

TOMASZ OSZAKO

## Przydatność pułapek roślinnych i pożywki ziemniaczano-glukozowej do izolacji *Phytophthora alni* z porażonych tkanek olszy oraz z gleby

The usefulness of traps and PDA medium for *Phytophthora alni* isolation from infected tissues and soil

### ABSTRACT

Oszako T. 2006. Przydatność pułapek roślinnych i pożywki ziemniaczano-glukozowej do izolacji *Phytophthora alni* z porażonych tkanek olszy oraz z gleby. Sylwan 4: 59-64.

The purpose of the study was to determine the usefulness of green apples as well as leaves of rhododendron as trapping methods for isolation of *Phytophthora alni* in disease tissues and in the soil. Apple traps as well as rhododendron leaves may be used successfully for isolation of the pathogen from roots, stem collar and from the soil, respectively. Such baits are particularly recommended for pathogen isolation from mature trees what is usually more difficult than in the case of seedlings. Apart of *P. alni*, faster growing of *Fusarium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Chaetomium* and *Trichoderma* species on PDA medium were also isolated from the base of stems of diseased alders. It could be also the reason why *P. alni* was not always isolated from diseased tissues.

### KEY WORDS

*Phytophthora alni*, biological traps: apple, rhododendron leaves

### ADDRESSES

Tomasz Oszako – Zakład Fitopatologii Leśnej; Instytut Badawczy Leśnictwa;  
ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3; 00-973 Warszawa; e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

### Wstęp

Izolacja i określenie rodzaju i gatunku czynnika chorobotwórczego, a zwłaszcza *Phytophthora* spp., stanowi często znaczny problem. Od co najmniej 50 lat do izolacji *Phytophthora* spp. z porażonych roślin i gleby stosuje się pożywki agarowe oraz rośliny pułapkowe. Używanie tradycyjnych pożywek agarowych sprawia często kłopoty z izolacją *Phytophthora* spp. Z tego powodu, obok stosowania pożywek selekcyjnych, poszukuje się również roślin pułapkowych do izolacji tej grupy patogenów. Według Ribeiro [1978] dobra roślina pułapkowa powinna charakteryzować się wrażliwością na poszukiwany patogen, być łatwo dostępna przez cały sezon wegetacyjny oraz tania. Jako pułapki stosowano z powodzeniem rośliny lub ich części oraz owoce, np. jabłka, gruszki, awokado, cytryny, ogórki, ale również siewki łubinu, lucerny, soi, awokado, poziomki bądź też igły sosny, liście np. różanecznika lub dębu [Harris, Bielenin 1986; Jung i in. 1996, 2000; Pratt i in. 1976; Ribeiro 1978; Szkuta i in. 2001; Themann, Werres 2000; Tsao 1990; Zentmyer 1980; Zentmyer i in. 1960]. Owoce inokuluje się fragmentami tkanek roślin podejrzanych o zakażenie przez *Phytophthora* spp. Aby zapewnić optymalne warunki do rozwoju poszukiwanego gatunku *Phytophthora*, miejsca inokulacji zabezpiecza się przed wyschnięciem i inkubuje w temperaturze powyżej 20°C [Erwin, Ribeiro 1996; Ribeiro 1978]. Z nekrotycznych tkanek wokół miejsc inokulacji przeszczepia się ich niewielkie fragmenty na pożywki [Szkuta i in. 2001]. Z kolei glebę pobraną z sąsiedztwa korzeni chorych roślin zalewa się wodą i umieszcza na jej powierzchni np.

liście wrażliwych roślin żywicielskich. Wielu fitopatologów stosuje pułapki, gdyż ułatwiają one szybką izolację patogena lub wręcz są jedyną, skuteczną metodą uzyskiwania *Phytophthora* spp. Duncan [1976] z powodzeniem wykorzystywał poziomki, jako rośliny pułapkowe, do izolacji z gleby *P. fragariae*, natomiast Pratt i Heather [1972] używał łubinu do izolacji *P. cinnamomi*. Izolacja *P. cactorum*, *P. cryptogea* i *P. megasperma* z porażonych dąglezji była efektywniejsza, gdy zastosowano jabłka, a nie podłoża agarowe [Hansen i in. 1980]. Na wynik izolacji wpływa niewątpliwie także czas jaki upłynął od pojawienia się symptomów na pniu, np. tzw. aktywnych miejsc infekcji z wysiękami soków. Wykazano, że łatwiej jest wyizolować *Phytophthora* spp. ze świeżo zainfekowanych tkanek, aniżeli po dłuższym okresie od wystąpienia symptomów choroby [Jung i in. 1996, 2000; Themann, Werres 2000].

Celem niniejszych badań było określenie przydatności pożywki ziemniaczano-glukozowej i niedojrzałych, zielonych jabłek do izolacji *Phytophthora alni* z porażonych olch oraz liści różanecznika do wykrywania tego czynnika chorobotwórczego w glebie.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono w sześciu leśnictwach południowo-wschodniej Polski w dorzeczu Bugu, gdzie wcześniej stwierdzono występowanie *Phytophthora alni*. Miejsca badań określono jako stanowiska.

**IZOLACJA *PHYTOPHTHORA ALNI* Z PORĄŻONYCH ROŚLIN NA POŻYWCE ZIEMNIACZANO-GLUKOZOWEJ ORAZ NA JABŁKACH.** Przy stosowaniu pożywki ziemniaczano-glukozowej (PDA) do izolacji grzybów i patogenów z klasy *Oomycetes* zastosowano metodę opisaną przez Orlikowskiego i in. [2003]. Do badań pobrano drzewa z 4 stanowisk w wieku od 4 do 10 lat. W zależności od stanowiska w próbie było od 3 do 8 drzew z symptomami zgnilizny korzeni oraz nekrotycznymi plamami na pniu, zwykle na długości 20-50 cm od nasady. W badaniach nad stosowaniem jabłek do izolacji *P. alni*, zastosowano procedurę opisaną przez Orlikowskiego i in. [2003] oraz Szkutę [2004]. Do izolacji patogena z korzeni lub podstawy pnia jednej olchy użyto po 3 jabłka odm. Antonówka, które inokulowano 3-5 mm skrawkami chorej tkanki (po 3 sztuki na jedno miejsce) w 3 miejscach. Po 4-6 dniach inkubacji jabłek w termostacie w 25°C w ciemności, gdy wokół miejsc uszkodzenia jabłek ich tkanki brązowiły i brunatniały, przystępowano do izolacji czynnika chorobotwórczego. Po zdjęciu taśmy, którą zabezpieczono miejsce uszkodzenia, zbrązowienie odkażano nad płomieniem palnika i z głębokości około 5 mm pobierano fragmenty miąższu (o średnicy 3-5 mm) i przenoszono na skosy z pożywką PDA. Po 5-7 dniach inkubacji kolonie przeglądano pod mikroskopem wybierając te, wskazujące na przynależność do *Phytophthora* spp., a następnie gatunek patogena oznaczano stosując metody opisane przez Szkuta [2004].

**IZOLACJA *PHYTOPHTHORA ALNI* Z GLEBY.** Do badań wybrano 3 próby gleb pobranych ze stanowisk, na których olcha w wieku 4-10 lat wykazywała symptomy zgnilizny podstawy pnia i stopniowego zamierania. Próby gleby (po około 2 kg) po wyrwaniu chorej olszy, pobierano z warstwy 3-15 cm do sterylnych worków foliowych i przewożono do laboratorium. Próby bardzo dokładnie mieszano, dzielono na 4 części (powtórzenia) i wykładano po 500 gramów do tac fotograficznych o wymiarach 30 × 24 cm i zalewano 0,25 dm<sup>3</sup> wody wodociągowej. Następnie na powierzchnię zawieszono wykładano po 16 liści różanecznika odm. Nova Zembla i tace okrywano szczelnie folią. Po 4-6 dniach inkubacji tac w 20-24°C dokonano obserwacji liści pod kątem występowania na ich powierzchni nekrotycznych plam. Błaski z plamami opłukiwano wodą wodociągową, a następnie destylowaną, suszono pomiędzy 2 warstwami bibuły filtracyjnej, odkażano nad płomieniem palnika, a następnie z nekrotycznych plam wycinano skrawki o średnicy ok. 3 mm

i wykładano je na pożywkę PDA w szalkach Petriego o średnicy 90 mm (średnio 12 skrawków z jednego liścia na szalkę). Po 24 godz. inkubacji w 24°C liczono liczbę skrawków, z których wyrastały kolonie *Phytophthora* sp. Dodatkowo, część z nich przeszczepiano na kosy z PDA w celu identyfikacji gatunku.

## Wyniki i dyskusja

POŻYWKA ZIEMNIACZANO-GLUKOZOWA DO IZOLACJI *PHYTOPHTHORA ALNI* I INNYCH ORGANIZMÓW. *P. alni* izolowano z drzew pochodzących z 4 stanowisk, ale tylko z niektórych z nich. W zależności

**Tabela 1.** Grzyby i organizmy z klasy Oomycetes wyizolowane z podstawy pnia chorych olch pobranych z 4 stanowisk, liczba zasiedlonych roślin (a) i liczba uzyskanych izolatów (b)  
Fungi and Oomycetes isolated from the base of diseased alders taken from 4 sites; number of infected plants (a) and number of received isolates (b)

Rodzaj/gatunek	I (Orzechów) 6 roślin 4-letnich		II (Parzew) 5 roślin 6-letnich		III (Sosnowica) 8 drzew 8-letnich		IV (Mungajny) 3 drzewa 10-letnie	
	a	b	a	b	a	b	a	b
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	2	5	-	-	1	3	-	-
<i>Cladosporium herbarum</i> Link	-	-	2	2	-	-	-	-
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	2	3	-	-	-	-	1	2
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	-	-	3	4	1	2	2	3
<i>Fusarium equiseti</i> (C.da) Sacc.	1	3	2	2	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sny. et Hans.	2	4	1	2	3	3	-	-
<i>Mucor</i> spp.	3	6	4	7	5	11	3	7
<i>Phytophthora alni</i> Brasier i Kirk sp. nov.	4	13	3	10	6	17	2	5
<i>Trichoderma</i> spp.	2	5	3	8	1	3	2	3

Izolacja: czerwiec - sierpień, 2004; Isolation: June - August, 2004

od stanowisk, z których pobierano drzewa do analizy mikologicznej, *P. alni* izolowano z 5/8 do 2/3 analizowanych prób (tab. 1). Obok tego czynnika chorobotwórczego analizowane tkanki zasiedlone były przez 8 rodzajów i gatunków grzybów, często szybciej rosnących aniżeli *P. alni*. Być może, iż był to powód, dla którego patogena nie wykrywano ze wszystkich, analizowanych drzew. Szczególnie grzyby rodzajów *Fusarium* i *Mucor* zarastały szybko kolonie *P. alni*.

JABŁKA JAKO PUŁAPKI DO IZOLACJI *PHYTOPHTHORA ALNI* Z TKANEK ROŚLINNYCH. Zastosowanie jabłek do wykrywania *P. alni* w chorych tkankach korzeni i pnia olch dało lepsze wyniki aniżeli użycie do tego celu pożywki PDA (tab. 2). Patogen izolowano bowiem z korzeni wszystkich drzew, pochodzących z trzech stanowisk. Pułapki z jabłek były również bardziej przydatne aniżeli pożywka PDA do wykrywania *P. alni* z porażonych pni drzew (tab. 2). Prawdopodobnie kwas jabłkowy ograniczył rozwój grzybów, co korzystnie wpłynęło na skuteczność izolacji *P. alni*. Wymieniona metoda z różnymi modyfikacjami była szeroko wykorzystywana przez różnych autorów, m.in. przez Hamm i Hansen [1984], Pratt i in. [1976], Themann i Werres [2000], Zentmyer [1980], Zentmyer i in. [1960]. Zaobserwowano, że na owocach umieszczonych w pojemnikach z glebą, zalanych wodą, zwykle po upływie 3-6 dni

Tabela 2.

Przydatność jabłek jako pułapki do izolacji *Phytophthora alni* z chorych tkanek; liczba drzew, z których izolowano patogena (a) i liczba (b) efektywnych izolacji (n=9)

The usefulness of apples as baits to isolate *Phytophthora alni* from diseased tissues, number of tree from which the pathogen was isolated (a) and number of effective isolations (n=9)

Stanowisko	Liczba analizowanych drzew	Średnia liczba efektywnych izolacji z drzew (n=9)			
		Korzenie		Podstawa pnia	
		a	b	a	b
I (Orzechów)	6	5	6	5	5
II (Parczew)	5	5	3	4	6
III (Sosnowica)	8	5	5	7	1
IV (Mungajny)	3	3	0	3	4

Izolacja: lipiec-wrzesień 2004; Drzewa: 4-10-letnie

Isolation: July-September 2004; Trees: four to ten- year-old

pojawiały się brązowe, okrągłe plamy z rozmytą otoczką. Gatunki rodzaju *Phytophthora*, np. *P. cactorum*, *P. citrophthora* i *P. syringae* łatwo rozprzestrzeniają się wzdłuż systemów, służących do nawadniania upraw. Erwin i Ribeiro [1996] do izolacji *Phytophthora* spp. wykorzystywali owoce cytryny, które umieszczali w plastikowych, perforowanych workach i zanurzali w badanych kanałach lub zbiornikach. Równie dobre wyniki uzyskano umieszczając owoce w drucianych koszyczkach na powierzchni zawieszony glebowej [Zentmyer i in. 1960]. W czasie badań prowadzonych w USA i w Niemczech, dzięki użyciu owoców gruszek wyizolowano z kanałów nawadniających sady owocowe 749 izolatów *Phytophthora* spp., a wśród nich m.in. *P. cactorum* i *P. citricola* [Yamak i in. 2002]. Jest bardzo prawdopodobne, że wykładanie jabłek w siatkach plastikowych lub koszach wzdłuż cieków wodnych, nad którymi rosnące olsze wykazują symptomy choroby, może być wykorzystane do wykrywania *P. alni* w wodzie.

**IZOLACJA PHYTOPHTHORA ALNI Z GLEBY.** Użycie liści różanecznika, jako pułapki do wykrywania patogena, dało zadowalające wyniki (tab. 3). Już po 3-4 dniach od wyłożenia liści do tac z glebą zalaną wodą, pojawiły się na nich nekrotyczne plamy u nasady lub w różnych miejscach blaszek. Niekiedy na jednym liściu obserwowano po 3-5 plam. Liczba zasiedlonych liści przez badany patogen była zróżnicowana. Stwierdzono, że w zależności od próby, *P. alni* wykrywano z  $\frac{1}{12}$  do  $\frac{1}{4}$  analizowanych liści (tab. 3). Liczba brązowych plam na liściach nie zawsze była jednoznaczna z występowaniem na nich *P. alni*. W glebie ze stanowiska I z nekrotycznych plam tylko z ok. 30% skrawków liści, wyłożonych na pożywkę PDA, izolowano *P. alni*, podczas gdy z gleby ze stanowiska II ok. 65% (tab. 3). Dane te wskazują na zróżnicowaną liczebność czynnika chorobotwórczego w poszczególnych glebach, pobranych ze stanowisk z zamierającymi olchami. Badania gleby pobranej z trzech stanowisk olszowych z objawami zgnilizny podstawy pnia, przeprowadzone na pożywce selektywnej dla *Phytophthora* spp. wykazały, że w jednym gramie gleby występowało od 0 do 35 jednostek propagacyjnych *P. alni* [Orlikowski nie publik.]. W literaturze przedmiotu nie tylko liście różanecznika wykorzystano jako rośliny pułapkowe. W badaniach porównawczych skuteczności różnych roślin pułapkowych Dance i in. [1975] wykazali, że siewki łubinu, igły sosny i cedru są w równym stopniu wrażliwe na infekcję przez różne gatunki rodzaju *Phytophthora*. Badania autorów dotyczyły izolacji zarówno patogenów roślin ozdobnych jak i drzew leśnych, tj. *P. boehmeriae*, *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. drechleri*, *P. hibernalis*, *P. megasperma*, *P. nicotianae* i *P. richardiae*. Okazało się jednak, że *P. cactorum*, powszechnie występujący w szkółkach patogen siewek buka, rzadko infekował siewki łubinu, natomiast inne gatunki *Phytophthora* spp. były z nich łatwo izolowane.

Tabela 3.

Przydatność pułapki z liści różanecznika w izolacji *Phytophthora alni* z zakażonej gleby spod olszy po 4 dniach inkubacji

The usefulness of rhododendron leaves for *Phytophthora alni* baiting (after 4 days of incubation) from infected soil taken under the diseased alders

Stanowisko	Średnia liczba liści z 4 prób z plamami (n=16)	% skrawków z wyłożonych liści na PDA, zasiedlonych przez <i>P. alni</i>
I (Tomaszów L)	2,8 ab	30,5 a
II (Sosnowica)	3,6 b	65,5 c
III (Orzechów)	2,3 a	55,6 bc
IV szkółki (Włodawa)	3,4 b	41,7 ab
V szkółki (Mungajny)	2,0 a	36,2 a
VI (Parczew)	2,0 a	34,0 a

Sierpień 2004; Uwaga: Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana August 2004; Note: Average in columns, marked with the same letter are not statistically significant (5%) according to Duncan test

## Podsumowanie i wnioski

Zastosowanie pułapek roślinnych znacznie ułatwia izolacje patogenów rodzaju *Phytophthora*, a czasami wręcz tylko ta metoda daje zadowalające wyniki. Dzieje się tak dlatego, że liczne grzyby (np. rodzaju *Fusarium*, *Mucor* czy *Penicillium*) szybko zarastają kolonie *Phytophthora* spp., gdy porażony materiał roślinny wyłożony zostanie bezpośrednio na standardowe pożywki. W takiej sytuacji nie sposób dostrzec ani tym bardziej wyizolować organizmów, które wolniej rosną, przez co ich udział i rola w procesach chorobowych roślin może być niezauważony.

Użycie do izolacji jabłek ogranicza ich zasiedlanie przez wymienione już rodzaje grzybów, ale też nie zawsze dochodzi do ich infekcji przez *Phytophthora*. Zdaniem niektórych badaczy, do izolacji *Phytophthora* spp. powinny być używane kwaśne, zwykle jeszcze niedojrzałe owoce, co ma miejsce jedynie przez stosunkowo krótki okres lata. Bardziej praktyczne wydają się liście różaneczników, które jako zimozielone dostępne są przez cały rok, co umożliwia ich stosowanie także w okresie wiosennym, a nawet zimowym. Są przy tym bardzo podatne na co najmniej 10 gatunków rodzaju *Phytophthora*. Niniejsze badania wykazały, że metody detekcji *P. alni* z gleby przy użyciu liści różanecznika oraz jabłek, mogą być z powodzeniem stosowane do określania przyczyny zamierania olch, w tym szczególnie starszych drzew, z których izolacja patogena jest znacznie trudniejsza aniżeli z siewek czy kilku- kilkunastoletnich roślin.

Z badań tych nasuwają się następujące wnioski:

- ✦ Wykładanie chorych tkanek na tradycyjne pożywki w szalkach Petriego nie zawsze umożliwia wykrycie poszukiwanego patogena. Zamiast czynnika chorobotwórczego częściej stwierdza się obecność grzybów szybciej rosnących aniżeli *P. alni*.
- ✦ Pułapki z jabłek są bardziej przydatne do wykrywania *P. alni* z porażonych pni olszy aniżeli pożywka PDA, prawdopodobnie dlatego, że hamują rozwój niepożądanych w izolacji, szybko rosnących grzybów.
- ✦ Najbardziej zadowalające wyniki w wykrywaniu patogena uzyskano przy użyciu pułapek z liści różanecznika. Po 3-4 dniach od wyłożenia liści do tac z glebą zalaną wodą, pojawiały się na nich nekrotyczne plamy, jako konsekwencja porażenia m.in. przez *P. alni*.

## Literatura

- Dance M. H., Newhook F. J., Cole J. S. 1975. Bioassay of *Phytophthora* spp. in soil. Plant Dis. Rep. 59: 523-527.  
Duncan J. M. 1976. The use of bait plants to detect *Phytophthora fragariae* in soil. Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 85-89.

- Erwin D. C., Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press.
- Hamm P. B., Hansen E. M. 1984. Improved method for isolating *Phytophthora lateralis* from soil. *Plant Dis.* 68: 517-519.
- Hansen E. M., Roth L. F., Hamm P. B., Julis A. J. 1980. Survival, spread and pathogenicity of *Phytophthora* spp. on Douglas fir trees planted on forest sites. *Phytopathology* 70: 422-425.
- Harris D. C., Bielenin A. 1986. Evaluation of selective media and bait methods for estimating *Phytophthora cactorum* in apple orchard soils. *Plant Pathol.* 35: 565-574.
- Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Pathol.* 26: 253-272.
- Jung T., Blaschke H., Obwald W. 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathol.* 49: 706-718.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Szkuta G. 2003. First record of alder *Phytophthora* in Poland. *J. Plant Prot. Res.* 43 (1): 33-39
- Pratt B. H., Heather W. A. 1972. Method of rapid differentiation of *Phytophthora cinnamomi* from other *Phytophthora* species isolated from soil by lupin baiting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 59: 87-96.
- Pratt R. G., Roth L. F., Hansen E. M., Ostrofsky W. D. 1976. Identity and pathogenicity of species of *Phytophthora* causing root rot of Douglas fir in the Pacific northwest. *Phytopathology* 66: 710-714.
- Ribeiro O. K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. Vaduz, Lichtenstein: J. Cramer. 417.
- Szkuta G., Orlikowski L. B., Jamart G. 2001. Rozprzestrzenianie się gatunków z rodzaju *Phytophthora* w szkółkach krzewów i drzew ozdobnych. Materiały V Konferencji Sekcji Chorób Roślin Drzewiastych PTFIT, Poznań-Błażejewko. 25-31.
- Szkuta G. 2004. Występowanie, izolacja, identyfikacja i szkodliwość gatunków z rodzaju *Phytophthora* w szkółkach ozdobnych roślin iglastych. Praca doktorska, Kraków. 1-191.
- Themann K., Werres S. 2000. Guidelines for the handling of the *Rhododendron* leaf test to detect *Phytophthora* spp. in root, soil and water samples. BBA, Braunschweig, Niemcy.
- Tsao P. H. 1990. Why many *Phytophthora* root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *EPPO Bulletin* 20: 11-17.
- Yamak F., Peever T. L., Grove G. G., Boal R. J. 2002. Occurrence and identification of *Phytophthora* spp. pathogenic to pear fruit in irrigation water in the Wenatchee River Valley of Washington State. *Phytopathology* 92: 1210-1217.
- Zentmyer G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No. 10. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 96.
- Zentmyer G. A., Gilpatrick J. D., Thorn W. A. 1960. Methods of isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil and from host tissue. *Phytopathology* 50: 87.

## SUMMARY

### The usefulness of traps and PDA medium for *Phytophthora alni* isolation from infected tissues and soil

If the causes of dieoff among alder saplings in forest nurseries or alder stands are to be determined, it is essential that pathogens be isolable from diseased plant tissue and the soil. In this, the use of traditional agar media is frequently troublesome, seemingly hindering the isolation of *Phytophthora alni* from infected roots or trunk bases. The search for a „trap” plant that is prone to the pathogen and available year-round may thus represent an inexpensive and effective alternative to the methods applied traditionally in forest phytopathology. Studies carried out with this aim in mind with PDA potato-glucose medium, underripe green apples and rhododendron leaves were able to demonstrated the particular effectiveness of the latter where the isolation of *P. alni* from soil was concerned. Where PDA was used, the disease-causing pathogen was isolated alongside 8 other genera or species of fungi, which often grew faster than *Phytophthora* spp themselves – something that may account for the failure to detect *P. alni* in all plants suspected of having phytophthorosis (the colony of the pathogen being overrun by such fast-growing fungi as *Mucor* spp). In consequence, the use of apple to obtain *P. alni* from diseased root and trunk tissue of alders gave better results than the PDA medium applied with the same aim.