

TRADYCYJNE I NOWOCZESNE METODY DIAGNOSTYCZNE STOSOWANE W OCHRONIE ZIEMNIAKA PRZED CHOROBYMI O PODŁOŻU GRZYBOWYM I BAKTERYJNYM

mgr inż. Anna Łozowska, mgr inż. Hanna Gawińska-Urbanowicz
IHAR-PIB, Pracownia Ochrony Ziemniaka w Boninie
e-mail: anna.lozowska90@gmail.com

Streszczenie

Metody diagnostyczne stosowane w ochronie ziemniaka są podstawą skutecznej ochrony plantacji przed agrofagami. Podzielić je można na tradycyjne, używane od dawna, i nowoczesne, które bardzo dynamicznie rozwijają się w ostatnich kilku latach. Kontrola stanu plantacji jest działaniem niezbędnym, służącym zminimalizowaniu rozprzestrzeniania się chorób o podłożu bakteryjnym i grzybowym. Metody stosowane od wielu lat to m.in. obserwacje w terenie oraz badania laboratoryjne wykonywane tradycyjnie. Ocena makroskopowa umożliwia wstępną identyfikację uszkodzeń. W nowoczesnej diagnostyce stosuje się metody oparte na technice PCR. Charakteryzują się one krótkim czasem wykonania i wysoką czułością, co wpływa na coraz częstsze zastępowanie tradycyjnych metod molekularnymi. Jednak metody badawcze stosowane od wielu lat mogą sprawnie uzupełniać i potwierdzać badania wykonywane w nowoczesnych laboratoriach.

Słowa kluczowe: bakterie, diagnostyka, obserwacje, patogeny, PCR, zarodniki, ziemniak

Ziemniak pospolity, *Solanum tuberosum*, jak również inne rośliny uprawne, jest atakowany przez sprawców wielu

groźnych chorób. Patogeny bardzo często są przenoszone wraz z sadzoniakami na kolejny sezon lub zimują na resztkach po-

źniwnych pozostawionych w glebie (Kapsa 2012).

W Polsce przeciętne plony ziemniaka w ostatnich latach są na stałym poziomie 17-20 t/ha. Jedną z przyczyn osiągania niskich plonów jest niedostateczna ochrona przed agrofagami. Jest to jeden z czynników decydujących o wielkości oraz opłacalności uprawy (Kapsa 2012). W Polsce i na świecie ogromne zagrożenie dla plantacji stanowi *Phytophthora infestans*, sprawca zarazy ziemniaka. Większego znaczenia nabierają również grzyby z rodzaju *Alternaria*, które są sprawcami alternariozy. Coraz wcześniejsze występowanie chorób powoduje potrzebę zmian w ochronie plantacji. Równoczesne występowanie na roślinach ziemniaka wielu chorób, których objawy są często bardzo podobne do siebie, wymaga od producenta nie tylko poznania objawów chorób w celu ich identyfikacji, ale też zastosowania właściwej ochrony. Dlatego diagnostyka staje się jednym z ważnych elementów w nowoczesnej ochronie roślin. W celu podniesienia jej jakości poszukiwane są możliwie najkorzystniejsze rozwiązania, które polepszą wykrywalność i identyfikację groźnych patogenów (Kapsa 2004).

Ważniejsze choroby na plantacjach ziemniaka i ich makroskopowa diagnostyka

Pośród patogenów możemy wyróżnić te, w wyniku działania których następuje zmniejszenie obsady roślin na polu w czasie wschodów, a także zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej, co prowadzi do zbyt wczesnego zatrzymania przyrostu plonu. Również okres przechowywania bulw sprzyja ich porażeniu (Walczak 2010). Ziemniaki, w porównaniu z większością upraw rolniczych, mają długi okres przechowywania. Wynika to z ich właściwości fizycznych i budowy. Bulwy są organami spichrzowymi, których celem jest magazynowanie rezerw pożywienia. Strukturalnie są w naturalny sposób tak skonstruowane, by przetrwać co najmniej do kolejnego sezonu wegetacyjnego, aby ponownie kiełkować i rozpocząć kolejną generację. Uszkodzenie bulw po zbiorach może przyczynić się do rozwoju chorób przechwalniczych. Niezbędna jest kontrola i minimalizowanie uszkodzeń mechanicznych

podczas zbioru i obróbki, by zmniejszyć ryzyko rozprzestrzeniania się chorób bakteryjnych (Jobling 2000).

Najważniejszymi chorobami o podłożu grzybowym i bakteryjnym występującymi na plantacji ziemniaka są:

- **mokra zgnilizna** – wywołwana przez bakterie z rodzaju *Pectobacterium*, które porażają sadzeniaki, co może powodować braki wschodów. Rozwój bakterii w sprzyjających warunkach zmienia bulwy mączne w miękką, rozpadającą się, cuchnącą masę;
- **sucha zgnilizna** – sprawcami są grzyby z rodzaju *Fusarium*. Powoduje straty bulw podczas przechowywania oraz braki wschodów. W Polsce najczęstszymi jej sprawcami są *Fusarium sulphureum*, *F. solani* var. *coeruleum* oraz *F. avenaceum*;
- **parch srebrzysty** – wywołwany przez grzyb *Helminthosporium solani*. Silne porażenie skutkuje brakiem kiełkowania bulw. Choroba jest widoczna na bulwach w postaci okrągłych lub nieregularnych srebrzystych plam (Kapsa 2012). Srebrzysty wygląd, w przypadku starszych zmian, jest najbardziej widoczny, gdy bulwa jest mokra. Srebrne zmiany zwykle pozostają powierzchniowe, nie uszkodzają tkanek leżących głębiej. Jednak w niektórych przypadkach tkanki znajdujące się pod miejscem zmienionym na powierzchni skórki pozostają lekko odbarwione (Hamm i in. 2013). *H. solani* wywołuje jedną z groźniejszych chorób skórki bulw, która stanowi największe zagrożenie w okresie przechowywania (Lutomirska, Szutkowska 2005);
- **parch zwykły** – częsta choroba upraw ziemniaka na całym świecie, wywołwana przez *Streptomyces* spp. – bakterie Gram dodatnie. Źródłem infekcji może być gleba lub porażone sadzeniaki (Flores-Gonzalez i in. 2008). Zmiany na skutek rozwoju parcha zwykłego to różnych rozmiarów brunatne, szorstkie strupy na skórce, które niekiedy mogą być dość głębokie (Johnson, Lambert 2010);
- **rizoktonioza ziemniaka** – wywołwana przez grzyb *Rhizoctonia solani*, który powoduje gnicie kiełków; powstają stopniowo powiększające się brunatne wgłębione plamki. *R. solani* jest patogenem odpowiedzialnym za zmiany martwicze w podziemnych częściach roślin (próchnienie podstawy łodyg).

Atakuje rozwijające się rozłogi, zatrzymując ich rozwój. Pod koniec okresu wegetacji na bulwach mogą tworzyć się różnej wielkości i grubości czarne strupy. Są to sklerocja, które są jednym z ważniejszych źródeł infekcji, mogących spowodować straty w kolejnym sezonie wegetacyjnym (Bernat 2005);

- **zaraza ziemniaka** – sprawcą jest organizm grzybopodobny *Phytophthora infestans*. Objawy są widoczne na liściach, łodygach i bulwach (Kapsa 2012). Powoduje zmiany, widoczne początkowo jako zielonkawe plamki, które z biegiem czasu przekształcają się w brunatne plamy. Na brzegach plam na spodniej stronie liścia można zaobserwować delikatny biały nalot grzyba (Sedlakova i in. 2011). Bardzo często silnie porażone łodygi ulegają przełamaniu w miejscu, w którym wystąpiła choroba. W korzystnych warunkach dla rozwoju patogenu liście i łodygi ziemniaka obumierają, czemu towarzyszy zapach zgnilizny (Kurzwinińska 2012b);

- **czarna nóżka** – powodowana przez bakterie z rodzaju *Pectobacterium*. Zainfekowane rośliny mają zahamowany wzrost, a liście – jasnozielone lub żółte – zwijają się. U podstaw łodyg widoczne są ciemne lub czarne mokre plamy (Kapsa 2012);

- **alternarioza ziemniaka** – wywołwana przez gatunki grzyba *Alternaria alternata* i *A. solani*, sprawców brunatnej i suchej plamistości liści (Kapsa 2012). Jest jedną z chorób, która działa najbardziej destrukcyjnie na powierzchnię liści ziemniaka. W odmianach podatnych może prowadzić do wczesnej defoliacji, a w rezultacie do zamierania upraw (Runno-Paurson i in. 2014). Oba gatunki infekują rośliny przez zarodniki, które wraz z ruchem mas powietrza rozprzestrzeniają się na plantacji, osiadając na roślinach. Prowadzi to do powstania objawów martwych (Leminger i in. 2010).

Grzyb *A. alternata* występuje najpowszechniej spośród wszystkich gatunków z rodzaju *Alternaria*. Często jest spotykany na rzepaku jako sprawca czerni krzyżowych, a w okresach o dużej wilgotności powietrza także na wszystkich gatunkach zbóż (Stępniewska-Jarosz, Rataj-Guranowska 2012). *A. solani* jest patogenem, który atakuje rośliny należące do rodziny psiankowatych i wywołuje suchą plamistość liści. Powstałe plamy

pojawiają się najpierw na dolnych liściach, niekiedy mogą wystąpić również na łodygach. Patogen zimuje w bulwach oraz na fragmentach porażonych roślin (Kurzwinińska 2012a).

Monitoring zagrożeń plantacji ziemniaka

W celu poznania zagrożeń ze strony agrofagów mogących zaatakować plantację podstawowym działaniem jest ich monitoring, czyli systematyczne obserwacje w agrosystemach. Uzyskane w ten sposób dane mogą być podstawą podejmowania decyzji o konieczności wykonania zabiegów ochrony w optymalnym terminie. Stałe obserwacje występowania i nasilenia agrofagów są szczególnie ważne w celu uniknięcia strat w plonie.

1. Obserwacje polowe. Systematyczne obserwacje agrofagów przez cały sezon wegetacyjny umożliwia poznanie aktualnych zagrożeń dla roślin, wynikających z występowania chorób i szkodników. Określa się również ich szkodliwość i moment przekroczenia progu ekonomicznej szkodliwości. Monitoring agrofagów prowadzony jest w celu:

- zdobycia informacji o aktualnym stanie roślin;
- przewidzenia takiego stopnia nasilenia choroby, przy którym należy rozpocząć chemiczne zwalczanie;
- wyznaczenia optymalnego terminu zabiegów ochrony.

Obserwacje bezpośrednie w polu polegają na ocenie występowania stadiów choroby. Nie jest wymagane w tym celu stosowanie jakichkolwiek aparatów czy urządzeń. Obserwacjami takimi mogą być np.: lustracja roślin w celu odnalezienia objawów choroby, analiza gleby na obecność drutowców czy pędraków, stwierdzenie nalotu mszyc na plantację (Walczak 2010). Poza oceną występowania chorób na plantacji dokonuje się również oceny wschodów czy kwitnienia.

Ocena makroskopowa jest prowadzona przez wykwalifikowaną kadrę, pozwala na wstępną identyfikację objawów chorobowych lub uszkodzeń. Ma również na celu fitosanitarną ocenę próby materiału roślinnego. Możliwa jest też hodowla organizmów szkodliwych w warunkach kontrolowanych do stadium, które pozwoli na ich oznaczenie

(Dz. U. 2016 poz. 17 ze zm., Dz. U. 2008 nr 122 poz. 789).

Obserwacje polowe prowadzone są w powtórzeniach. Porażenie roślin ocenia się w takich samych, stałych odstępach czasu, a nasilenie choroby przedstawia jako stosunek procentowy roślin chorych do liczby roślin obserwowanych na danym poletku. Rozwój chorób, takich jak alternarioza czy zaraza, ocenia się w skali 9-stopniowej, w której 9 oznacza najmniejsze porażenie roślin, a 1 – całkowite zniszczenie rośliny (Gawińska-Urbanowicz 2010).

Stopień porażenia odmian przez choroby można ocenić również po zbiorze. Ocenia się go na próbach wielkości ok. 10 kg bulw, które pobierane są z każdego poletka podczas zbioru. Oceniać porażenie bulw można zarówno jesienią po zbiorach, jak i wiosną po okresie przechowywania. Określa się występowanie takich chorób, jak: mokra i sucha zgnilizna, parch zwykły, parch srebrzysty czy ospowatość bulw (Gawińska-Urbanowicz 2007).

Do określania fazy rozwojowej roślin w okresie wegetacyjnym wykorzystywana jest skala BBCH.

2. Zbiór i pomiary zawartości zarodników grzybów w powietrzu. Do oceny nasilenia występowania zarodników grzybów w powietrzu wykorzystuje się różne metody. Obecnie zalecane są wolumetryczne, które polegają na pobieraniu prób powietrza o określonej objętości. Urządzeniem służącym do tego jest pułapka Burkarda. Siedmiodniowa pułapka zasysa powietrze, dzięki wąskiemu wcięciu, wraz z cząstkami biologicznymi znajdującymi się w powietrzu. Zebrany materiał pozwala na ocenę występowania zarodników w powietrzu w danym dniu i godzinie. W ten sposób z dużą dokładnością można ustalić średnie dobowe stężenie zarodników w 1 m³ powietrza (Gawińska-Urbanowicz 2015). Bęben, na który jest przyklejona taśma, obraca się z prędkością 2 mm na godzinę. W tygodniowych odstępach taśma jest wyjmowana z bębna, a następnie cięta na 48-milimetrowe odcinki, które odpowiadają 24 godzinom pracy pułapki. Wycinki taśmy przygotowuje się odpowiednio do obserwacji mikroskopowych, tworząc z nich trwałe preparaty (Kapsa 2007).

3. Badania laboratoryjne. W wielu wy-

padkach rozpoznanie sprawców choroby po objawach na roślinie jest niemożliwe, np. ze względu na stan materiału roślinnego lub wtórne infekcje spowodowane przez innych sprawców. Rozwiązaniem pozwalającym na identyfikację sprawców są badania laboratoryjne. Duża część organizmów grzybowych występujących na ziemniaku nadaje się do badań laboratoryjnych bez specjalnego ich przygotowania. Aby wykonać preparat mikroskopowy do obserwacji, wystarczy pobrać materiał z miejsca infekcji i umieścić w kropli wody na szkiełku mikroskopowym, nałożyć szkiełko nakrywkowe i przycisnąć z odpowiednią siłą, by pozbyć się pęcherzyków powietrza. Preparaty można odpowiednio utrwalić, by służyły przez wiele miesięcy. Do tego celu wykorzystuje się często mieszaninę glicerolowo-żelatynową. Zazwyczaj preparaty wykonywane z grzybni lub zarodników grzyba nie wymagają barwienia, jednak jeśli kolor strzępek grzyba jest jedną z cech, które służą do jego identyfikacji, barwienia należy unikać. Najczęściej stosowanym barwnikiem jest błękit bawełniany rozpuszczony w laktofenolu.

W celu określenia gęstości zawiesiny komórek lub zarodników liczy się komórki lub kolonie. Często niezbędne jest bezpośrednio liczenie komórek. Używa się wówczas komory Burkera. W warunkach laboratoryjnych grzyby mogą być hodowane na różnego rodzaju podłożach. W zależności od pochodzenia użytych do wykonania pożywki składników można wyróżnić podłoża naturalne, półsyntetyczne i syntetyczne. Większość pożywek może być zanieczyszczona mikroorganizmami, dlatego też przed użyciem muszą być sterylizowane. Najczęściej przeprowadza się sterylizację cieplną za pomocą pary wodnej w aparacie Kocha, jednak w urządzeniu tym temperatura pożywki płynnej może osiągnąć tylko 100°C (Kiraly i in. 1977).

Odpowiednio przygotowany preparat pozwala na podstawie licznych cech identyfikacyjnych (np. barwa grzybni, kształt zarodników) na rozpoznanie sprawcy.

Podczas obserwacji laboratoryjnych, na sztucznych pożywkach, grzyb *Alternaria alternata* widoczny jest w formie czarnych, oliwkowozielonych lub szarych kolonii o watawatej strukturze. Konidia mogą przybierać

różne kształty, często o krótkich stożkowatych lub walcowatych dzióbkach, o ścianach gładkich lub szorstkich. Zarodniki mają poprzeczne przegrody (Stępniewska-Jarosz, Rataj-Guranowska 2012). *Alternaria solani* tworzy czarnoszare lub oliwkowobrunatne kolonie. Trzonki konidialne, które wytwarza, są krótkie, najczęściej proste, lecz zdarzają się również rozgałęzione. Zarodniki konidialne są jasnobrunatne lub oliwkowe, duże, maczugowate, z licznymi przegrodami poprzecznymi (Kurzawińska 2012).

Grzyby z rodzaju *Fusarium* w warunkach laboratoryjnych rosną szybko, obficie zarodnikując. Grzybnia bardzo często jest puszysta i gęsta. Przybiera wiele barw, często różnorodnie rozłożonych w częściach centralnych oraz na brzegach kolonii (Pieczul i in. 2012).

W warunkach laboratoryjnych na pożywkach kolonie *Phytophthora infestans* rosną dość wolno. Tworzą zwarte kultury, białe, watawate. Widoczne są zarodniki, o cienkich ścianach i kształcie przypominającym cytrynę (Kurzawińska 2012).

Grzybnia wytworzona przez *Rhizoctonia solani* początkowo jest bezbarwna, w późniejszym okresie przybiera barwy od jasnego do ciemnego brązu. Zbudowana jest z wydłużonych komórek i rozgałęzień. Każda z komórek jest na końcu przewężona oraz zaopatrzona w poprzeczną przegrodę, umiejscowioną w pobliżu miejsca połączenia z komórką sąsiednią (Stępniewska-Jarosz 2012).

Na pożywkach grzyb *Helminthosporium solani* tworzy kolonie o strukturze włochatej. Po 10 dniach grzybnia widoczna jest jako szara, płaska, o białym brzegu (Łukaszewska-Skrzypniak 2012).

Hodowla bakterii i grzybów możliwa jest na powszechnie używanych w mikrobiologii podłożach. Niezbędne jest podanie mikroorganizmom składników niezbędnych do ich rozwoju, takich jak np. związki węgla i azotu. Do pożywek dodaje się również pewne witaminy lub inne składniki wzrostowe. Podłoża do takiej hodowli można wykonać samemu lub skorzystać z gotowych preparatów fabrycznych, w postaci proszku. Do preparatów gotowych, oferowanych przez producentów, wystarczy dodać odpowiednią ilość wody, następnie gotować i sterylizować pożywkę.

Większość patogenicznych bakterii dobrze się rozwija na pożywkach zawierających bulion odżywczy zestalony agarem. Można się posługiwać także agarem ziemniaczano-glukozowym używanym do hodowli grzybów. Większość grzybów hodowanych w warunkach laboratoryjnych najlepiej rośnie na pożywkach, w skład których wchodzi naturalne, podstawowe produkty, jak np. ekstrakty roślinne (Király i in. 1977).

Przykładem podłoża gotowego, wykorzystywanego do hodowli *A. alternata*, *F. sulphureum* i *H. solani*, może być pożywka dekstrozowo-ziemniaczana (PDA). Składnikami są: 39 g gotowego preparatu pożywki PDA oraz 1000 ml wody destylowanej. Do hodowli *A. solani* wykorzystuje się pożywkę Synthetic Nutrient, której składnikami są: glukoza, sacharoza, KH_2PO_4 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , agar, 1 M NaOH , 1000 ml wody destylowanej. Do hodowli bakterii można wykorzystać pożywkę NUTRIENT AGAR, w skład której wchodzi ekstrakt z wołowiny, pepton i agar. Do wzrostu *P. infestans* używa się pożywki żytniej składającej się z 20 g agaru, 20 g sacharozy, 60 g ziarna żyta i 1000 ml wody.

4. Metody molekularne. Są patogeny, które powodują choroby na plantacji trudne do opanowania ze względu na brak wydajnych środków diagnostycznych do obróbki chemicznej w warunkach polowych. Wykrycie tych chorób wymaga wysokiego poziomu specyficzności, wysokiej czułości, a także dużej szybkości reakcji (Lopez i in. 2003).

Metody stosowane obecnie w celu wykrycia i identyfikacji patogenów ziemniaka oparte są na technice PCR. Zalicza się je do metod molekularnych, które cieszą się popularnością głównie ze względu na dużą czułość i znaczne skrócenie procedury badawczej. Metoda PCR jest oparta na łańcuchowej reakcji termostabilnego enzymu, jakim jest polimeraza. Doprowadza się do powielenia, czyli amplifikacji fragmentu genomu, który pochodzi z poszukiwanego organizmu. W wyniku amplifikacji uzyskuje się miliardy kopii fragmentu badanego genomu. W teście PCR analizuje się, a także wykorzystuje określone sekwencje kwasów nukleinowych.

Aby możliwa była synteza dużej liczby kopii badanego fragmentu DNA, przygotowuje się ściśle określoną mieszaninę reakcyjną,

która składa się z:

- matrycy, czyli odcinka DNA pochodzącego z danego patogenu;
- starterów, czyli fragmentów DNA, które pasują do określonych fragmentów matrycy;
- trójfosforanów, które są budulcem nowej nici DNA;
- polimerazy.

Poza właściwie dobraną mieszaniną reakcyjną konieczne jest stworzenie odpowiednich warunków temperaturowych. Do tego celu wykorzystuje się odpowiednio przystosowane urządzenie – termocykler. Umożliwia ono szybkie i bardzo precyzyjne zmiany temperatury na poszczególnych etapach reakcji (Chołuj, Przewodowski 2014).

Rozwój i wykorzystanie diagnostyki opartej na DNA wymaga zazwyczaj trzech podstawowych etapów:

- wyboru specyficznych sekwencji kwasu nukleinowego, które mają być zastosowane do identyfikacji patogenu;
- ekstrakcji DNA z próbki;
- określenia obecności docelowej sekwencji w próbce (McCartney i in. 2003).

Reakcja ta jest techniką, która bardzo szybko stała się jedną z najczęściej stosowanych w biologii molekularnej, ze względu na jej szybkość, łatwość wykonania i stosunkowo niewielki koszt. Dzięki jej zastosowaniu mogą być wykorzystane nawet niewielkie ilości materiału źródłowego DNA, nawet gdy źródło DNA jest dość słabej jakości (Joshi 2010).

Klasyczna metoda PCR składa się z trzech powtarzanych cyklicznych etapów. Każdy z nich wyróżnia się ściśle dobraną temperaturą oraz czasem inkubacji. Na każdym etapie można wyróżnić:

- rozpad DNA, czyli denaturację, która zachodzi w temperaturze 90-95°C;
- przyłączanie starterów, w temperaturze 40-65°C;
- wydłużanie łańcucha DNA, syntezę DNA, która zachodzi w temperaturze ok. 72°C (Chołuj, Przewodowski 2014).

Metodę PCR z biegiem czasu zaczęto ulepszać w celu uzyskania jak najwyższej czułości, a także eliminacji błędnych wyników. Powstało wiele nowych wariantów ww. testu. Przykładami modyfikacji mogą być następujące warianty metody PCR:

- Multiplex PCR – podczas testu możliwe

jest jednoczesne wykrywanie sekwencji DNA patogenu oraz amplifikacja DNA rośliny;

- PCR-ELISA – łączy metody molekularne i serologiczne. Dzięki niej możliwa jest eliminacja reakcji fałszywie pozytywnych oraz wewnętrzna kontrola amplifikacji;

• IC-PCR – przyjmuje się, że może być aż 50-krotnie czulsza od standardowego testu PCR;

- RT-PCR – oparta jest na amplifikacji materiału genetycznego przy udziale sond, które są znakowane fluorescencyjnie. Następnie mierzone jest natężenie emisji światła, które ma odpowiednią długość fali. Możliwa jest obserwacja przyrostu produktu podczas trwania reakcji. Skrócony jest w dużym stopniu czas reakcji (Przewodowski, Przewodowska 2012). RT-PCR jest testem diagnostycznym, który pozwala również na obserwację rozwoju chorób grzybowych. Ta technika może być stosowana w kontroli rutynowej na ich obecność na plantacji. Stanowi użyteczne narzędzie do rozpoznawania, a także opracowywania technologii ochrony roślin zainfekowanych przez organizmy grzybowe (Leminger i in. 2014).

Stosuje się także inne metody, oparte na fluorescencyjnej hybrydyzacji, np. FISH, BIO-PCR, NASBA. Ograniczeniami w stosowaniu wszystkich wymienionych wcześniej metod opartych na technice PCR mogą stać się inhibitory polimerazy DNA czy zanieczyszczenie obcym, obecnym w laboratorium DNA (Przewodowski, Przewodowska 2012).

Podsumowanie

Prawidłowa diagnostyka jest podstawą skutecznej ochrony plantacji ziemniaka. Do dyspozycji są metody zarówno tradycyjne, stosowane od lat, jak i nowoczesne, które rozwinęły się bardzo dynamicznie w ostatnich latach. Metodami stosowanymi już od dawna do identyfikacji i eliminacji patogenów są obserwacje w terenie czy tradycyjne badania laboratoryjne. Najnowocześniejsze w diagnostyce chorób ziemniaka są metody molekularne. Jest to dział diagnostyki, który rozwija się obecnie bardzo dynamicznie.

Diagnostyka oparta na PCR charakteryzuje się wysoką czułością i znacznym skróceniem procedury badawczej. Pojawiły się różne odmiany tej techniki, które stosujemy w

zależności od specyficznych potrzeb. Procedura będzie się różnić w zależności od rodzaju patogenu, który zaatakował badaną plantację. Rozwiązania oparte na metodzie PCR wymagają niekiedy dużych nakładów finansowych, co może stanowić ograniczenie w ich stosowaniu. Niezbędne jest także odpowiednie przygotowanie pracownika.

Diagnostyka oparta na metodach badawczych stosowanych od lat wymaga dużo większego nakładu czasu i pracy w porównaniu z metodami nowoczesnymi. Brak w niej specjalistycznych, nowoczesnych urządzeń i rozwiązań. Może ona jednak sprawnie uzupełniać i potwierdzać badania wykonane w nowoczesnym laboratorium badawczym.

Literatura

- Bernat E. 2005.** Występowanie ospowatości (*Rhizoctonia solani*) na bulwach wybranych odmian ziemniaka. – Biul. IHAR 237/238: 195-199; **2. Choluł J., Przewodowski W. 2014.** Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. – Ziemn. Pol. 3: 40-45; **3. Flores-Gonzalez R., Valesco I., Montes F. 2008.** Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. – Plant Pathol. 57: 162-169; **4. Gawińska-Urbanowicz H. 2007.** Ocena występowania chorób grzybowych i bakteryjnych ziemniaka w warunkach polowych. – Biul. IHAR 243: 191-197; **5. Gawińska-Urbanowicz H. 2010.** Nasilenie występowania i szkodliwość chorób ziemniaka na terenie Polski w latach 2005-2009. – Ziemn. Pol. 4: 1-7; **6. Gawińska-Urbanowicz H. 2015.** Wykorzystanie pułapki Burkarda do oceny stężenia zarodników z rodzaju *Alternaria*. – Ziemn. Pol. 1: 18-21; **7. Hamm P., Johnson D., Miller J, Olsen N., Nolte P. 2013.** Silver Scurf Management in Potatoes. A Pacific Northwest Extension Publication, PNW 596; **8. Jobling J. 2000.** Potatoes: Handle with care. – Good Fruit and Vegetables Mag. 11(4): 34-35; **9. Johnson S., Lambert D. 2010.** Common Scab Disease of Potatoes. Potatoes Bull. 2440 The University of Maine; **10. Joshi M. 2010.** Polymerase Chain Reaction: Methods, principles and application. – Int. J. Biomed. Res. 1(5): 81-97; **11. Kapsa J. 2004.** Nowe problemy w ochronie upraw ziemniaka przed alternariozą i zarazą – Biul. IHAR 232: 315-324; **12. Kapsa J. 2007.** Zastosowanie pułapki Burkarda do określania składu gatunkowego rodzaju *Alternaria* w uprawach ziemniaka. – Biul. IHAR 244: 223-229; **13. Kapsa J. 2012.** Ochrona ziemniaka przed chorobami grzybowymi i bakteryjnymi. [W:] Produkcja i rynek ziemniaka. Red. nauk. J. Chotkowski. Wyd. Wieś Jutra Warszawa: 140-155; **14. Kiraly Z., Klement Z., Solymosy F., Voros J. 1977.** Fitopatologia – wybór metod badawczych, PWRiL Warszawa: 257-269; **15. Kurzawińska H. 2012a.** *Alternaria solani*. [W:] Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wyd. Nauk. Poznań: 28-32; **16. Kurzawińska H. 2012b.** *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. [W:] Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wyd. Nauk. Poznań:144-147; **17. Leminger J., Bahnweg G., Hausladen H. 2010.** Population genetics – consequences on early blight disease. PPO – Special Report No. 14: 171-178; **18. Leminger J., Bahnweg G., Hausladen H. 2014.** Differentiation of *Alternaria* species and quantification of disease development using real-time PCR. PPO – Special Report No. 16: 189-194; **19. Lopez M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorris M. T., Llop P., Penyalver R., Cambra M. 2003.** Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. – Int. Microbiol. 6: 233-243; **20. Lutomirska B., Szutkowska M. 2005.** Wpływ gleby i wybranych zabiegów agrotechnicznych na porażenie bulw parchem srebrzystym (*Helminthosporium solani*). – Ziemn. Pol. 3: 20-22; **21. Łukaszewska-Skrzypniak N. 2012.** *Helminthosporium solani*. [W:] Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wyd. Nauk. Poznań: 107-110; **22. McCartney H., Foster S., Fraaije B., Ward E. 2003.** Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. – Pest Manag. Sci. 59: 129-142; **23. Pieczul K., Łukaszewska-Skrzypniak N., Stępniewska-Jarosz S. 2012.** *Fusarium avenaceum* (Corda ex Fr.) Sacc. [W:] Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wyd. Nauk. Poznań: 71-75; **24. Przewodowski W., Przewodowska A. 2012.** Wykorzystanie biochemicznych i molekularnych metod w diagnostyce patogenów oraz identyfikacji jednorodności odmianowej ziemniaka. [W:] Produkcja i rynek ziemniaka. Red. nauk. J. Chotkowski. Wyd. Wieś Jutra Warszawa: 57-66; **25. Rozp. Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 24 czerwca 2008 r. w sprawie stawek opłat za usługi świadczone przez Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa oraz wydawanie etykiet, paszportów roślin lub plomb urzędowych. – Dz. U. 2008 nr 122 poz. 789; **26. Runno-Paurson E., Hansen M., Tein B., Loit K., Jogi K., Luik A., Metspalu L., Eremeev V., Williams I., Mand M. 2014.** Cultivation technology influence the occurrence of potato early blight (*Alternaria solani*) in an organic farming system. Zemdirbyste-Agriculture 101, 2: 199-204; **27. Sedlakova V., Dejmalova J., Hausvater E., Sedlak P, Dolezal P., Mazakova J. 2011.** Effect of *Phytophthora infestans* on potato yield in dependence on variety characteristics and fungicide**

control. – Plant Soil Environ. 57: 486-491; **28. Stępniewska-Jarosz S. 2012.** *Rhizoctonia solani*. [W:] Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wyd. Nauk. Poznań: 158-163; **29. Stępniewska-Jarosz S., Rataj-Guranowska M. 2012.** *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. [W:] Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wyd. Nauk. Poznań: 7-11; **30. Ustawa o ochronie roślin** z dnia 18 grudnia 2003 r. – Dz. U. 2016 poz. 17, ze zm.; **31. Walczak F. 2010.** Monitoring agrofagów roślin uprawnych. [W:] Wybrane zagadnienia ochrony roślin w rolnictwie ekologicznym i integrowanej ochronie roślin. Red. E. Matyjaszczyk, A. Tratwal, F. Walczak. IOR Poznań: 41-47