

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego i wody do badań laboratoryjnych na obecność *Phytophthora fragariae* C.J. Hickman

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: wiosną (V-VI) lub jesienią (IX-X) (standard PM 3/83 (1), EPPO, 2017) przed nastaniem długotrwałych wysokich lub niskich temperatur powietrza. Dla materiału szkółkarskiego wyprodukowanego w wyniku mikrorozmnażania, który jest utrzymywany przez okres krótszy niż trzy miesiące, należy wykonać jedną ocenę polową. Dla materiału kategorii elitarny w stopniu przedbazowy, z każdej przedbazowej rośliny matecznej rok po jej dopuszczeniu jako przedbazowej rośliny matecznej, a następnie raz w trakcie sezonu wegetacyjnego, należy pobrać próby do badań laboratoryjnych pod kątem obecności *P. fragariae* (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).

Podczas oceny polowej materiału szkółkarskiego należy przeprowadzić ocenę makroskopową liści, korony oraz systemu korzeniowego roślin *Fragaria* L. na obecność symptomów powodowanych przez *P. fragariae*. W przypadku wystąpienia objawów należy pobrać próby roślin i poddać badaniom laboratoryjnym.

Materiał roślinny powinien być uznany za wolny od *P. fragariae* na każdym etapie produkcji na podstawie wyników oceny wizualnej lub jeśli w miejscu wytwarzania w ostatnim pełnym sezonie wegetacyjnym nie wykazywał objawów powodowanych przez *P. fragariae* na liściach, systemie korzeniowym i koronie, a porażony materiał oraz inne rośliny w otaczającej go strefie o promieniu co najmniej 5 m zostały oznaczone, wyłączone z wyrywania i wprowadzania do obrotu oraz zniszczone po wyoraniu nieporażonego materiału szkółkarskiego.

Wybór tkanki/części rośliny

Patogen *P. fragariae* jest najczęściej wprowadzany na nowe obszary z porażonymi sadzonkami. Rozwojowi patogena sprzyjają chłodne i wilgotne warunki panujące w glebie (optymalna temperatura do dokonania infekcji: 10-17°C). Łęgniowiec powoduje charakterystyczne objawy choroby w systemie korzeniowym roślin z rodzaju *Fragariae*. Korzenie boczne zaatakowanych sadzonek gniją i zamierają zazwyczaj zanim roślina wykształci owoce dojrzałe do zbioru. Wierzchołki pozostałych korzeni przybierają szaro-brązową barwę, co nadaje im wygląd „szczurzego ogona”. W przekroju podłużnym korzenia widoczne jest czerwone do ceglastego zabarwienie walca osiowego. U bardziej wrażliwych odmian nekroza może sięgać korony. Na porażonych korzeniach łęgniowiec tworzy zarodnie pływkowe (zoosporangia), z których do roztworu glebowego uwalniane są zarodniki pływkowe (zoospory), zaś wzdłuż walca osiowego oospory, które zostają uwolnione do gleby po rozpadzie korzenia i stanowią formę przetrwalnikową łęgniowca w glebie (mogą pozostać żywotne przez kilkanaście lat). W konsekwencji uszkodzenia systemu korzeniowego, nadziemne części rośliny wykazują skarłały pokrój, młodsze liście mogą przybierać niebieskawy odcień, a starsze liście żółkną lub czerwienieją. Przy lekkim porażeniu roślin przez *P. fragariae* rośliny mogą nie wykazywać żadnych oznak choroby (PP 2/9 (1), 1998). Ze względu na fakt, że infekcja *P. fragariae* może przebiegać bezobjawowo, istnieje pewne ryzyko porażenia materiału roślinnego także w kulturach tkankowych, dlatego reprezentatywne próby w postaci całych roślin z systemem korzeniowym należy przekazać do badania laboratoryjnego.

W przypadku gatunków z rodzaju *Phytophthora* przyjmuje się, że ich jednostki propagacyjne występują na plantacjach nierównomiernie, w skupieniach. Zgodnie z metodyką pobierania prób roślin z podejrzeniem występowania *P. fragariae* (PM 3/22 (2), 2013) do badań laboratoryjnych, należy dokonać ogólnej oceny pola w poszukiwaniu roślin z objawami takimi, jak nierównomierny wzrost, skarłowacenia, zamieranie czy utrata turgoru, szczególnie w obniżeniach terenu, gdzie może zbierać się woda. Należy dokonać wizualnej inspekcji systemu korzeniowego pod kątem występowania objawów „szczurzych ogonków” oraz czerwonego walca osiowego w korzeniach, a także czerwono-brązowych nekroz w koronie (podłużne cięcie sekatorem) z symptomatycznych roślin (uwaga: nekrozy w koronie mogą być objawem infekcji przez inne patogeny, jak np. *P. cactorum*, *Colletotrichum acutatum*, i in.). W przypadku braku występowania objawów inspekcję należy wykonać oddzielnie dla każdej odmiany (bloku). Próby pobierać losowo, poruszając się liniowo w kształcie litery W. Powinny zawierać one sadzonki mateczne oraz ukorzenione sadzonki rozłogowe.

W szkółkach pojemnikowych wskazane jest przeprowadzenie analizy wody wykorzystywanej do podlewania roślin. W tym celu, do wykrycia obecności zoospor łęgniowców 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 całe rośliny lub ich części, które umożliwią obserwację wizualną następujących symptomów: widoczna utrata turgoru liści, zasychanie całych sadzonek, niebieskawy odcień liści, a następnie przeprowadzić ocenę makroskopową podziemnych części roślin pod kątem wystąpienia szczerzych ogonków i czerwonego walca osiowego widocznego na podłużnym przekroju korzenia.

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, 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 *P. fragariae*

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 prób wody należy je przechowywać w temperaturze od +10 do +18°C przez okres maksymalnie kilkunastu dni.

Wszystkie stosowane obecnie metody wykrywania *P. fragariae* opierają się pierwotnie na teście pułapkowym opracowanym przez Duncana (1980). W celu przeprowadzenia tego testu, końcówki korzeni (długość 2-5 cm) są odcinane i mieszane z pozbawionym gleby kompostem (1:3 piasek/torf plus nawozy, pierwiastki śladowe i wapno; pH mieszaniny = 5,5). Mieszaninę umieszcza się w plastikowych doniczkach o średnicy 12,5 cm.

Każdą tak przygotowaną doniczkę obsadza się 5 sadzonkami *F. vesca* var. *semperfloren* cv. Baron Solemacher (np. podatny klon UC5), o wysokości około 7,5–10,0 cm. Jeżeli sadzonki do testu otrzymywane są z nasion, to należy je posadzić do przygotowanych j.w. doniczek w terminie 2-3 tygodni od wysiewu. Tak przygotowane testy pułpkowe należy inkubować przez okres 4-6 tygodni w warunkach temp. 20°C i świetle ciągłym o natężeniu 8000 luksów. Jeżeli jako rośliny pułpkowe wykorzystywane są sadzonki rozłogowe, powinny one zostać ukorzenione 10–14 dni przed użyciem w teście. Następnie, po ich posadzeniu do przygotowanych j.w.

doniczek należy je inkubować w szklarni w temperaturze 15°C oraz nawadniać przez zamgławianie co 6 godzin przez 15 minut lub ostrożne podlewanie bezpośrednie.

Po 5 tygodniach korzenie każdej rośliny – przynęty są badane pod kątem typowych objawów na systemie korzeniowym oraz mikroskopowo, pod kątem obecności oospor. Jeżeli w ocenianych korzeniach podczas obserwacji mikroskopowej widoczne będą oospory, można przeprowadzić izolację patogena na podłoże selektywne (Erwin i Ribeiro, 1996; EPPO Datasheet: *P. fragariae*, zaktualizowane 15/02/2022). Wymagane jest wykonanie odpowiedniej kontroli biologicznej dla testu pułapkowego, poprzez umieszczenie roślin kontrolnych w tacach z samym kompostem, w celu wykrycia możliwego zanieczyszczenia krzyżowego (PM 4/11 (2), 2008). Czułość testu pułapkowego ocenia się jako możliwość wykrycia poziomu zakażenia badanego materiału roślinnego <1%.

W celu wykrycia *P. fragariae* można również zastosować następujące łączone analizy laboratoryjne (Bonants i in., 2004):

- test pułpkowy wykonany **dla próby wody**, po którym wykonać ocenę makroskopową systemu korzeniowego rośliny – pułpki i obserwacje mikroskopowe oospor;
- wykonanie testu nested-PCR (z ang. PCR zagnieżdżona) dla próby wody pochodzącej z testu pułpkowego z badaniem wody;
- test pułpkowy dla próby wody połączony z nested-PCR dla korzeni rośliny - pułpki.

Bezpośrednie badanie materiału roślinnego techniką PCR jest również możliwe, jednak przy większej ilości prób rekomendowane jest przeprowadzenie wodny testu pułpkowego (PM 4/11 (2), 2008). Protokół dla zagnieżdżonej reakcji PCR, wykorzystującej startery specyficzne do regionu ITS w rDNA *P. fragariae* został opracowany przez Cooke i in., 2000. Uważa się, że test zagnieżdżonej PCR, zastosowany do detekcji *P. fragariae* w bezobjawowo porażonych roślinach oraz do detekcji zoospor patogena w wodzie umożliwia wykrycie *P. fragariae* z podobną czułością jak opisany wyżej test pułpkowy przeprowadzony dla fragmentów korzeni (EPPO Datasheet: *P. fragariae*, zaktualizowane 15/02/2022).

Literatura:

Bonants PMJ, van Gent-Pelzer MPE, Hooftman R, Cooke DEL, Guy DC, Duncan JM (2004). A combination of baiting and different PCR formats, including measurement of real-time quantitative fluorescence, for detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry plants. European Journal of Plant Pathology 110, 689–702. Duncan JM (1980). A technique for detecting red stele (*Phytophthora fragariae*) infection of strawberry stocks before planting. Plant Disease 64, 1023–1025.

Erwin DC, Ribeiro OK (1996). *Phytophthora* Diseases World- wide. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 562.

OEPP/EPPO (1998) EPPO Standard PP 2/9 (1) Guideline on good plant protection practice: Strawberry.

OEPP/EPPO (2017) EPPO Standard PP 3/83 (1) *Fragaria* plants for planting – inspection of places of production. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 47, 349-365.

OEPP/EPPO (2013) EPPO Standard PP 3/22 (2) *Phytophthora fragariae*: inspection. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 43, 395.

OEPP/EPPO (2008) EPPO Standard PP 4/11 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting. Certification scheme for strawberry. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 38, 430–437.

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).

EPPO Datasheet: *Phytophthora fragariae*, zaktualizowane 15/02/2022. (do pobrania w: file:///C:/Users/Admin4/Downloads/eppo_datasheet_PHYTFR-2.pdf)

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

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