

PORÓWNANIE RÓŻNYCH METOD IDENTYFIKACJI GATUNKÓW *Phytophthora* W MATERIALE SZKÓŁKARSKIM

Katarzyna Wiejacha, Teresa Orlikowska

Zakład Biotechnologii Roślin Ozdobnych,
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach

Wprowadzenie

Gatunki rodzaju *Phytophthora* są organizmami grzybopodobnymi, spokrewnionymi z algami złotymi i brunatnymi. Ze względu na strzępkowaty charakter plechy oraz tworzenie płciowych i bezpłciowych zarodników, do niedawna były uznawane za grzyby. O zmianie stanowiska taksonomicznego rodzaju *Phytophthora* zadecydowały m.in., składniki budujące ścianę komórkową (zamiast chityny – glukany i celuloza oraz nie występująca u grzybów właściwych hydroksyprolina), gromadzone substancje zapasowe (mykolaminaryna w miejsce glikogenu) [BARTNICKI-GARCIA, WANG 1983], oporność na działanie antybiotyków polienowych, niezdolność do syntezy steroli [ERWIN, RIBEIRO 1996] oraz fakt, że przez większą część cyklu życiowego *Phytophthora* spp. są organizmami diploidalnymi, zaś grzyby haploidalnymi [ERWIN, RIBEIRO 1996; SZKUTA, ORLIKOWSKI 2002]. Rodzaj *Phytophthora* został zaliczony przez CAVALIER-SMITH [1998] oraz KIRK i in. [2001] do królestwa *Chromista*, natomiast według innych systemów klasyfikacji żywych organizmów przez LEIPE i in. [1994], DICK [1997] oraz SOGIN i PATTERSON [2001] do królestwa *Stramenopiles*.

Charakterystyczną cechą gatunków *Phytophthora* jest wysoki stopień pasożytnictwa w stosunku do roślin i niska zdolność do konkurencji z innymi mikroorganizmami glebowymi. Gatunki *Phytophthora* nie są saprobiontami jak wiele innych glebowych patogenów, w glebie przeżywają w formie spoczynkowych chlamydospor i oospor. Są patogenami pierwotnymi [TSAO 1990], atakują zdrowe rośliny lub wnikają do tkanki poprzez świeże rany i często, w wyniku osłabienia porażonego osobnika, ułatwiają infekcję przez inne patogeny. Gatunki rodzaju *Phytophthora* powodują zgniliznę korzeni, podstawy pnia i pędu oraz plamistość liści, pąków i owoców [TSAO 1990; ERWIN, RIBEIRO 1996; RISTAINO, GUMPERTZ 2000]. Często objawy chorobowe nie są specyficzne i mogą być mylone ze zmianami wywoływanymi przez inne mikroorganizmy lub czynniki abiotyczne. Wiele gatunków *Phytophthora* posiada szeroki zakres roślin żywicielskich (np.: *P. cryptogea*, *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. citrophthora* oraz *P. cinnamomi* – ten ostatni, poraża ponad 1000 gatunków roślin [ERWIN, RIBEIRO 1996], co zwiększa ryzyko rozprzestrzeniania się fytoftoroz w szkółkach oraz powstawania strat finansowych [ORLIKOWSKI, SZKUTA 2002a].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat obserwuje się znaczny wzrost popytu na szkółkarskie rośliny ozdobne oraz zwiększenie ich produkcji [MAROSZ 2004]. W 2002 roku produkcja szkółkarska drzew i krzewów ozdobnych była w Polsce w niektórych asortymentach 12-krotnie większa w porównaniu do roku 1989 [MAROSZ 2002]. Na zwiększenie skali produkcji wpłynęło zastosowanie przemysłowych technologii w szkółkach, ale równocześnie zwiększyło się ryzyko rozprzestrzeniania groźnych patogenów. Na przykład, ponowne wykorzystywanie tej samej wody do nawadniania lub fertygacji sprzyja roznoszeniu propaguł patogenów w szkółce, czasem na znaczne odległości [RISTAINO, GUMPERTZ 2000; STANGHELLINI i in. 2000; THEMANN i in. 2002; YAMAK i in. 2002]. Również odnotowywane są przypadki przeniesienia patogenu poprzez maszyny rolnicze i pracowników, w czasie prac pielęgnacyjnych.

Dodatkowym czynnikiem powstawania nowych ognisk zakażenia oraz pojawianie się nieznanych do tej pory w Polsce gatunków patogenów jest niekontrolowany import materiału nasadzeniowego. W ostatnich latach wykryto w polskich szkółkach kilka nowych gatunków *Phytophthora*, nie odnotowywanych wcześniej w kraju, a wśród nich gatunki alertowe i kwarantannowe, takie jak *P. cinnamomi* i *P. ramorum*. Przystąpienie Polski do Unii Europejskiej nakłada na nas obowiązek ich wykrywania i zwalczania (Dz. U. Nr 144, poz. 1526). Szczególne znaczenie ma kontrola materiału roślinnego na granicy kraju oraz monitorowanie w szkółkach roślin sprowadzonych z zagranicy, szczególnie podatnych na dany gatunek patogenu. W szkółkach roślin ozdobnych produkuje się na dużą skalę gatunki podatne na infekcję przez patogeny rodzaju *Phytophthora*, np.: cyprysiki Lawsona, żywotniki, wrzosey, cisy, borówki, gatunki rododendronów, jarzębinę, fotinię, mikrobiotę [WERRES i in. 2001; ORLIKOWSKI, SZKUTA 2002a, 2002b, 2002c; LANE i in. 2004; TOOLEY i in. 2004]. Ze względu na straty spowodowane przez fitoflorozę, istnieje potrzeba stosowania szybkich testów do wykrywania i identyfikacji ich sprawców, również w przypadku braku objawów na roślinach, co ma szczególne znaczenie przy imporcie materiału.

Techniki analizy DNA są doskonałymi narzędziami do tego celu. Identyfikacja patogenu, wywołującego chorobę rośliny oraz jego detekcja w przypadkach braku symptomów chorobowych jest możliwa dzięki wykrywaniu markerowych fragmentów DNA, specyficznych tylko dla danego gatunku. Krótki czas analizy i związane z tym ograniczenie strat materiału roślinnego oraz uniknięcie wprowadzenia groźnego organizmu do szkółki przemawiają za stosowaniem takich metod detekcji.

Opracowano już wiele metod wykrywania patogenów, jednak wciąż prowadzone są badania nad ich udoskonaleniem, ukierunkowanym, m.in. na możliwość wykrycia wielu chorobotwórczych organizmów za pomocą jednego testu lub zwiększeniu jego czułości. Niniejsza praca przedstawia takie metody, ich wady i zalety oraz możliwość stosowania w odniesieniu do roślin szkółkarskich.

Metody identyfikacji wymagające czystych kultur patogenu

Część metod identyfikacji gatunków *Phytophthora* może być wykonywana tylko na czystych mikrobiologicznie kulturach patogenu. Etap izolacji czystego organizmu z fragmentu tkanki roślinnej, próby podłoża czy wody znacznie wydłuża czas analizy.

Tabela 1; Table 1

Identyfikacja gatunków *Phytophthora* na podstawie cech morfologicznych i fizjologicznych,
wykonywana na czystych kulturach patogenu
(podział cech wg HALL [1993])

Identification of *Phytophthora* species based on morphological and physiological features,
performed on pure cultures of pathogen
(classification of characters after HALL [1993])

| Charakterystyka Characteristic | Cechy morfologiczne Morphological characters | Cechy fizjologiczne Physiological characters | Patogeniczność Pathogenicity |
|-----------------------------------|--|---|---|
| | kultura na różnych pożywkach | kultura na różnych pożywkach | test <i>in situ</i> |
| | – budowa strzępek plechy, – budowa struktur wegetatywnych (17 cech szczegółowych), – budowa struktur generatywnych (4 cechy szczegółowe). [WATERHOUSE 1963; HO 1981; NEWHOOK i in. 1978; RIBEIRO 1978; WILCOX 1989; STAMPS i in. 1990; HALL 1993; ERWIN, RIBEIRO 1996; SZKUTA, ORLIKOWSKI 2002] | – szybkość wzrostu, – wzór kolonii, – zakres temperatur wzrostu (minimum i maksimum), – wrażliwość na niektóre związki chemiczne, – zdolność do rozkładania skrobi i wytwarzania pigmentów, – zdolność do kojarzenia z innymi szczepami i gatunkami w obrębie rodzaju. [SHEW, BENSON 1982; LUO i in. 1988; WILCOX 1989] | – patogeniczność w stosunku do rośliny wskaźnikowej. [HALL 1993] |
| Czas*; Time* | 7–14 dni | 7–14 dni | 7–14 dni |
| Wady Disadvantages | – duże zróżnicowanie i plastyczność cech – trudności z uzyskaniem sporangiów | – mała liczba cech taksonomicznych na podłożach agarowych i ich zmienność w trakcie kultury [HO, JONG 1987] | – trudność w wystandaryzowaniu testu |

* należy uwzględnić dodatkowy czas na oczyszczanie kultury podczas izolacji patogena – min. 6 dni; include additional time for obtaining pure pathogen culture during its isolation – min. 6 days

Tabela 2; Table 2

Identyfikacja gatunków *Phytophthora* na podstawie analiz biochemicznych
i molekularnych, wykonywanych na czystych kulturach patogenu

Identification of *Phytophthora* species based on biochemical and molecular analyses
performed on pure cultures of pathogen

| | Biochemiczne; Biochemical | | Molekularne; Molecular | | |
|---|--|--|---|--|--|
| | elektroforeza białek protein electrophoresis | izoenzymatyczna isoenzymatic | losowy PCR random PCR | PCR-RFLP | sekwencjonowanie sequencing |
| Przebieg analizy Analysis stages | <ul style="list-style-type: none"> - homogenizacja próbki - ekstrakcja białek rozpuszczalnych - elektroforeza - barwienie białek - porównanie elektroforegramów z wzorami białek znanego patogenu <p>[CLARE, ZENTMYER 1966; HALL i in. 1969; BIELENIN i in. 1988]</p> | <ul style="list-style-type: none"> - homogenizacja próbki - ekstrakcja białek - elektroforeza - reakcje barwne ze specyficznymi substratami - porównanie wzorów prążkowych z izolatami referencyjnymi <p>[MAN INT VELD i in. 1998, 2002; WERRES i in. 2001]</p> | <ul style="list-style-type: none"> - izolacja DNA - PCR z niespecyficznym starterem - elektroforeza - porównanie produktów z wzorami izolatów referencyjnych <p>[FALEIRO i in. 2003; MAN INT VELD i in. 1998]</p> | <ul style="list-style-type: none"> - izolacja DNA - PCR ze specyficznymi starterami fragmentu DNA (zawierającego ITS I i II lub geny <i>cox I</i> i <i>II</i>) - trawienie produktu PCR enzymami restrykcyjnymi - elektroforeza - porównanie z wzorcami <p>[YAMAK i in. 2002; CHOWDAPPA i in. 2003a, 2003b, 2003c; TRIPATHI i in. 2003]</p> | <ul style="list-style-type: none"> - izolacja DNA - PCR ze specyficznymi starterami fragmentu DNA (np. rDNA zawierającego regiony ITS) - sekwencjonowanie produktów - porównanie sekwencji w bazach danych <p>[LEE, TAYLOR 1992; ÉRSEK i in. 1994; COOKE, DUNCAN 1997; COOKE i in. 2000; BONANTS i in. 2002; ZHANG i in. 2004]</p> |
| Czas* Time* | 1-2 dni | 1-2 dni | 1-2 dni | 1-2 dni | 1-3 dni |

* należy uwzględnić dodatkowy czas na oczyszczanie kultury podczas izolacji patogena – min. 6 dni; include additional time for obtaining pure pathogen culture during its isolation – min. 6 days

Tabela 3; Table 3

Identyfikacja gatunków *Phytophthora* nie wymagających czystych kultur patogenu
Phytophthora spp. identification methods non-requiring pathogen pure cultures

| | Immunoenzymatyczne Immunoenzymatic ELISA | Molekularne; Molecular | | |
|-------------------------------------|--|---|---|--|
| | | PCR | RT-PCR | Real-time PCR |
| Przebieg analizy Analysis stages | <ul style="list-style-type: none"> - homogenizacja próby i uwolnienie antygenów, - inkubacja z przeciwciałami, - barwienie kompleksu antygen - przeciwciała i ilościowe odczytanie sygnału barwnego <p>[CAHILL, HARDHAM 1994; BURNS, GEORGE 1995; FERRARIS 2004; THEMANN i in. 2002]</p> | <ul style="list-style-type: none"> - izolacja DNA bezpośrednio z próby - PCR ze starterami specyficznymi dla poszczególnego gatunku, - elektroforeza i odczytanie wyniku <p>[BONANTS i in. 1997; WINTON, HANSEN 2001; COOKE i in. 2000; GARBELOTTI i in. 2002]</p> | <ul style="list-style-type: none"> - izolacja RNA bezpośrednio z próby, - „przepisanie” RNA na cDNA - PCR ze starterami specyficznymi dla poszczególnego gatunku, - elektroforeza i odczytanie wyniku <p>[SCOTT, DEAHL 1998; MALEWSKI i in. 2003]</p> | <ul style="list-style-type: none"> - izolacja DNA lub RNA bezpośrednio z próby, - PCR ze starterami specyficznymi dla poszczególnego gatunku oraz sondą DNA, - odczytywanie wyniku bezpośrednio po reakcji oraz w trakcie jej przebiegu <p>[TAYLOR i in. 2001; IVORS, GARBELOTTI 2002; MALEWSKI i in. 2003]</p> |
| Uwagi Notes | Pozwala na określenie ilościowe patogenów w próbce. Najczęściej są to testy specyficzne dla rodzaju. Istnieje kilka testów specyficznych dla gatunków | Pozwala potwierdzić lub wykluczyć obecność danego patogenu w próbce. Wymagana jest znajomość gatunkowo – specyficznych starterów | Pozwala potwierdzić lub wykluczyć obecność żywego patogenu w próbce. Wymagana jest znajomość gatunkowo specyficznych starterów | Pozwala potwierdzić lub wykluczyć obecność DNA lub żywego patogenu i jego wyjściową ilość w próbce. Wymagana jest znajomość gatunkowo specyficznych starterów |
| Czas Time | 1-2 dni | 1-2 dni | 1-2 dni | 1 dzień |

Izolowanie polega na wykładaniu pobranej próbki na odpowiednie pożywki agarowe [SZKUTA 2004] i kolejne przeszczepianie rosnącej plechy, wykazującej cechy *Phytophthora*, na świeże pożywki. Często, ze względu na współwystępujące w badanym materiale bakterie i grzyby, należy dodatkowo stosować pożywki selekcyjne z antybiotykami. Do przeprowadzenia analiz może być potrzebne wstępne namnożenie patogena. Można tego dokonać przez pasażowanie izolatów na tkance rośliny podatnej na fytoftorozę. Szczególnie w przypadku wolno rosnącego *P. ramorum* pasażowanie przez roślinę „pułapkową” może zapobiec zarośnięciu mycelium przez inne szybciej rosnące patogeny [ORLIKOWSKI i in. 2005]. Po otrzymaniu czystej kultury patogena można przeprowadzać analizy cech morfologicznych i fizjologicznych (tab. 1) oraz biochemicznych i molekularnych (tab. 2).

Identyfikowanie patogena na podstawie cech morfologicznych i fizjologicznych, rodzi potrzebę stosowania analiz statystycznych dla określenia istotności różnic dla cech ilościowych [LEE i in. 1993]. Powyżej wymienione metody są tanie, lecz do ich stosowania wymagana jest znajomość mikologii i technik mikroskopowych.

Metody identyfikacji i detekcji *Phytophthora* spp. nie wymagające wyprowadzania czystych kultur patogenu

Zapobieganie fytoftorozom jest łatwiejsze dzięki stosowaniu metod wykrywających obecność patogenu w roślinie przed wystąpieniem objawów chorobowych oraz w podłożach i wodzie, przed ich użyciem w produkcji. Na detekcję pozwalają procedury nie wymagające izolowania patogenów z oryginalnej próbki. Opierają się one na określeniu obecności specyficznych dla gatunków markerów cząsteczkowych (molekularnych), np. przeciwciał, białek rozpuszczalnych lub kwasów nukleinowych [ORLIKOWSKA i in. 2005]. Techniki molekularne można łączyć ze sobą, co pozwala na zwiększenie czułości testów, np., łączenie PCR z testem ELISA [MARTIN i in. 2000], czy PCR z LCR oraz LCR z ELISA [TOOLEY i in. 2002]. Do zidentyfikowania patogenu tymi metodami potrzeba 1–2 dni, a w przypadku komercyjnego testu immunoenzymatycznego Pocket Diagnostic™ tylko kilku minut [HUGHES i in.]. Wadą ich jest dość wysoki koszt analizy, a w przypadku testów immunoenzymatycznych mała czułość. W tabeli 3 podano podstawowe techniki wykrywania patogenów bezpośrednio z badanej próby, lecz istnieje wiele ich odmian, dostosowanych dla poszczególnych gatunków, a mających na celu zwiększenie czułości testu lub skrócenie czasu analiz, np. multiplex PCR [IVORS, GARBELOTTO 2002] lub technologia mikromacierzy [SCHOEN i in. 2002].

Literatura

- ATKINS S.D., CLARK I.M. 2004. *Fungal molecular diagnostics: a mini review*. J. Appl. Genet. 45: 3–15.
- BARTNICKI-GARCIA S., WANG M.C. 1983. *Biochemical aspects of morphogenesis in Phytophthora*, w: *Phytophthora. Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Red. Erwin D.C., Bartnicki-Garcia S., Tsao P.H., APS PRESS, St. Paul, USA: 121–137.
- BIELENIEN A., JEFFERS S.N., WILCOX W.F., JONES A.L. 1988. *Separation by protein elec-*

trophoresis of six species of Phytophthora associated with deciduous fruit crops. Phytopathol. 78: 1402–1408.

BONANTS P.J.M., DE WEERDT M., BAAYEN R., DE GRUYTER H., MAN IN 'T VELD W.A., KROON L.P.N.M. 2002. *Molecular identification and detection of Phytophthora species and populations of P. ramorum.* Mat. konf. nauk. „Sudden Oak Death Science Symposium”, 15–18 XII 2002 Monterey, USA. <http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymp/paper/paper08.html>

BONANTS P.J.M., HAGENAR-DE WEERDT M., VAN GENT-PELZER M.P.E., LACOURT I., COOKE D.E.L., DUNCAN J.M. 1997. *The use of nested PCR for the detection of Phytophthora fragariae in strawberry,* w: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens.* Red.: Dehne H.-W. i in. Kluwer Acad. Publishers: 43–45.

BURNS R., GEORGE E. 1995. *The use of monoclonal antibodies for the detection of fungi.* Bull. OEPP/EPPD, 25: 31–37.

CAHILL D.M., HARDHAM A.R. 1994. *A Dipstick immunoassay for the specific detection of Phytophthora cinnamomi in soils.* Phytopathol. 84: 1284–1292.

CAVALIER-SMITH T. 1998. *A revised six-kingdom system of life.* Biol. Rev. 73: 203–266.

CHOWDAPPA P., BRAYFORD D., SMITH J., FLOOD J. 2003a. *Identification of Phytophthora species affecting plantation crops by RFLP of PCR-amplified internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA.* Curr. Sci. 85: 34–36.

CHOWDAPPA P., BRAYFORD D., SMITH J., FLOOD J. 2003b. *Identity of Phytophthora associated with arecanut and its relationship with rubber and cardamom isolates based on RFLP of PCR-amplified regions of rDNA and AFLP fingerprints.* Curr. Sci. 85: 585–587.

CHOWDAPPA P., BRAYFORD D., SMITH J., FLOOD J. 2003c. *Molecular discrimination of Phytophthora isolates on cocoa and their relationship with coconut, black pepper and bell pepper isolates based on rDNA repeat and AFLP fingerprints.* Curr. Sci. 84: 1235–1238.

CLARE B.G., ZENTMYER G.A. 1966. *Starch gel electrophoresis from species of Phytophthora.* Phytopathol. 56: 1334–1335.

COOKE D.E.L., DRENTI A., DUNCAN J.M., WAGELS G., BRASIER C.M. 2000. *A Molecular Phylogeny of Phytophthora and Related Oomycetes.* Fungal Genet. & Biol. 30: 17–32.

COOKE D.E.L., DUNCAN J.M. 1997. *Phylogenetic analysis of Phytophthora species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA.* Mycol. Res. 101: 667–677.

DICK M.W. 1997. *Fungi, flagella and phylogeny.* Mycol. Res. 101: 385–394.

DRENTI A., IRVIN J.A.G. 2001. *Routine DNA based diagnostic tests for Phytophthora.* Rural Industries Research & Development Corporation, Publ. No. 01/36: 1–18.

ERWIN D.C., RIBEIRO O.K. 1996. *Phytophthora Disease Worldwide.* APS PRESS, St. Paul, USA: 562 ss.

ÉRSEK T., SCHOELEZ J.E., ENGLISH J.T. 1994. *PCR Amplification of Species-Specific DNA Sequences Can Distinguish among Phytophthora Species.* Appl. Environ. Microbiol. 60: 2616–2621.

FALEIRO E.G., LUZ A.D.M.N., CERQUEIRA A.O., ROCHA C.S.S. 2003. *Uso de macadores RAPD na classificação de isolados de Phytophthora spp. causadores da podidão parda do cacauiero no Brasil.* Fitopatol. Bras. 28: 312–315.

- FERRARIS L., CARDINALE F., VALENTINO D., ROGGERO P., TAMIETTI G. 2004. *Immunological discrimination of Phytophthora cinnamomi from other Phytophthora pathogenic on chestnut*. J. Phytopathol. 152: 193–199.
- GARBELOTTO M., RIZZO D., HAYDEN K., MEJJA-CHANG M., DAVIDSON J.M., TJSOVOLD S. 2002. *Phytophthora ramorum and Sudden Oak Death in California: III. Preliminary Studies in Pathogen Genetics*. USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-184: 765–773.
- HALL G. 1993. *An intergrated approach to the analysis of variation in Phytophthora nicotianae and a redescription of the species*. Mycol. Res. 97: 559–574.
- HALL R., ZENTMYER G.A., ERWIN D.C. 1969. *Approach to Taxonomy of Phytophthora through Acrylamide Gel-Electrophoresis of Proteins*. Phytopathol. 59: 770–774.
- HENSON J.M., FRENCH R. 1993. *The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis*. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 81–109.
- HO H.H. 1981. *Synoptic keys to the species of Phytophthora*. Mycologia 73: 705–714.
- HO H.H., JONG S. C. 1987. *Critical problems in the taxonomy of Phytophthora species in culture*. Mycotaxon 29: 207–232.
- HUGHES K., ROBERTS K., GRIFFIN R., DANKS C., BOONHAM N., LANE C., BARKER J. *On-site diagnostics for Phytophthora ramorum*. http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/immun/documents/Ramorum_on-site.pdf.
- IVORS K., GARBELOTTO M. 2002. *TaqMan PCR for detection of Phytophthora DNA in Environmental Plant Samples*. Mat. konf. nauk. „Sudden Oak Death Science Symposium”, 15–18 XII 2002 Monterey, USA. <http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymp/poster/poster10.html>
- KIRK P.M., CANNON P.F., DAVID J.C., STALPERS J.A. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9th Edition., CABI Publishing: 624 ss.
- LANE C.R., BEALES P.A., HUGHES K.J.D., TOMLINSON J., INMAN A.J., WARWICK K. 2004. *First report of ramorum dieback (Phytophthora ramorum) on container-grown english yew (Taxus bacatta) in England*. Plant Pathol. 53: 522.
- LEE S.B., TAYLOR J.W. 1992. *Phylogeny of five fungus-like protocistian Phytophthora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA*. Mol. Biol. Evol. 9: 636–653.
- LEIPE D.D., WAINRIGHT P.O., GUNDERSON J.H., PORTER D., PATTERSON D.J., VALOIS F., HIMMERICH S., SOGIN M.L. 1994. *The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from Labyrinthuloides minuta and Cafeteria roenbergensis*. Phycologia 33: 369–377.
- LUO L., HO H.H., JONG S.C. 1988. *Study on the physiological characteristics of the genus Phytophthora*. Mycotaxon 32: 199–217.
- MALEWSKI T., MALEWSKA A., RUTKOWSKI R. 2003. *RT-PCR technique and its applications. State-of-the-art*. J. Anim. & Feed. Sci. 12: 401–412.
- MAN IN'T VELD W.A., VEENBAAS-RIJKS W.J., ILIEVA E., DE COCK A.W.A.M., BONANTS P.J.M., PIETERS R. 1998. *Natural hybrids of Phytophthora nicotianae and Phytophthora cactorum demonstrated by isozyme analysis and Random Amplified Polymorphic DNA*. Phytopathol. 88: 922–929.
- MAN IN'T VELD W.A., DE COCK A.W.A.M., ILIEVA E., LÉVESQUE C.A. 2002. *Gene flow analysis of Phytophthora porri reveals a new species: Phytophthora brassicae sp. nov.* Eu. J. Plant Pathol. 108: 51–62.

- MAROSZ A. 2002. *Perspektywy rozwoju szkótek roślin ozdobnych*. Ogródnictwo 1: 21–23.
- MAROSZ A. 2004. *Analiza szkółkarstwa ozdobnego w Polsce na tle wybranych krajów Unii Europejskiej*. Praca doktorska, Inst. Sadown. i Kwiciar. Skierniewice: 1–150.
- MARTIN R.R., JAMES D., LÉVESQUE C.A. 2000. *Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management*. Ann. Rev. Phytopathol. 38: 207–239.
- NEWHOOK F.J., WATERHOUSE G.M., STAMPS D.J. 1978. *Tabular key to the species of Phytophthora de Bary*. Mycol. Pap. 143. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, UK: 20 ss.
- ORLIKOWSKA T., WIEJACHA K., TRZEWIK A. 2005. *Zastosowanie markerów DNA do identyfikacji i detekcji gatunków z rodzaju Phytophthora*. Prace IBL (w druku).
- ORLIKOWSKI L.B., SZKUTA G. 2002a. *Fytofitorozy w szkółkach roślin ozdobnych w Polsce*. Prace IBL Ser. A, 2002/2: 134–137.
- ORLIKOWSKI L.B., SZKUTA G. 2002b. *Occurrence of Phytophthora cinnamomi on ericaceous plants in container-grown ornamental nurseries in Poland*. J. Plant Prot. Res. 42: 157–163.
- ORLIKOWSKI L.B., SZKUTA G. 2002c. *Isolation and identification of Phytophthora species from diseased plants in ornamental nurseries*. Phytopathol. Pol. 35: 183–190.
- ORLIKOWSKI L.B., WIEJACHA K., TRZEWIK A., SZKUTA G., ORLIKOWSKA T. 2005. *Isolation and identification of Phytophthora species from diseased plants in ornamental nurseries*. Phytopathol. Pol. (w druku).
- RIBEIRO O.K. 1978. *A Source Book of the Genus Phytophthora*. Cramer J., Vaduz: 417 ss.
- RISTAINO J.B., GUMPERTZ M.L. 2000. *New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus Phytophthora*. Annu. Rev. Phytopathol. 38: 541–546.
- SCOTT D.L., DEAIL K.L. 1998. *The detection of viable Phytophthora infestans using RT-PCR specific for diverged actin sequence*. Agric. Res. Service, <http://www.nalusda.gov/ttic/tektran/data000008/56/0000085634.html>
- SCHOEN C., VAN BEUNINGEN, DE WEERDT M., HILHORST R., CHAN A., BOENDER P., BONANTS P.J.M. 2002. *Multiplex detection of plant pathogens by micro-arrays: an innovative tool for plant health management*. COST Action 853 Meeting, 26–28 IX 2002 http://www.cost853.ch/pdf-files/Bonants_poster.pdf
- SHEW H.D., BENSON D.M. 1982. *Qualitative and quantitative soil assays for Phytophthora cinnamomi*. Phytopathol. 72: 1029–1032.
- SOGIN M.L., PATTERSON D.J. 2001. *Stramenopiles*. The Tree of Live Web Project 9 ed. R. Maddison, <http://tolweb.org/tree?group=Stramenopiles&contgroup=Eukaryotes>
- STAMPS D.J., WATERHOUSE G.M., NEWHOOK F.J., HALL G.S. 1990. *Revised tabular key to the species of Phytophthora*. Mycol. Pap.162. Commonw. Agric. Bur. Int., Kew, London, UK: 28 ss.
- STANGHELLINI M.E., NIELSEN C.J., KIM D.H., RASMUSSEN S.L., RORBAUGH P.A. 2000. *Influence of sub-versus top-irrigation and surfactants in a recirculating system disease incidence caused by Phytophthora spp. in potted plants*. Plant Dis. 84: 1147–1150.

- SZUKTA G. 2004. *Występowanie, izolacja, identyfikacja i szkodliwość gatunków z rodzaju Phytophthora w szkółkach ozdobnych roślin iglastych*. Praca doktorska, AR Kraków: 1–191.
- SZUKTA G., ORLIKOWSKI L.B. 2002. *Wprowadzenie do morfologii i identyfikacji gatunków z rodzaju Phytophthora*. Prace IBL Ser. A, 2002/2: 138–144.
- TAYLOR E., BATES J., KENYON D., MACCAFERRI M., THOMAS J. 2001. *Modern molecular methods for characterisation and diagnosis of seed-borne fungal pathogens*. J. Plant. Pathol. 83 (Special issue): 75–81.
- THIEMANN K., WERRES S., DIENER H.A., LÜTTMANN R. 2002. *Comparison of different methods to detect Phytophthora spp. in recycling water from nurseries*. J. Plant. Pathol. 84: 41–50.
- TOOLEY P.W., KYDE K.L., ENGLANDER L. 2004. *Susceptibility of selected ericaceous ornamental host species to Phytophthora ramorum*. Plant Dis. 88: 993–999.
- TOOLEY P.W., HATZILOUKAS E., SCOTT D.L., CARRAC M.M. 2002. *Use of ligase chain reaction for enhanced detection of Phytophthora infestans*. Can. J. Plant Pathol. 24: 294–301.
- TRIPATHI A., SINGH R., RAJ S.K., SINGH A.P., JOHRI J.K. 2003. *Molecular identification of Phytophthora nicotianae isolates causing leaf rot of betelvine (Piper betle L.)*. Curr. Sci. 84: 22–24.
- TSAO P.H. 1990. *Why many Phytophthora root rots and crown rots of trees and horticultural crops remain undetected*. Bulletin OEPP/EPPO 20: 11–17.
- WATERHOUSE G.M. 1963. *Key to the species of Phytophthora de Bary*. Mycol. Pap. 92. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, UK: 22 ss.
- WERRES S., MARTWITZ R., MAN IN'T VELD W.A., DE COCK A.W.A.M., BONANTS P.J.M., DE WEERDT M., THIEMANN K., ILIEVA E., BAAYEN R.P. 2001. *Phytophthora ramorum sp. nov., a new pathogen on Rhododendron and Viburnum*. Mycol. Res. 105: 1155–1165.
- WILCOX W.F. 1989. *Identity, virulence, and isolation frequency of seven Phytophthora spp. causing root rot of raspberry in New York*. Phytopathol. 79: 93–101.
- WINTON L.M., HANSEN E.M. 2001. *Molecular diagnosis of Phytophthora lateralis in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction*. For. Path. 31: 275–283.
- YAMAK F., PEEVER T.L., GROOVE G.G., BOAL R.J. 2002. *Occurrence and identification of Phytophthora spp. pathogenic to pear fruit in irrigation water in Wenatchee River Valley of Washington State*. Phytopathol. 92: 1210–1216.
- ZHANG Z.G., ZHANG J.Y., ZHENG X.B., YANG Y.W., KO W.H. 2004. *Molecular distinctions between Phytophthora capsici and Ph. tropicalis based on ITS sequences of ribosomal DNA*. J. Phytopathol. 152: 358–364.

Słowa kluczowe: identyfikacja i detekcja *Phytophthora* spp., markery molekularne, izoenzymatyczne, morfologiczne i fizjologiczne

Streszczenie

Liczba wykrywanych gatunków *Phytophthora* w polskich szkółkach oraz zakres roślin żywicielskich zwiększają się z każdym rokiem. Straty powodowane

przez fytoftorazy i brak możliwości diagnozowania na podstawie objawów chorobowych powodują konieczność zastosowania metod laboratoryjnych do szybkiej oceny materiału pod kątem zasiedlenia przez te patogeny. Ich identyfikację można przeprowadzać za pomocą analiz morfologicznych, fizjologicznych bądź biochemicznych i molekularnych. Wraz z rozwojem technik molekularnych, szczególnego znaczenia nabrało testowanie bazujące na analizie DNA [HENSON, FRENCH 1993; DRENTH, IRVIN 2001; TAYLOR i in. 2001; ATKINS, CLARK 2004]. Wszystkie proponowane metody rutynowego testowania materiału roślinnego, gleby i wody dla celów identyfikacji lub diagnostyki powinny być szybkie, powtarzalne, wykrywające patogeny w tkankach roślinnych, glebie i wodzie, możliwie mało zależne od umiejętności wykonującego test oraz tanie.

COMPARISON OF DIFFERENT IDENTIFICATION METHODS OF *Phytophthora* SPECIES IN NURSERY MATERIAL

Katarzyna Wiejacha, Teresa Orlikowska

Department of Ornamental Plants Biotechnology,
Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

Key words: *Phytophthora* spp. Identification and detection, molecular, isozymatic, morphological and physiological markers

Summary

A number of *Phytophthora* species isolated in Polish nurseries and a range of their host plants increase in each year. The economical importance of *Phytophthora* diseases and impossibility to diagnose on the basis of symptoms, cause the necessity to use laboratory methods for quick identification and detection of these pathogens. It is possible with the aid of morphological and physiological characters or with the use of biochemical or molecular tests. Recently, the most important are the methods based on the DNA analysis [HENSON, FRENCH 1993; DRENTH, IRVIN 2001; TAYLOR i in. 2001; ATKINS, CLARK 2004]. All the methods for mass diagnosis should be quick, repeatable, detecting a pathogen in the natural samples – plant tissue, soil and water, possibly cheap and less dependent on personal skilfulness.

Mgr inż. Katarzyna **Wiejacha**
Zakład Biotechnologii Roślin Ozdobnych
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa
ul. Waryńskiego 14
96-100 SKIERNIEWICE
e-mail: kwieja@insad.pl