

## **Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do oceny laboratoryjnej na obecność *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold (1879)**

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 albo-atrum* 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. albo-atrum* 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 przetrwalnikowej, która w obecności rośliny żywicielskiej infekuje 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. 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 czerwienie 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. albo-atrum*, rośliny należy poddać analizie laboratoryjnej.

#### 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 maticzniku, z którego pobrano rośliny do badania, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.
3. Próby roślin należy pobierać losowo z wyznaczonych sektorów, poruszając się liniowo w kształcie litery W. Próby powinny zawierać sadzonki maticzne oraz ukorzenione sadzonki rozłogowe.
4. 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](http://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"><li>• Imię i nazwisko</li><li>• Adres kontaktowy</li><li>• Telefon</li></ul>	

• 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. albo-atrum*

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, należy pobrać fragmenty o średnicy ok. 5 mm. Następnie pobrane fragmenty należy 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 (PM 7/78 (1)). Tak zaszczerpione podłoża należy inkubować w temperaturze pokojowej przez około 10-14 dni do momentu zaobserwowania wzrostu kolonii grzyba. Wyrosłe kultury należy przeszczepić na czyste podłoża i ocenić morfologię grzybni, w poszukiwaniu cech umożliwiających klasyfikację grzybów przynajmniej do rodzaju *Verticillium* (Smith, 1965, Inderbitzin et al., 2011). Cechy morfologiczne brane pod uwagę przy identyfikacji *V. albo-atrum*, tj. żółty pigment wytwarzany w strzępkach grzybni oraz struktury spoczynkowe, są jednak nietrwałe i mogą zanikać w warunkach hodowli *in vitro*, stąd konieczne jest zastosowanie metod umożliwiających identyfikację kultur 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. Z uzyskanym DNA grzyba należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami uniwersalnymi dla grzybów ITS1 i ITS 4 (White i in., 1990), a następnie odczytać sekwencję uzyskanego produktu i porównać ją z sekwencją referencyjną dla *V. albo-atrum* nr. AF364015, dostępną w bazie sekwencji GenBank. Identyfikację

poszczególnych gatunków grzybów z rodzaju *Verticillium* można także prowadzić w oparciu o region DNA czynnika elongacyjnego 1 alfa (EF1 $\alpha$ ; Inderbitzin et al., 2011).

W przypadku diagnozowania obecności *V. albo-atrum* nie ma obecnie dostępnych metod pozwalających na skuteczne wykrywanie tego patogena w glebie. W odróżnieniu od innego grzyba porażającego truskawkę i poziomkę: *V. dahliae*, *V. albo-atrum* nie wytwarza mikrosklerocjów jako struktur przetrwalnych, a zamiast nich – grzybnię spoczynkową.

Do niedawna do gatunku *V. albo-atrum* błędnie włączane były gatunki *V. alfalfae* oraz *V. nonalfalfae*, jednak bardziej zaawansowane badania taksonomiczne pozwoliły na wydzielenie tych trzech wymienionych gatunków jako odrębnych jednostek taksonomicznych (Inderbitzin i Subbarao, 2014). Z dostępnych danych literaturowych wynika, że gatunek *V. alfalfa* jest chorobotwórczy wyłącznie dla lucerny (alfalfa) (PM 7/78 (2)).

#### Literatura:

- Carder, J. H. (1994). Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification*, 91-97.
- Harris, D. C., & Yang, J. (1990). Pre-planting prediction of strawberry wilt (*Verticillium albo-atrum*) 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., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS one*, 6(12), e28341
- Inderbitzin, P., & Subbarao, K. V. (2014). *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes *Verticillium* wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*, 104(6), 564-574.
- 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.
- OEPP/EPPO (2007) EPPO Standard PM 7/78 (1) *Verticillium albo-atrum* i *V. albo-atrum* 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.
- Smith, H. C. (1965). The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8 (3), 450-478.
- Termorshuizen, A. J., & Walter, G. A. M. S. (2003). Morphology of *Verticillium albo-atrum* and *V. tricorpus* on semi-selective media used for the detection of *V. albo-atrum* 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](mailto:monika.michalecka@inhort.pl)