Imię i nazwisko• Adres kontaktowy• Telefon• Adres e-mail	
Adres plantacji	
Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: korzenie)	
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 *V. dahliae*

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 dostarczenia prób roślin bądź ich części z podejrzeniem wertycyliozy, z miejsc na ich przekroju podłużnym (korona, miejsce wyrastania korzeni), w których widoczne są zmiany chorobowe tkanek przewodzących oraz z nekrotycznych zmian na ogonkach liściowych, należy pobrać fragmenty o średnicy ok. 5 mm. Następnie pobrane fragmenty odkazić powierzchniowo (np. poprzez zanurzenie na 1 minutę w 2% roztworze NaOCl), przemyć sterylną wodą, pociąć sterylnym skalpelem na mniejsze kawałki i w aseptycznych warunkach wyłożyć na stałe podłoże do hodowli mikroorganizmów, np. PDA lub PLYA (PP 7/78 (1)). Tak zaszczipione podłoża inkubować w temperaturze pokojowej przez około 10-14 dni do momentu zaobserwowania wzrostu kolonii grzyba. Wyrosłe kultury należy przeszczepić na czyste podłoża, dedykowane do przeprowadzenia charakterystyki morfologicznej

grzyba *V. dahliae* umożliwiającej jego identyfikację (Termorshuizen i Walter, 2003). W przypadku wątpliwości, dla uzyskanych kolonii grzyba można przeprowadzić identyfikację na podstawie cech genetycznych. W tym celu należy wyizolować kwas nukleinowy grzyba, wykorzystując np. komercyjny zestaw GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx) i stosując się do zaleceń producenta dla grzybów strzępkowych lub metodę z wykorzystaniem odczynnika CTAB (Kump i Javornik 1996). Z uzyskanym DNA grzyba należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami specyficznymi do gatunku *V. dahliae* Df i Dr (Inderbitzin i in., 2013), a następnie produkty reakcji poddać rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1,5 % żelu agarozowym. Po rozdzielaniu żel barwi się w bromku etydyny, co umożliwia wizualizację produktów reakcji w świetle UV, przy czym produkt o wielkości 490 par zasad wskazuje na wykrycie *V. dahliae*. Alternatywnie, z uzyskanym DNA grzyba należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami uniwersalnymi dla grzybów ITS1 i ITS4 (White i in., 1990), a następnie odczytać sekwencję uzyskanego produktu i porównać ją z sekwencją referencyjną dla *V. dahliae* nr. AY555948, dostępną w bazie sekwencji GenBank.

Można także dokonać identyfikacji *V. dahliae* bezpośrednio w porażonym materiale roślinnym, z wyraźnymi objawami wertycyliozy, stosując do tego celu metodykę opracowaną do wykrywania i identyfikacji *V. dahliae* bezpośrednio w pędach chmielu (PM 7/78 (2)). Metoda ta bazuje na technice ilościowej PCR z sondami typu TaqMan, a do odczytania wyniku reakcji konieczne jest jej przeprowadzenie w termocyklerze z układem optycznym, np. CFX96™ (BioRad).

W przypadku dostarczonej do laboratorium próby gleby należy ją dokładnie wysuszyć i przetrzeć przez sito o średnicy oczek ok 1 - 2 mm, a następnie postępować według procedury zaproponowanej przez Harrisa i Yanga (1990), z wykorzystaniem podłoża półselektywnego Isaaca (1971). Przygotowane według procedury podłoże z naniesionym przesączem glebowym inkubuje się przez 4 tygodnie w temp. 18 - 22°C, a po tym czasie liczy się kielkujące mikrosklerocja grzyba *V. dahliae* pod mikroskopem świetlnym. Metoda ta umożliwia wykrycie propagul *V. dahliae* z czułością 0.1 jednostki na 1 gram gleby.

Literatura:

Harris, D. C., & Yang, J. (1990). Pre-planting prediction of strawberry wilt (*Verticillium dahliae*) risk as an aid in disease management. In Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases-1990. Vol. 1. (pp. 117-122). British Crop Protection Council.

Inderbitzin, P., Davis, R. M., Bostock, R. M., & Subbarao, K. V. (2013). Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assays. PLoS One, 8(6), e65990.

Isaac I, Fletcher P, Harrison JAC, (1971). Quantitative isolation of *Verticillium* spp. from soil and moribund potato haulm. Annals of Applied Biology 67, 177–83.

Kump, B., & Javornik, B. (1996). Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. Plant Science, 114(2), 149-158.

- Meszka B. (2013) Występowanie *Verticillium dahlia* Kleb. w uprawach truskawki w Polsce oraz możliwości ich ochrony przed Wertycyliozą. Monografie i rozprawy, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice 2013. ISBN 978-83-60573-66-2.
- OEPP/EPPO (2007) EPPO Standard PP 7/78 (1) *Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae* na chmielu. Biuletyn OEPP/EPPO 37, 528-535.
- OEPP/EPPO (2020) EPPO Standard PM 7/78 (2) *Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*. Biuletyn OEPP/EPPO 50, 462-476.
- Termorshuizen, A. J., & Walter, G. A. M. S. (2003). Morphology of *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus* on semi-selective media used for the detection of *V. dahliae* in soil. *Mycological Research*, 107(7), 822-830.
- Volossiuk, T., Robb, E. J., & Nazar, R. N. (1995). Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Applied and environmental microbiology*, 61(11), 3972-3976
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18 (1), 315-322.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

PDA = pożywka ziemniaczano-dekstrozowa

PLYA = agar śliwkowy z laktozą i ekstraktem z drożdży

Opracowanie: dr Monika Michalecka, e-mail: monika.michalecka@inhort.pl