INSTYTUT OGRODNICTWA

Ms.43.01.PhyRub

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego i wody do badań laboratoryjnych na obecność *Phytophthora* spp.

Testowane rośliny: **Jeżyna bezkolcowa - *Rubus fruticosus***

Malina właściwa – *Rubus idaeus*

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 matecznej dwa lata po jej dopuszczeniu jako przedbazowej rośliny matecznej, a następnie co dwa lata, należy pobrać próby roślin do badań laboratoryjnych pod kątem obecności lęgniowców z rodzaju *Phytophthora*. W przypadku pozostałych kategorii i stopni kwalifikacji, w razie podejrzenia wystąpienia objawów fytoftorozy podczas polowej oceny wizualnej materiału szkółkarskiego, należy pobrać próby i wykonać ocenę laboratoryjną na obecność *Phytophthora* spp. Dla materiału szkółkarskiego kategorii elitarny w stopniu bazowym, wyprodukowanego w wyniku rozmnażania, który jest utrzymywany przez okres krótszy niż trzy miesiące, należy wykonać jedną ocenę polową. (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.

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

Wybór tkanki/części rośliny

Patogeny z rodzaju *Phytophthora* są najczęściej wprowadzane na nowe obszary z porażonymi sadzonkami, a następnie rozprzestrzeniają się wraz ze spływającą wodą

opadową lub wzdłuż systemów nawadniających. Rozwojowi tej grupy mikroorganizmów sprzyjają umiarkowane temperatury (optima dla różnych gatunków tego rodzaju oscylują w granicach 10-25°C) oraz wilgotne warunki panujące w glebie. Lęgniowce dokonują infekcji przez system korzeniowy rośliny i powodują jego gnicie, a w konsekwencji rozpad. System korzeniowy zaatakowanych roślin jest nekrotyczny, zamierają korzenie włośnikowe, co może nadawać korzeniom roślin *Rubus* L ogołocony wygląd, przypominający szczurzy ogon. W przekroju podłużnym korzeni oraz u podstawy pędu, po usunięciu kory, obserwuje się nekrozy i przebarwienia drewna. Na porażonych korzeniach lęgniowce tworzą zarodnie pływkowe (zoosporangia), z których do roztworu glebowego uwalniane są zarodniki pływkowe (zoospory), zaś wzdłuż walca osiowego korzeni oospory, które zostają uwolnione do gleby po rozpadzie korzenia i stanowią formę przetrwalnikową lęgniowca w glebie (mogą pozostać żywotne przez kilkanaście lat). W konsekwencji uszkodzenia systemu korzeniowego, na nadziemnych częściach roślin pojawiają się objawy choroby. Pędy, szczególnie młode i niezdrewniałe, szybko więdną, tworząc pastoralne zagięcie. Starsze liście podczas gorącego i suchego lata zasychają i wyglądają jak spalone, ale nie opadają, lecz pozostają na porażonych pędach. Porażone krzewy nie wytwarzają odrostów (Martin i in., 2017). Przy lekkim porażeniu systemu korzeniowego *Phytophthora* spp. rośliny mogą nie wykazywać żadnych oznak choroby, dlatego w przypadku podejrzenia wystąpienia lęgniowców w mateczniku, reprezentatywne próby w postaci karpy korzeniowej z pędami uciętymi na wysokość 20 cm (lub całe rośliny, jeżeli ich wielkość nie przekracza 50 cm) należy przekazać do badania laboratoryjnego.

W przypadku gatunków z rodzaju *Phytophthora* przyjmuje się, że ich jednostki propagacyjne występują na plantacjach nierównomiernie, w skupieniach. Należy dokonać ogólnej oceny pola w poszukiwaniu roślin z objawami zamierania i zasychania pędów, nierównomiernego wzrostu, utraty turgoru liści na pojedynczych pędach, szczególnie w obniżeniach terenu, gdzie może zbierać się woda. Należy dokonać wizualnej inspekcji podstawy pędu oraz systemu korzeniowego pod kątem występowania brązowych nekroz, objawów gnicia i zamierania korzeni włośnikowych. 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.

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 części, wykazujące następujące symptomy: widoczna utrata turgoru liści, zasychanie pojedynczych niezdrewniałych pędów i/lub całych roślin, widoczne nekrozy u podstawy pędów, a następnie przeprowadzić ocenę makroskopową podziemnych części roślin pod kątem wystąpienia nekroz na systemie korzeniowym i/lub zamierania korzeni włośnikowych.

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 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, 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":

Data pobrania próby (dd mm rrrr)	
Dane producenta: • 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 *Phytophthora* spp.

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

Badania pod kątem obecności patogena w materiale roślinnym można przeprowadzić poprzez izolację lęgniowców na pożywki agarowe, a następnie identyfikacje wyrosłych kolonii na podstawie morfologii oraz reakcji PCR.

W tym celu materiał roślinny (fragmenty korzeni, fragmenty znekrotyzowanej tkanki pobranej z podstawy pędów) wykazujący objawy chorobowe należy pociąć sterylnym skalpelem na kawałki o długości ok.1–2 cm, przepłukać sterylną wodą, następnie zanurzyć na 1 min w 2% roztworze NaOCl, ponownie przemyć sterylną wodą i wysuszyć. Przygotowane fragmenty roślin umieścić na pożywce mikrobiologicznej. Zalecana pożywka do selektywnej izolacji lęgniowców *Phytophthora* to pożywka stała PARP (Kannwischer i Mitchell, 1978), zawierająca klarowany sok warzywny 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 lęgniowców, umożliwiającej ich klasyfikację do rodzaju *Phytophthora* według klucza (np. Erwin i Ribeiro, 1996; Gallegly i Hong, 2008; Ho, 2018; Ristaino, 2012).

W celu potwierdzenia, że wyrosłe kolonie należą do rodzaju *Phytophthora*, jak również do identyfikacji lęgniowców bezpośrednio w porażonym materiale roślinnym, można przeprowadzić test PCR. Do izolacji kwasów nukleinowych, zarówno z aksenicznych kultur patogena, jak i materiału roślinnego (fragmenty korzeni, fragmenty pędów) 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 uzyskanym DNA grzyba należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami ITS 6 : 5′ GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG 3′ (Cooke i in., 2000) 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 lęgniowców *Phytophthora.* Warunki do przeprowadzenia reakcji PCR ze starterami do regionów ITS oraz DNA *Phytophthora*, jak i stężenia poszczególnych reagentów zostały wymienione w publikacji Cooke i in., 2000.

Jeżeli z jakichś przyczyn nie można uzyskać żywych kultur lęgniowców z materiału roślinnego należy zbadać próbę gleby ze szkółki na obecność lęgniowców z rodzaju *Phytophthora.* W tym celu należy przeprowadzić test pułapkowy, a jako pułapkę wykorzystać liście różanecznika odm. Nova Zembla. Korzystnie jest, jeżeli badana próba ziemi będzie zawierała szczątki roślin (fragmenty korzeni), które wykazywały objawy choroby. 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. 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 liście różanecznika. Całość należy inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 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 wykładać na pożywkę PARP, w ilości 25 fragmentów na jedną szalkę; łącznie przygotować pięć takich szalek na próbę. Zaszczepione podłoża PARP 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.

Literatura:

Abad, Z. G., Burgess, T. I., Redford, A. J., Bienapfl, J. C., Srivastava, S., Mathew, R., & Jennings, K. (2023). IDphy: An international online resource for molecular and morphological identification of *Phytophthora*. Plant disease, *107*(4), 987-998.

Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., & Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal genetics and biology, 30(1), 17-32.

Erwin DC, Ribeiro OK (1996) Phytophthora: diseases worldwide. American Phytopathological Society Press, St. Paul

Gallegly, M. E., & Hong, C. (2008). *Phytophthora:* identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press.

Ho, H. H. (2018). The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium.* J. Bacteriol. Mycol. Open Access, 6, 40-45.

Kannwischer, M. E., & Mitchell, D. J. (1978). The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. Phytopathology, 68(1760), 1765.

Martin, R. R., Ellis, M. A., Williamson, B., & Williams, R. N. (2017). Compendium of raspberry and blackberry diseases and pests (No. Ed. 2). American Phytopathological Society (APS Press).

Ristaino, J. B. (2012). A Lucid key to the common species of *Phytophthora*. Plant disease, 96(6), 897-903.

Swiecki TJ, 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).

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

---

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