

WYKORZYSTANIE PUŁAPEK Z ROŚLIN RÓŻANECZNIKA DO MONITOROWANIA WYSTĘPOWANIA *PHYTOPHTHORA* SPP. W WODZIE

Autorzy: Prof. dr hab. Leszek B. Orlikowski
Mgr Aleksandra Trzewik
Mgr Magdalena Ptaszek

Spis treści:

1. Wstęp
2. Cel zadania
3. Metoda pułapkowa
4. Izolacja mikroorganizmów z wody
5. Identyfikacja
6. Gatunki *Phytophthora* wykryte w wodzie
7. Zagrożenie roślin w szkółkach przez gatunki występujące w wodzie
8. Literatura

Opracowanie redakcyjne: mgr Aleksandra Malicka

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.8:**
„Monitorowanie występowania *Phytophthora* spp., diagnostyka i możliwości ograniczania strat powodowanych przez tę grupę patogenów”

Programu Wieloletniego:
„Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodnictwa w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodnictwa oraz zachowania bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów”, finansowanego przez MRiRW

Skierniewice 2013

1. WSTĘP

Detekcja mikroorganizmów w wodzie i glebie była od kilkadziesiąt lat przedmiotem zainteresowania naukowców zajmujących się mikroorganizmami glebowymi. Głównym celem tych badań było stwierdzenie, czy w środowisku uprawy roślin występują organizmy, które mogą zagrozić ich bezpieczeństwu i spowodować straty związane często z masowym ich wypadaniem. Wśród tych mikroorganizmów do najgroźniejszych należą gatunki rodzaju *Phytophthora* (Orlikowski i in. 2012a) określone przez Zentmyera i Thorna (1967) jako czynniki destrukcyjne roślin (*Phytophthora* = plant destroyer) powodujące nekrozę korzeni, podstawy pędu oraz zgniliznę owoców (Erwin i Ribeiro 1996). Obok powszechnie znanego gatunku *P. infestans*, sprawcy zarazy ziemniaka i pomidorów opisanego w 1876 roku, dotychczas wykryto i zidentyfikowano około 150 patogenów tego rodzaju.

Badania prowadzone w Polsce w ostatnich latach wskazują na bardzo częstą izolację omawianego rodzaju zarówno z chorych roślin, gleby jak i wody. Związane jest to m.in. ze wzrostem międzynarodowego obrotu materiałem roślinnym (Brasier 2008), zmianą technologii uprawy roślin, głównie z ich produkcją w pojemnikach i systematycznym podlewaniem i nawożeniem (Orlikowski 2000). Duże ilości wody, niezbędne do nawadniania upraw, powodują wzrost kosztów produkcji, a ograniczenie możliwości korzystania z wód głębinowych powoduje, że szkółkarze korzystają z jej źródeł wykorzystując lokalne ciekły czy też wody stojące. Przy pobieraniu skażonej wody do podlewania roślin może dochodzić do wnoszenia określonego gatunku patogena do uprawy (Orlikowski 2006).

Pierwsze dane o występowaniu tego rodzaju w wodzie dotyczą roku 1921 roku, gdy Bewley i Buddin wykryli *P. cryptogea* w zbiorniku wodnym. Okres ostatniego 30-lecia to wzrost zainteresowania wodą jako jednym z istotnych źródeł gatunków *Phytophthora* zagrażających uprawie roślin. Podsumowaniem tych badań może być stwierdzenie Honga i Moormana (2005), iż zakażona woda jest głównym, jeśli nie jedynym źródłem *Phytophthora* spp. w szkółkach, sadach i warzywnikach. Ponadto woda jest niezbędnym czynnikiem w procesie formowania się zarodni pływkowych, z których uwalniane są zoospory, będące głównymi jednostkami infekcyjnymi. Bardzo istotne są również badania nad detekcją *Phytophthora* w ciekach wodnych, gdyż, jak stwierdzili Miligroom i Peever (2003), woda jest głównym źródłem rozprzestrzeniania *Phytophthora* w określonym regionie, kraju, a nawet na kontynencie. Potwierdzeniem tego jest bardzo szybkie rozprzestrzenienie się *P. alni*, przyczyny masowego wypadania olszy nad brzegami cieków i zbiorników wodnych oraz

w lasach. Gatunek ten stwierdzono po raz pierwszy w Wielkiej Brytanii (Gibbs i in. 1999) i w ciągu kilku lat rozprzestrzenił się on w Europie od Grecji aż do Szwecji (Cech, 2004).

W Polsce, badania nad rolą wody jako źródła inokulum *Phytophthora* spp. zapoczątkował Orlikowski (2006), a ich celem było określenie przyczyny zamierania wierzchołków roślin ozdobnych w szkółkach. Wśród 21 gatunków wykrytych w Polsce, do najgroźniejszych należą *P. alni*, *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae* var. *nicotianae*, *P. plurivora* i *P. palmivora*. Roślinami żywicielskimi dla tych patogenów są warzywa, drzewa owocowe, lasy i uprawy roślin ozdobnych (Bielenin i Borecki 1970, Orlikowski i in. 2011, 2012a). Straty, z powodu pojawienia się jednego z tych patogenów, mogą dochodzić nawet do 80% (Orlikowski i Szkuta, 2008).

Izolację *Phytophthora* z wody prowadzi się głównie metodą pułapkową. Wybór rośliny pułpkowej uzależniony jest od jej dostępności na określonym terenie oraz potrzeby wykrycia określonego gatunku *Phytophthora*. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że mogą to być nasiona, siewki, części nadziemne roślin, w tym owoce. Przez wiele lat jako pułapki do wykrywania *Phytophthora* z gleby stosowane były niedojrzałe owoce, siewki łubinu, a także liście różnych roślin. Umożliwiały one detekcję patogenów tego rodzaju wówczas, gdy liczebność populacji patogena była na tyle wysoka, że zoospory mogły skolonizować tkanki, a na ich powierzchni pojawiały się nekrotyczne plamy.

2. CEL ZADANIA

Pierwsze gatunki *Phytophthora* spp., wykryte w sadach i szklarniach w Polsce to *P. cactorum* i *P. cryptogea* (Bielenin i Borecki 1970, Orlikowski 1978). W ciągu następnych 30 lat stwierdzono również *P. nicotianae* var. *nicotianae* (Orlikowski 1981). Począwszy od ostatniej dekady XX wieku w polskich szkółkach roślin ozdobnych i leśnych, a także w lasach i w wodzie stwierdzono 21 gatunków omawianego rodzaju. Większość z nich to bardzo groźne patogeny roślin. Wśród nich *P. cinnamomi*, gatunek stwierdzony po raz pierwszy w klimacie tropikalnym na Sumatrze w 1922 roku, notowano często w szkółkach roślin oraz w wodzie (Orlikowski i in. 2012a). Świadczy to o bardzo dużych możliwościach przystosowawczych tego patogena, a także innych gatunków rodzaju *Phytophthora*, do naszych warunków klimatycznych.

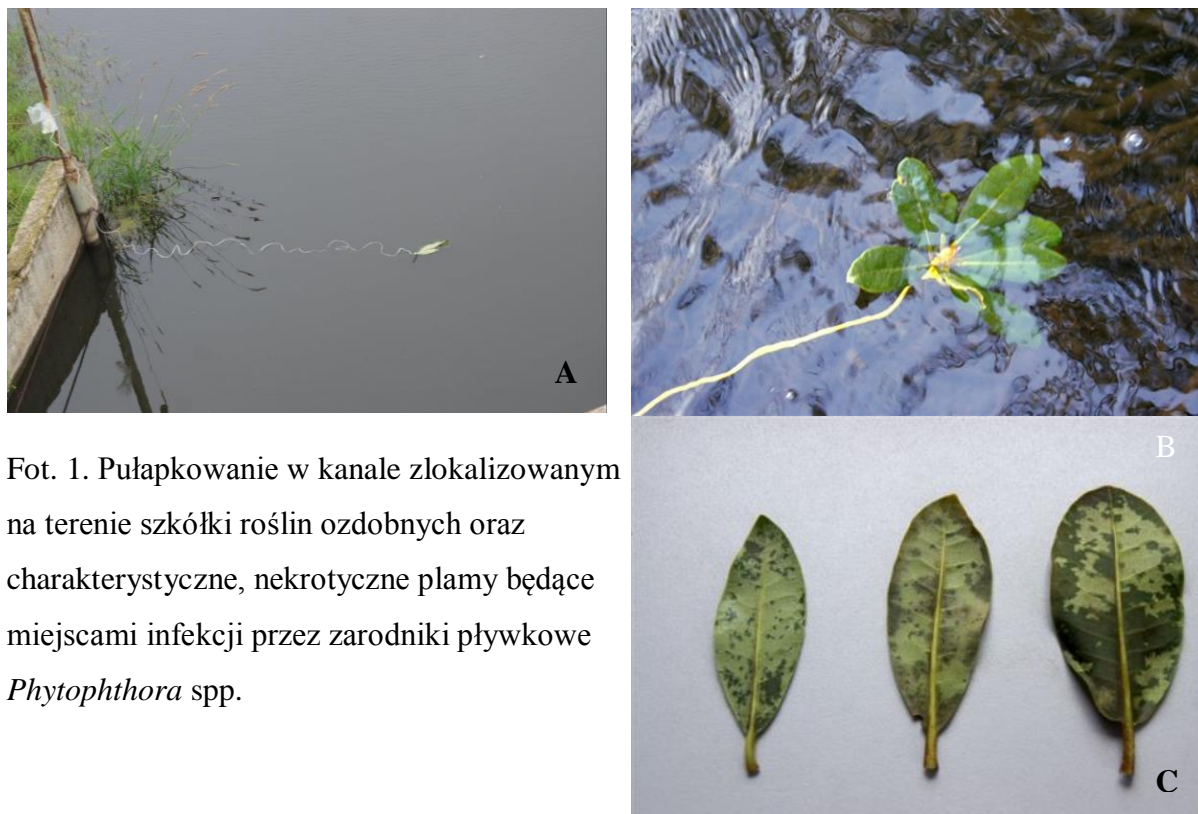
Straty związane z pojawieniem się *Phytophthora* spp. wahają się od kilku do kilkudziesięciu procent (Orlikowski i in. 2012a). Pierwsze badania Orlikowskiego (2006) wskazały na możliwości wnoszenia *P. citricola* z wodą w trakcie podlewania roślin. Dalsze prace, prowadzone przez zespół pracowników naukowych, wykazały możliwość zawlekania

z wodą do szkółki innych gatunków tego rodzaju (Orlikowski i in. 2008; 2010, Orlikowski i Ptaszek 2010).

Biorąc pod uwagę bardzo dużą szkodliwość gatunków rodzaju *Phytophthora* i corocznie wzrastające zagrożenie roślin przez te patogeny, jak również konieczność ograniczenia ich rozprzestrzeniania się, podjęto badania nad opracowaniem skutecznej metody szybkiej detekcji *Phytophthora* w wodzie, która będzie powszechnie dostępna przez cały rok oraz prosta w stosowaniu. Detekcja organizmów chorobotwórczych w wodzie wykorzystywanej do nawadniania upraw będzie wskaźnikiem do podjęcia odpowiednich kroków w celu zapobiegania masowemu rozprzestrzenianiu się chorób roślin w szkółkach.

3. METODA PUŁAPKOWA

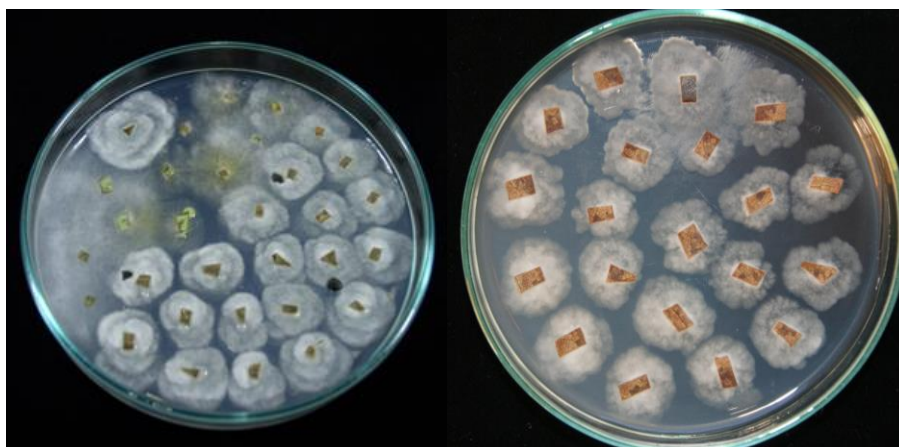
Do detekcji wykorzystuje się jako pułapki wierzchołkowe liście różanecznika. Pędy wierzchołkowe, zawierające co najmniej 8 liści, ścina się z roślin uprawianych w pojemnikach, wolnych od czynników chorobotwórczych oraz nie traktowanych fungicydami. Po ścięciu pędy pakuje się do worków foliowych i przewozi w miejsce pułapkowania. Następnie pędy różanecznika przewiązuje się sznurkiem i wrzuca do wody w odległości około 1 m od brzegu rzeki bądź zbiornika wodnego tak, aby blaszki liściowe w całości zanurzone były w wodzie (Fot. 1A i 1B). W zależności od terminu pułapkowania liście przetrzymuje się w wodzie od 3 do 5 dni. Po tym okresie wyjmuje się je z wody i wkłada do worków foliowych. Jeżeli w danym źródle wody występowały gatunki rodzaju *Phytophthora*, na blaszkach liściowych różanecznika można zaobserwować charakterystyczne, ciemnozielone plamy będące miejscami infekcji tkanki przez zoospory (Fot. 1C). Próbkę etykietuje się z podaniem daty i lokalizacji pułapkowania i przewozi do laboratorium, gdzie liście są płukane pod wodą bieżącą, następnie w wodzie destylowanej i po osuszeniu określa się liczbę nekrotycznych plam na blaszkach liściowych jako miarę liczebności *Phytophthora* w danym zbiorniku czy cieku wodnym. Następnie pułapki liściowe poddaje się analizie mikologicznej.



Fot. 1. Pułapkowanie w kanale zlokalizowanym na terenie szkółki roślin ozdobnych oraz charakterystyczne, nekrotyczne plamy będące miejscami infekcji przez zarodniki pływające *Phytophthora* spp.

4. IZOLACJA MIKROORGANIZMÓW

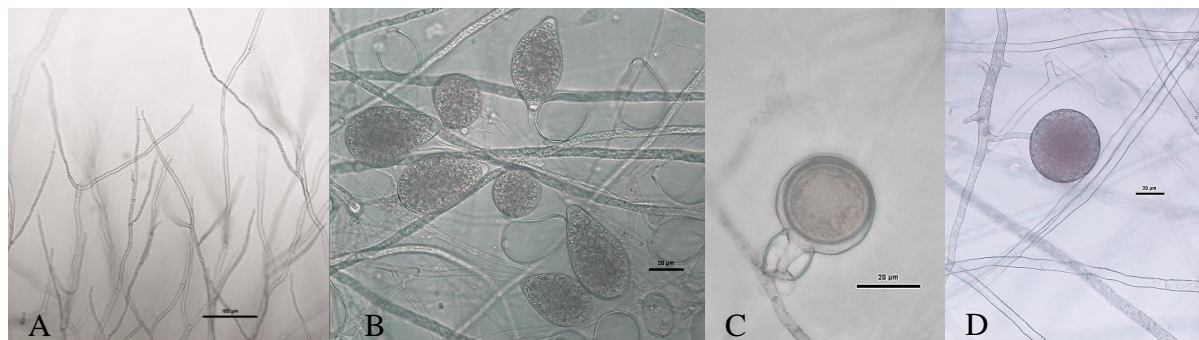
W celu izolacji mikroorganizmów, liście pułapkowe umieszcza się w komorze z laminarnym przepływem powietrza i sterylizuje nad płomieniem palnika. Z nekrotycznych plam wycina się skalpelem ok. 3 mm eksplantaty na pograniczu zdrowej i chorej tkanki i umieszcza w szalkach Petriego o średnicy 90 mm z pożywką PDA (Potato Dextrose Agar) lub pożywką selektywną PARP (Jeffers i Martin 1986). Na każdą szalkę Petriego wyklada się zazwyczaj po 20 eksplantatów w 4 powtórzeniach. Szalki inkubuje się w cieplarni w 25°C. W ciągu 24-72 godzin inkubacji szalki przegląda się bardzo dokładnie pod mikroskopem świetlnym, oceniając strzępki wyrastające wokół wyłożonych inokulów (Fot. 2). W przypadku stwierdzenia obecności strzępek *Phytophthora* spp. inokula patogena przeszczepia się na świeżą pożywkę PDA. Po uzyskaniu czystych kultur izolaty reprezentacyjne poddaje się identyfikacji na podstawie ich cech morfologicznych oraz z wykorzystaniem technik biologii molekularnej.



Fot. 2. Kultury *Phytophthora* wyrastające z wyłożonych eksplantatów pobranych z liści pułapkowych

5. IDENTYFIKACJA

Identyfikację wyizolowanych kultur prowadzi się w oparciu o ich cechy morfologiczne t.j. wygląd i charakter strzępek na podłożach agarowych (Fot. 3A), sposób tworzenia się (prolifracja wewnętrzna bądź zewnętrzna) oraz typ zarodni pływkowych (*papillate*, *semipapillate* i *nonpapillate*) (Fot. 3B), obecność organów rozmnażania płciowego, cechy morfologiczne oogoniów, anteridiów (parageniczne, amfigeniczne) i oospor (sposób ułożenia w oogonium i grubość ściany) (Fot. 3C) oraz obecność lub brak chlamydospor (Fot. 4D).



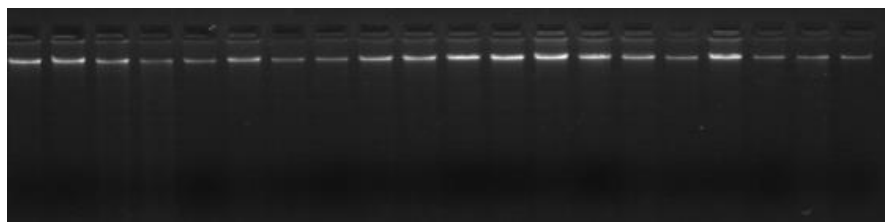
Fot. 3 A-D. Cechy diagnostyczne wykorzystywane przy identyfikacji morfologicznej *Phytophthora* spp.

Uzyskane wyniki potwierdza się za pomocą technik biologii molekularnej. Genomowe DNA izoluje się z czystych kultur patogena stosując metodę opisaną przez Wiejacha i in. (2002) (Fot. 4A) i przeprowadza się reakcję PCR ze starterami gatunkowo-specyficznymi (Tab. 1, Fot. 4B), trawienie enzymami restrykcyjnymi fragmentu ITS (Internal Transcribed Spacer) (Fot. 4C, D) oraz jego sekwencjonowanie. Warunki reakcji ze starterami gatunkowo-specyficznymi (profil termiczny i skład mieszaniny reakcyjnej) zostały dobrane empirycznie,

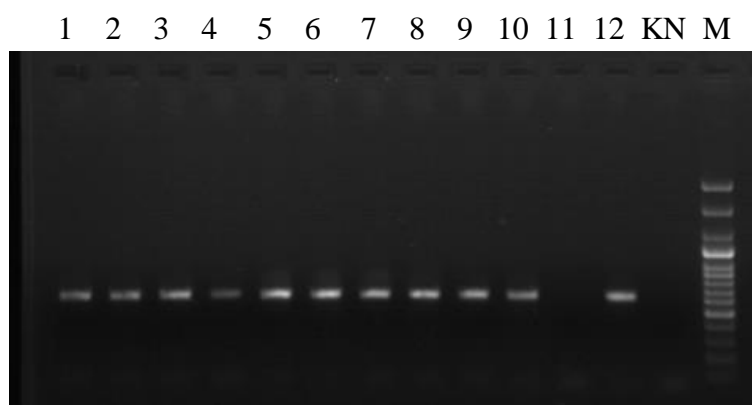
a standardowy skład mieszaniny reakcyjnej, o objętości końcowej 15 µl wynosi: 15ng DNA, 0,3 U polimerazy *Taq* (Fermentas), 0,4 µM każdego startera, 50 µM każdego dNTP oraz 1,5 mM Mg₂Cl. Produkty PCR wybarwia się bromkiem etydyny i rozdziela na 1,4% żelach agarozowych przy napięciu 4 V/cm. W przypadku gatunków *P. humicola* i *P. gonapodyides* stosuje się trawienie powielonego fragmentu ITS (Internal Transcribed Spacer) enzymami restrykcyjnymi *RsaI*, *AluI* oraz *MspI* (Fermentas). Skład mieszaniny reakcyjnej do namnażania regionu ITS, o końcowej objętości 25 µl wynosi: 25ng DNA, 0,5 U polimerazy *Taq* (Fermentas), 0,5 µM starterów ITS4/ITS6, 50 µM każdego dNTP oraz 1,5 mM Mg₂Cl, natomiast skład mieszaniny reakcyjnej dla enzymów *AluI* bądź *MspI* (Fermentas) zawiera: 1 x stężony bufor Y⁺ Tango, 15 µl produktu reakcji PCR ze starterami ITS4/ITS6 oraz 4 U enzymu, a dla *RsaI* (Fermentas) wynosi: 1 x stężony bufor Tango, 15 µl produktu reakcji PCR ze starterami ITS4/ITS6 oraz 6 U enzymu. Produkty trawienia wybarwia się bromkiem etydyny i rozdziela się na 2% żelach agarozowych przy napięciu 4 V/cm.

Tabela 1. Startery gatunkowo-specyficzne wykorzystywane w identyfikacji *Phytophthora* spp.

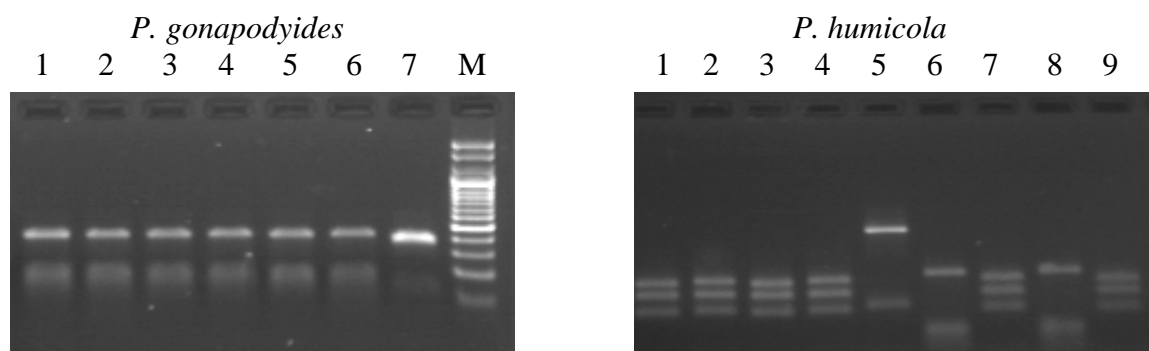
Wykrywany gatunek patogena	Pary starterów	Sekwencja nukleotydów starterów 5' – 3'	Źródło
<i>P. cactorum</i>	ADF1	tac tgt ggg gac gaa agt cct	Boersma i in. 2000
	ADR1	ccg att caa aag cca agc aac t	
<i>P. cambivora</i>	DC4	tta gtt ggg ggc tag tcc c	Boersma i in. 2000
	DC5	cgc cga ctg gcc aca cag	
<i>P. cinnamomi</i>	DC9	aac tga gct agt agc ctc tc	Boersma i in. 2000
	DC5	cgc cga ctg gcc aca cag	
<i>P. cryptogea</i>	CRYF2	cgg ttt tgc gct ggc tgg g	Boersma i in. 2000
	CRYR2	cag ctt gcg cca gaa cag ac	
<i>P. citrophthora</i>	Ctph1	gtc gac gtc ctg ctt ggc act ctg	Èrsek i in. 1994
	Ctph2	cgg tgc tcc gcg act gtt gtc cac	
<i>P. lacustris</i>	Ph1-Fw	cta taa ttc ggg ggc ttg ctc	Nechwatal i Mendgen 2006
	Ph1 -Rew	gtt cat acc gct gca gca gg	
<i>P. plurivora</i>	CITR1	tct tgc ttt ttt tgc gag cc	Schubert i in. 1999
	CITR 2	cgc acc gag gtg cac aca aa	
<i>Phytophthora</i> spp.	ITS4	ttc tcc gct tat tga tat gc	Cooke i Duncan 1997
	ITS6	gaa ggt gaa gtc gta aca agg	



Fot. 4A. Obraz elektroforetyczny genomowego DNA wyizolowanego z czystych kultur gatunków rodzaju *Phytophthora*



Fot. 4B. Rozdział elektroforetyczny produktów uzyskanych w reakcji PCR przy użyciu starterów Ph1-Fw/Ph1-Rew dla *P. lacustris*. Ścieżka 1 – izolat referencyjny P 245 *P. lacustris*, 2-10 i 12 izolaty *P. lacustris* otrzymane z liści pułpkowych różanecznika, 11: brak *P. lacustris* w próbie, KN: kontrola negatywna, M: 3000bp Ladder (GenoPlast)



Fot. 4C-D. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem *Msp*I. C: *P. gonapodyides*: ścieżka 1- izolat referencyjny *P. gonapodyides*, 2-6- izolaty *P. gonapodyides* otrzymane z liści pułpkowych różanecznika. D: *P. humicola*: ścieżka 1-izolat referencyjny *P. humicola*, 2-4, 7 i 9- izolaty *P. humicola* otrzymane z liści pułpkowych różanecznika, 5,6 i 8-brak *P. humicola* w próbie

6. GATUNKI *PHYTOPHTHORA* WYKRYTE W WODZIE

Zastosowanie liści różanecznika jako pułapek umożliwiło wykrycie 9 gatunków *Phytophthora* w badanych źródłach wody (Tab. 2). Największą różnorodność gatunkową odnotowano w latach 2010 oraz 2012. Corocznie izolowano z wody *P. lacustris*, *P. gonapodyides*, *P. citrophthora* i *P. plurivora*. Dwa ostatnie gatunki są znanymi patogenami roślin ozdobnych.

Tabela 2. Gatunki *Phytophthora* wyizolowane z różnych źródeł wody przy użyciu liści pułapkowych różanecznika

Gatunki <i>Phytophthora</i>	Lata pułapkowania			
	2010	2011	2012	2013
<i>P. cactorum</i>			+	+
<i>P. cambivora</i>	+			
<i>P. cinnamomi</i>	+			
<i>P. citrophthora</i>	+	+	+	+
<i>P. cryptogea</i>	+		+	
<i>P. gonapodyides</i>	+	+	+	+
<i>P. humicola</i>		+	+	
<i>P. lacustris</i>	+	+	+	+
<i>P. plurivora</i>	+	+	+	+

Ponadto w roku 2011 prowadzono monitorowanie występowania *Phytophthora* w rzece Kurówce w zależności od umiejscowienia pułapek z liści różanecznika w lustrze wody. Uzyskane dane wskazują na występowanie w rzece *P. citrophthora* i *P. lacustris*. Obu gatunków nie stwierdzono, gdy pułapki zastawiono w rzece przed szkółką (poza dnem rzeki). Kilkakrotnie więcej izolatów *Phytophthora* stwierdzono na liściach pułapkowych, zastawionych w rzece na terenie szkółki, aniżeli poza nią (Tab. 3).

Tabela 3. Detekcja *Phytophthora* spp. z rzeki w zależności od umiejscowienia pułapek i głębokości ich zanurzenia

Umiejscowienie pułapek	Umiejscowienie pułapek w lustrze wody	Liczba uzyskanych izolatów	Wykryte gatunki
Kurówka przed szkółką	powierzchnia	2	-
	środek	-	-
	dno	2	<i>P. lacustris</i>
Kurówka pośrodku szkółki	powierzchnia	9	<i>P. citrophthora</i>
	środek	7	<i>P. lacustris</i>
	dno	7	<i>P. lacustris</i>
Kurówka za szkółką	powierzchnia	1	<i>P. lacustris</i>
	środek	2	<i>P. citrophthora</i>
	dno	0	<i>P. lacustris</i>

Badania nad występowaniem *Phytophthora* w różnych źródłach wody za pomocą metody pułapkowej w 2012 roku wskazują na większą różnorodność gatunkową w stawach usytuowanych na terenie szkółek roślin ozdobnych aniżeli w rzekach. Związane jest to zapewne z bardzo szerokim zakresem roślin żywicielskich dla omawianego rodzaju. Niezależnie od kwartału detekcji, w badanych źródłach wody stwierdzano *P. lacustris* i *P. gonapodyides* (Tab. 4).

Tabela 4. Występowanie gatunków *Phytophthora* w wodzie z zależności od kwartału pułapkowania i źródła wody roku 2012

Źródła wody	Kwartały			
	I	II	III	IV
Rzeki	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i>
Staw w szkółce	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i> <i>P. humicola</i> <i>P. citrophthora</i> <i>P. plurivora</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i> <i>P. humicola</i> <i>P. plurivora</i> <i>P. cactorum</i> <i>P. cryptogea</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i>
Kanał w szkółce	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. humicola</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. plurivora</i> <i>P. humicola</i>	<i>P. lacustris</i> <i>P. gonapodyides</i>

7. ZAGROŻENIE ROŚLIN PRZEZ GATUNKI *PHYTOPHTHORA*

Na obecnym etapie badań nad występowaniem i szkodliwością *Phytophthora* spp. w Polsce możemy stwierdzić, że w wielu szkółkach roślin ozdobnych, korzystających z innych źródeł wody aniżeli studnie głębinowe, gatunki tego rodzaju mogą być wnoszone do

upraw w trakcie podlewania i nawożenia, przy wykorzystywaniu wody z lokalnych cieków i zbiorników wodnych, w tym usytuowanych w szkółkach. O szkodliwości *P. plurivora* (dawna nazwa gatunkowa *P. citricola*), gatunku wnoszonego do szkółki z wodą, świadczą wyniki Orlikowskiego (2006). Stwierdzono wówczas, że powodem zamierania wierzchołkowych pędów żywotnika, żółknięcia pędów bukszpanu i plamistości liści różanecznika, jest *P. plurivora*, który izolowano z 3 zbiorników z których pobierano wodę do zraszania roślin, usytuowanych poniżej poziomu szkółki.

W celu potwierdzenia zagrożenia jakie niesie ze sobą obecność w wodzie gatunków *Phytophthora*, izolaty uzyskane z różnych źródeł wody wykorzystano do przeprowadzenia testów patogeniczności, w których organy badanych roślin inokulowano krążkami pożywki przerośniętymi strzępkami *Phytophthora* spp. (Orlikowski i in. 2012b)

W doświadczeniach z cyprysikiem Lawsons, najwolniejsze tempo rozwoju nekrozy obserwowano na pędach zainokulowanych kulturami *P. cryptogea* i *P. plurivora* z kanału w szkółce D (Tab. 5, 6). Najszybszym kolonizatorem pędów cyprysika okazał się izolat *P. plurivora* z rzeki Okrzeszy i kanału w szkółce C (Tab. 5), natomiast w przypadku *P. cryptogea* kultury izolowane z rośliny gospodarza oraz stawu w szkółce C (Tab. 6).

Tabela 5. Kolonizacja pędów cyprysika Lawsons odmiana Ellwoodii przez izolaty *P. plurivora* z różnych źródeł wody

Źródło izolatów <i>P. plurivora</i>	Długość nekrozy [mm] po dniach od inokulacji		
	7	13	20
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	13,4 b	17,4 c	20,4 bc
Kanał w szkółce C	12,0 b	17,6 c	23,4 cd
Kanał w szkółce D	7,9 a	11,5 a	16,0 a
Rzeka Ner	12,2 b	14,3 b	17,4 ab
Rzeka Okrzesza	14,4 b	20,4 d	24,2 d

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) wg testu Duncana

Tabela 6. Kolonizacja pędów cyprysika Lawsons odmiana Ellwoodii przez izolaty *P. cryptogea* z różnych źródeł wody

Źródło izolatów <i>P. cryptogea</i>	Długość nekrozy [mm] po dniach od inokulacji		
	7	13	20
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	13,6 c	21,0 c	24,5 b
Kanał w szkółce D	8,6 a	11,5 a	13,8 a
Staw w szkółce C	13,9 c	18,0 b	21,4 b
Staw w szkółce D	9,2 ab	12,6 a	15,3 a
Rzeka Ner	10,9 b	13,3 a	15,0 a

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) wg testu Duncana

W innych doświadczeniach z różanecznikiem szybszy rozwój nekrozy obserwowano, gdy blaszki liściowe inokulowano izolatami *P. citrophthora* aniżeli *P. cactorum*. Najbardziej patogeniczny okazał się izolat *P. citrophthora* z kanału w szkółce C (Tab. 7). W testach z wierzbą nie stwierdzono istotnych różnic w szybkości rozwoju zgnilizny na zainokulowanych pędach roślin (Tab. 8). W celu spełnienia postulatów Kocha z tkanek z objawami chorobowymi reizolowano patogena i ponownie potwierdzano jego przynależność gatunkową za pomocą techniki łańcuchowej reakcji polimerazy ze starterami gatunkowo-specyficznymi.

Tabela 7. Kolonizacja liści różanecznika przez izolaty *P. citrophthora* oraz *P. cactorum* z różnych źródeł wody

Źródło izolatów <i>Phytophthora</i> spp.	Średnica nekrozy [mm] po dniach inokulacji	
	4	6
<i>P. citrophthora</i>		
Kanał C	11,7 c	19,0 c
Kanał D	9,0 b	16,3 bc
Rzeka Skierniewka	8,5 b	13,0 ab
<i>P. cactorum</i>		
Staw Radziwiłłów	7,3 ab	14,0 ab
Rzeka Ner	6,1 a	10,6 a
Rzeka Zwierzyniec	7,1 ab	11,1 a

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) wg testu Duncana

Tabela 8. Kolonizacja pędów wierzby (*Salix alba*) przez izolaty *P. lacustris* z różnych źródeł wody i osadów dennych

Źródło izolatów <i>P. lacustris</i>	Średnica nekrozy [mm] po dniach inokulacji	
	4	6
Rzeki		
Okrzesza	10,1 a	32,6 b
Zwierzyniec	15,8 b	35,3 b
Staw w szkółce		
Staw w szkółce Z	20,6 b	34,6 b
Osady dennie		
Rzeka Skierniewka	16,6 b	35,6 b
Staw w szkółce C	19,6 b	26,0 a
Staw w szkółce D	19,5 b	31,8 b

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) wg testu Duncana

Przedstawione wyniki wskazują, że izolaty *Phytophthora* otrzymane z wody kolonizują tkanki roślin w podobnym stopniu, jak z roślin żywicielskich. Pozwala to na stwierdzenie, że występowanie patogenów rodzaju *Phytophthora* w wodzie stwarza realne zagrożenie dla roślin zarówno w środowisku uprawowym, jak i naturalnym. Z tego powodu systematyczne monitorowanie źródeł wody pod kątem występowania w nich *Phytophthora* spp. jest bardzo ważne w integrowanej ochronie roślin przed chorobami, umożliwiające wykrycie czynnika chorobotwórczego zanim zostanie on zawleczony do nasadzeń.

8. LITERATURA

- Bewley F.A., Buddin W. 1921. On the fungus flora of glasshouse water supplies in relation to plant diseases. *Ann. Appl. Biol.* 8: 10-19.
- Bielenin A., Borecki Z. 1970. Zgnilizna pierścieniowa podstawy pnia drzew owocowych powodowana przez grzyb *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. *Acta Agrobot.* 23: 353-366.
- Boersma J.G., Cooke D.E.L., Sivasithamparam K. 2000. A survey of wildflower farms in the south-west of Western Australia for *Phytophthora* spp. associated with root rots. *Australian J. Exper. Agricult.* 40: 1011-1019.
- Brasier C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol.* 57: 792-808.
- Cech Th. L. 2004. Development and spread of the *Phytophthora* disease of alder in Austria.. Materials of the 3rd IUFRO Working Party “*Phytophthora* in forests and natural ecosystems”, Freising, Germany, 2004.09.11-17, p. 31.
- Cooke D.E.L., Duncan J.M., 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycol. Res.* 101(6): 667-677.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS, St. Paul, Minnesota, 562 pp.
- Èrsek T., Schoelz J.E., English J.T. 1994. PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2616-2621
- Gibbs J.N., Lipscombe M.A., Peace A.J. 1999. The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *Europ. J. of Forest Pathol.* 29. 39-50.

- Hong C.X., Moorman G.W. 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critic. Rev. in Plant Sci.* 24: 189-208.
- Jeffers S.N., Martin S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70: 1038-1043.
- Milgroom M.G., Peever T.L. 2003. Population biology of plant pathogens. *Plant Disease* 87: 608-617.
- Nechwatal J., Mendgen K. 2006. Widespread detection of *Phytophthora* taxon *Salixsoil* in the littoral zone of Lake Constance, Germany. *Eur. J Plant Pathol* 114: 261-264.
- Orlikowski L.B. 1978. The occurrence of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. et Laff. in gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) grownig site. *Bull. Pol. Acad. Sci, Biol. Sci.* 7: 495-498.
- Orlikowski L.B. 1981. Występowanie i zwalczanie fytoftorazy (*Phytophthora nicotianae* B. de Haan var. *nicotianae*) na syningii. *Prace Inst. Sadownictwa, ser. B,* 6: 127-135.
- Orlikowski L.B. 2000. Najgroźniejsze patogeny w szkółkach roślin ozdobnych. *Sylwan* 4: 155-159.
- Orlikowski L.B. 2006. Relationship between source of water used for plant sprinkling and occurrence of shoot rot and tip blight in container ornamental plants. *J. Plant Prot. Res.* 46: 163-168.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M. 2010. Narastające problemy chorobowe w produkcji pojemnikowej roślin iglastych. *Post. w Ochr. Roślin/Progr. in Plant Prot.* 50: 678-685.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2008. Współzależność pomiędzy źródłem wody i porą roku, a występowaniem *Phytophthora* spp. w środowisku. *Post. w Ochr. Roślin/Progr. in Plant Prot.* 48: 246-251.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011. Occurrence of *Phytophthora* species in rivers, canals and water reservoirs in relation to its location, seasonal analysis and fungicidal residues. *Ecolog. Chemistry and Engineering* 17: 52-60.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T., Szkuta G., Meszka. M. Skrzypczak Cz. 2012a. Zagrożenie upraw ogrodnich przez gatunki *Phytophthora*. *Post. w Ochr. Roślin/Progr. in Plant Prot.* 52: 92-100.
- Orlikowski L.B., Szkuta G., 2008. Zagrożenie szkółek pojemnikowych roślin ozdobnych przez *Phytophthora* spp. w minionych 15-leciu. *Sylwan* 152: 44-50.
- Orlikowski L.B., Trzewik A., Ptaszek M., Tułacz D. 2012.b Woda źródłem gatunków *Phytophthora* spp. oraz zagrożenie wynikające z ich występowania dla upraw. *Post. w Ochr. Roślin/Progr. in Plant Prot.* 52: 646-650.

- Schubert R., Bahnweg G., Nechwatal J., Jung T., Cooke D.E.L., Duncan J.M., Müller-Starck G., Langebartels H., Sandermann H.Jr., Oßwald W. 1999. Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *Eur. J. For. Path.* 29: 169-188.
- Vegh I., Le Berre A. 1982. Etude experimental de la sensibilite des queques cultivars de bruyeres et de coniferes d'ornament vis-a-vis du *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Phytopathol. Z.* 103: 301-305.
- Wiejacha K., Szkuta G., Orlikowska T. 2002. Optimization of DNA isolation procedure as the first step in identification of *Phytophthora* species. *Bull. Polish Acad. Sci.* 50: 165-171.
- Zentmyer G.A., Thorn W.A. 1967. Hosts of *Phytophthora cinnamomi*. *Avocado Society Yearbook*, Vol. 51: 10.