

Metodyka pobierania próbek materiału szkółkarskiego i wody do badań laboratoryjnych na obecność *Phytophthora cactorum*

Rośliny testowane: **Poziomka – *Fragaria L.*,**
Truskawka – *Fragaria × ananassa D.*

Termin pobierania próbek:

Materiał roślinny powinien być uznany za wolny od *Phytophthora cactorum* na podstawie wyników oceny wizualnej. Dopuszczalny próg tolerancji w przypadku certyfikowanego materiału roślinnego wynosi 0% roślin wykazujących objawy chorobowe w danej partii ocenianego materiału [Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2019/2072 z dnia 28 listopada 2019 r.].

Próby do badań na obecność *Phytophthora cactorum* należy pobierać wiosną (V-VI) lub jesienią (IX-X) przed nastaniem długotrwałych wysokich lub niskich temperatur powietrza.

Wybór tkanki/części rośliny

P. cactorum może powodować zgniliznę korony truskawki i skórzastą zgniliznę owoców. Pierwszymi widocznymi objawami choroby są niebiesko-zielone przebarwienia liści i czerwienienie ogonków liściowych. Najmłodsze liście zaczynają więdnąć. Intensywne brązowienie i ostateczny rozpad systemu naczyniowego korony truskawki jest charakterystyczny dla choroby. Objawy często pojawiają się najpierw w górnej części korony, a następnie rozprzestrzeniają się bazypetalnie. W celu identyfikacji sprawcy choroby stosuje się metody klasyczne oraz techniki biologii molekularnej.

Do testów na obecność *P. cactorum* zalecane jest pobranie trzech ogonków liściowych z pojedynczej sadzonki [źródło: Certification scheme for strawberry. EPPO Standard PM 4/11 (2), 2008. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 38, 430-737].

W przypadku lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* przyjmuje się, że ich jednostki propagacyjne występują na plantacjach nierównomiernie, w skupieniach. Ze względu na podobną biologię *P. cactorum* i *P. fragariae* możliwe jest wykorzystanie procedury pobierania prób roślin z podejrzeniem występowania *P. fragariae* [EPPO PM 3/22 (2),

2013 Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 43, 395 '*Phytophthora fragariae*: inspection'] do pobierania prób roślin do badań laboratoryjnych na obecność *P. cactorum*. Zgodnie z metodyką należy dokonać ogólnej oceny pola w poszukiwaniu roślin z objawami nierównomiernego wzrostu, zamierania czy utraty turgoru, szczególnie w obniżeniach terenu, gdzie może zbierać się woda. Należy dokonać inspekcji systemu korzeniowego pod kątem występowania objawów gnicia oraz inspekcji korony pod kątem występowania czerwono-brązowych nekroz (podłużne cięcie sekatorem) z symptomatycznych roślin. W przypadku braku występowania objawów inspekcje należy wykonać oddzielnie dla każdej odmiany (bloku). Próby należy pobierać losowo, poruszając się liniowo w kształcie litery W. Powinny zawierać one sadzonki mateczne oraz ukorzenione sadzonki rozłogowe. Należy przeprowadzić inspekcję systemu korzeniowego i korony, tak jak w przypadku roślin wykazujących objawy chorobowe. Według procedury EPPO PM 3/65 (1) 2006, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 195–200 'Sampling of consignments for visual phytosanitary inspection', jeżeli przyjmujemy, że nasadzonych jest 200 000 sadzonek truskawki to pobranie do inspekcji około 300 roślin umożliwi wykrycie 1% porażonych sadzonek z 95% pewnością.

W szkółkach pojemnikowych wskazane jest wykonanie 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.



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 próbek należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. Należy w pierwszej kolejności pobrać próbki z roślin wykazujących objawy chorobowe (nekrozy, przebarwienia, zasychanie brzegu blaszki liścia, widoczna utrata turgoru).
2. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) roślin, z których pobrano próbki, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.

Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): 05.03.2020 r.

3. W przypadku pobierania próbek wody, każda z nich powinna pochodzić z pojedynczej kwatery, na której znajduje się materiał szkółkarski oraz posiadać etykietę umożliwiającą identyfikację opisanej kwatery.
4. Próby należy pobierać do trwale oznakowanych foliowych torebek i zabezpieczyć przez ich zamknięcie. W przypadku wyższych temperatur (powyżej 25°C) zaleca się umieszczenie próbek w tzw. lodówce turystycznej, pojemniku styropianowym albo "torbie na mrożonki" z wkładem chłodzącym. Nie dopuszczać do zamrożenia prób! Po dostarczeniu do laboratorium próby materiału roślinnego należy umieścić w chłodzie (+4°C do +10°C). Próbki mogą być przechowywane w lodówce (chłodni) maksymalnie przez okres kilku dni. W przypadku próbek wody należy je przechowywać w temperaturze od +10 do +25 °C przez okres maksymalnie kilkunastu dni.

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

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	

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności *Phytophthora cactorum*

Badania na obecność patogena w materiale roślinnym można przeprowadzić w dwóch etapach: (1) wykrywanie grzyba poprzez jego namnażanie (stymulacja zarodnikowania, hodowla na pożywkach agarowych); (2) identyfikacja na podstawie morfologii oraz testów PCR.

Próby materiału roślinnego pobrane do analizy laboratoryjnej należy umieścić w sterylnych szalkach i zanurzyć w wodzie wodociągowej lub sterylnym przesączu glebowym, a następnie inkubować w świetle w temperaturze około 20°C. Każdego dnia wskazana jest mikroskopowa obserwacja prób pod kątem obecności sporangiów w roztworze wodnym *P. cactorum* (źródło: Certification scheme for strawberry. EPPO

Standard PM 4/11 (2), 2008. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 38, 430-737). Obserwacje prowadzi się przez okres 3 dni.

Druga metoda polega na umieszczeniu fragmentów materiału roślinnego z pobranych prób na pożywce ziemniaczano – glukozowej PDA i inkubowaniu w warunkach opisanych powyżej. Po 5 – 7 dniach, z fragmentów tkanki roślinnej wyłożonych na pożywkę można obserwować wzrost kultur *P. cactorum* (źródło: Certification scheme for strawberry. EPPO Standard PM 4/11 (2), 2008. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 38, 430-737).

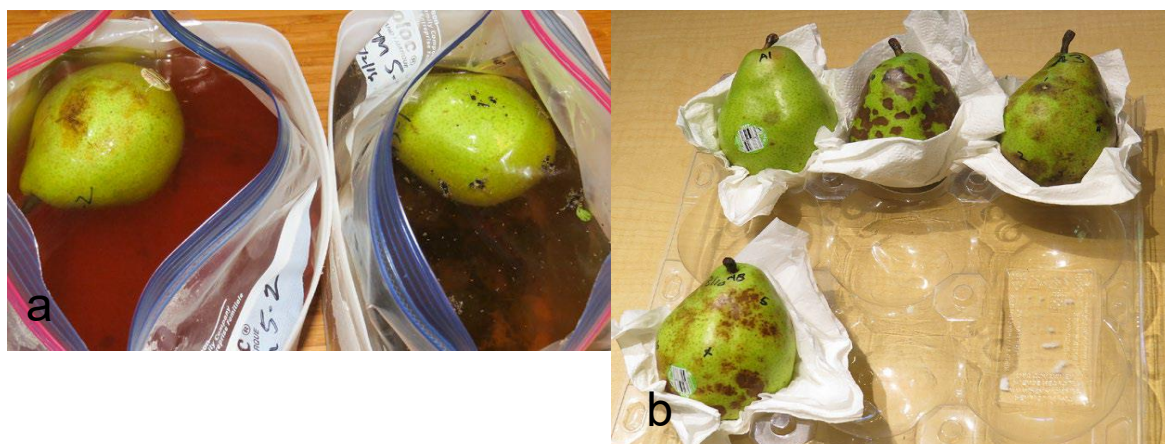
W celu identyfikacji kultur *P. cactorum* określa się ich cechy morfologiczne według opracowanego klucza (Meszka i Michalecka, 2016) lub bazuje się na analizie DNA.

Do izolacji kwasów nukleinowych można wykorzystać gotowe zestawy np.: GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit. (EURx). W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta. Do identyfikacji kultur *P. cactorum* wykorzystuje się test PCR. Metodyka przeprowadzenia reakcji PCR oraz sekwencja starterów specyficznych dla *P. cactorum* opisane są w publikacjach 1 i 2.

Startery specyficzne dla gatunku *Phytophthora cactorum* do przeprowadzenia reakcji PCR przedstawione są także w tabeli poniżej.

Patogen	Startery	Sekwencja startera (5' → 3')	Temperatura przyłączenia starterów (°C)	Długość produktu PCR (pz)	Literatura
<i>P. cactorum</i>	ADF1 ADR1	TACTGTGGGGACGAAAGTCCT CCGATTCAAAGCCAAGCAACT	66	524	1, 2

W pobranych próbach wody umieszcza się niedojrzałe gruszki, które 'wychwytyją' zoospory *P. cactorum* lub innych lęgniowców obecnych w wodzie (fot. 2a). Po około 3 dniach na owocach można obserwować plamy gnilne spowodowane infekcją lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* (fot. 2b). W przypadku, gdy gruszki umieszcza się bezpośrednio w zbiornikach pułapkowych w szkółce, objawy chorobowe można obserwować znacznie wcześniej (Swiecki i in., 2018).



Fot. 2. a) Gruszki zanurzone w próbach wody. b) Objawy powodowane przez *P. cactorum* na owocach.

Literatura:

1. 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. *Aust. J. Exper. Agricult.* 40: 1011–1019.
2. Mieszka B., Michalecka M. 2016. Identification of *Phytophthora* spp. isolated from plants and soil samples on strawberry plantations in Poland. *J. Plant Dis. Prot.* 123: 29-36.
3. OEPP/EPPO Bulletin 38, 2008, 430-737. PM 4/11 (2). Certification scheme for strawberry.
4. 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). <http://dx.doi.org/10.3733/ca.2018a0026> Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/1cf2d1jh>

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

Opracowanie: mgr inż. Anna Poniatowska, e-mail: anna.poniatowska@inhort.pl