

LESZEK B. ORLIKOWSKI, MAGDALENA PTASZEK, ALEKSANDRA TRZEWIK,
TERESA ORLIKOWSKA

Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody*

Usefulness of plant leaf baits for detection of *Phytophthora* spp. from water

ABSTRACT

Orlikowski L. B., Praszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011. Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody. Sylwan 155 (7): 493-499.

Top leaves of *Alnus glutinosa*, *Quercus robur* and *Rhododendron* sp. cv. Nova Zembla were used as baits in detection of *Phytophthora* spp. from 2 rivers and one water pond. About 800 isolates were obtained from these water sources with domination of *Phytophthora* Salixsoil taxon (84%), *P. citricola* (10%) and *P. cambivora* (6%). Salixsoil taxon was detected from all investigated water sources, whereas the other species only from rivers. Rhododendron leaves were the most effective bait in detection of *Phytophthora* from rivers, pond and from different levels of water.

KEY WORDS

Phytophthora, leaf bait, alder, oak, rhododendron, water

ADDRESSES

Leszek B. Orlikowski – e-mail: leszek.orlikowski@insad.pl

Magdalena Praszek – e-mail: magdalena.ptaszek@insad.pl

Aleksandra trzewik – e-mail: aleksandra.trzewik@insad.pl

Teresa Orlikowska – e-mail: teresa.orlikowska@insad.pl

Instytut Ogrodnictwa; ul Konstytucji 3 Maja 1/3; 96-100 Skierniewice

Wstęp

Gatunki *Phytophthora*, czynniki destrukcyjne roślin według Zentmayera i Thorna [1967], od ostatniej dekady XX wieku stanowią coraz większe zagrożenie dla upraw zarówno w leśnictwie, jak i ogrodnictwie [Hansen, Delatour 1999; Jung i in. 2000; Oszako, Orlikowski 2007; Orlikowski i in. 2011]. Obok materiału roślinnego [Brasier 2008], gleby i podłoża, woda jest jednym z istotnych źródeł tej grupy czynników chorobotwórczych. Hong i Moorman [2005] stwierdzili, że zakażona woda jest głównym, jeśli nie jedynym, źródłem *Phytophthora* w szkółkach, sadach i uprawach warzywnych. O znaczeniu wody w rozprzestrzenianiu gatunków *Phytophthora* świadczy najlepiej pojawienie się fytoftorazy olszy (podgatunki *P. alni*) w Wielkiej Brytanii, a następnie we Francji i Niemczech [Gibbs i in. 1999; Streito i in. 2002; Jung, Blaschke 2004]. Już w 2005 roku choroba ta występowała w całej Europie, w tym również w Polsce [Orlikowski i in. 2003]. Pierwsze doniesienie o występowaniu *Phytophthora* w wodzie pochodzi z 1921 roku, gdy stwierdzono *P. cryptogea* w wodzie używanej do podlewania roślin w szklarni [Bewley, Buddin 1921]. W ciągu 90 lat wykryto w wodzie co najmniej 20 gatunków tego rodzaju, obok przedstawicieli rodzajów *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* i innych [Thompson, Allen 1974; Themann i in. 2002; Hong, Moorman 2005]. W zależności od kraju, roślin zagrożonych przez *Phytophthora* spp. i sposobu ich nawad-

* Badania finansowane w ramach Programu Wieloletniego 1.8

niania, do detekcji gatunków tego rodzaju przetestowano pułapki z co najmniej 30 różnych roślin, w tym z ich siewek, liści, nasion i owoców [Hansen, Delatour 1999; Themann i in. 2002; Bush i in. 2003; Hwang i in. 2007].

Celem niniejszych badań było określenie przydatności pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. w wodzie w zależności od miejsca usytuowania liści i czasu pułapkowania.

Material i metody

Do badań użyto liści wierzchołkowych dębu szypułkowego (*Quercus robur*), olszy (*Alnus glutinosa*) i różanecznika (*Rhododendron* sp.) odmiany Nova Zembla. Liście z pierwszych dwóch gatunków pobierano z roślin z pola, natomiast różanecznik uprawiano w tunelu foliowym w pojemnikach. Badania przeprowadzono na próbach wody pobranych z rzek Skierniewki i Zwierzynki oraz stawu Zwierzyniec w województwie łódzkim.

Wodę pobierano od maja do września 2010 roku w odstępach miesięcznych. Pułapki umieszczano na powierzchni lustra wody, w środkowej jego części oraz na dnie. Do sznurka, obciążonego ciężarkiem, przywiązywano fragmenty pędów pułapkowych, zawierających po co najmniej 8 liści. W zależności od poziomu wody w rzekach i stawie, regulowano długość sznurka tak, aby pułapki znajdowały się na powierzchni, w środkowej części ich lustra oraz na dnie, około 2 m od brzegu. Po 4 dniach pułapki wyjmowano z wody, wkładano indywidualnie do worków foliowych i przewożono do laboratorium. Po opłukaniu liści pod wodą bieżącą i destylowaną, suszono je pomiędzy dwoma warstwami sterylnej bibuły filtracyjnej i liczono plamy nekrotyczne na każdej z blaszek, co uznano za miarę liczebności *Phytophthora* w wodzie.

Liście z plamami nekrotycznymi odkażano nad płomieniem palnika. Wycinano z nich fragmenty o średnicy około 3 mm, które następnie wykładano do szalek Petriego o średnicy 90 mm z pożywką PDA (po około 20 skrawków). W ciągu 24-48 godzin inkubacji w temperaturze 22-24°C fragmenty kolonii wyrastających z inokulum, przeszczepiano na kosy z pożywką PDA. Po 10 dniach przeprowadzono segregację uzyskanych kultur i wybrano z nich izolaty reprezentacyjne do identyfikacji gatunku, którą przeprowadzono wykorzystując cechy morfologiczne oraz przy zastosowaniu metod molekularnych. Wyniki pomiarów liczby plam nekrotycznych poddano analizie statystycznej stosując test Duncana (4 powtórzenia po 2 liście z każdego gatunku rośliny pułapkowej).

Wyniki

Stosując liście dębu, olszy i różanecznika do wykrywania *Phytophthora* spp. w wodzie z rzek i stawu uzyskano około 800 izolatów tego rodzaju. Zidentyfikowano wśród nich *P. cambivora*, *P. citricola* oraz *Phytophthora* takson Salixsoil (tab., ryc. 1). Najczęściej izolowany (84% izolatów) był *Phytophthora* takson Salixsoil, który wykrywano niezależnie od terminu detekcji i źródła wody. Stwierdzono także *P. citricola* (10% izolatów). Gatunek ten występował w obu rzekach w czerwcu i wrześniu. *P. cambivora* stanowił 6% określonych izolatów i był wykrywany w sierpniu i wrześniu w obu rzekach. Najlepszą rośliną pułapkową okazał się różanecznik, a najmniejszą liczbę izolatów uzyskano stosując liście dębu szypułkowego (tab., ryc. 1).

Wykrywalność *Phytophthora* wskazuje na liście różanecznika jako najefektywniejsze pułapki do detekcji gatunków tego rodzaju w wodzie (ryc. 2). Nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie uzyskanych izolatów z analizowanych źródeł. Analiza współzależności pomiędzy rośliną pułapkową i umiejscowieniem pułapek a częstością izolacji *Phytophthora* spp. wskazuje, że ponad 70% izolatów uzyskano stosując liście różanecznika jako pułapki. Podobną liczbę izolatów badanego rodzaju uzyskano z powierzchni wody, środkowej części lustra i z dna (ryc. 3).

Nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie uzyskanych izolatów w zależności od terminu pułapkowania. Bez względu na miesiąc, w którym badano częstotliwość występowania *Phytophthora* spp., najskuteczniejsze do wykrywania gatunków badanego rodzaju okazały się liście różanecznika (ryc. 4).

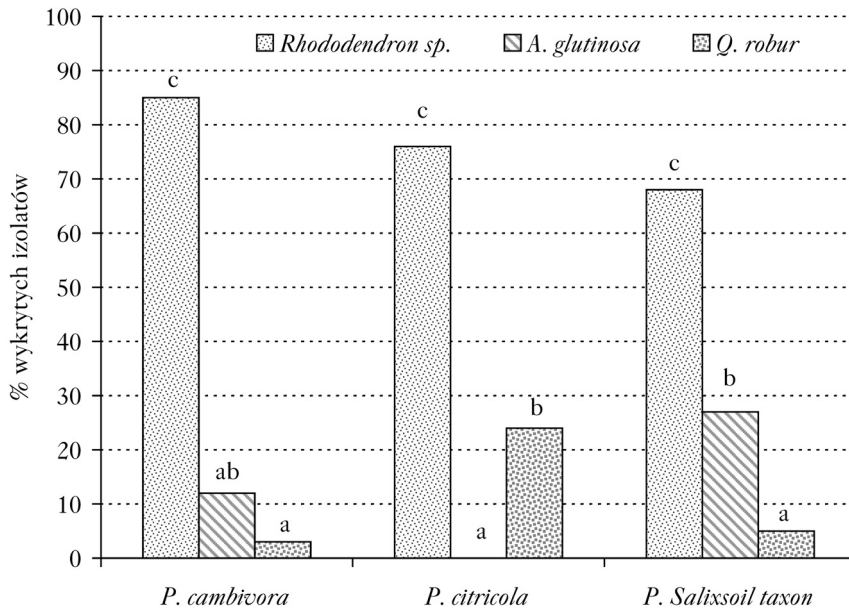
Tabela

Liczba izolatów *Phytophthora* spp. uzyskanych z wody w zależności od jej źródła i roślin pułapkowych w poszczególnych miesiącach

Number of *Phytophthora* spp. isolates detected from water in relation to its source and baiting plants in individual months

Roślina pułapkowa	Czerwiec			Lipiec			Sierpień			Wrzesień		
	<i>P.Ss</i>	<i>P.ca</i>	<i>P.ci</i>	<i>P.Ss</i>	<i>P.ca</i>	<i>P.ci</i>	<i>P.Ss</i>	<i>P.ca</i>	<i>P.ci</i>	<i>P.Ss</i>	<i>P.ca</i>	<i>P.ci</i>
Skierniewka												
<i>Alnus glutinosa</i>	8	–	–	22	–	–	45	–	–	–	–	–
<i>Quercus robur</i>	8	–	–	8	–	–	18	–	–	–	–	–
<i>Rhododendron</i> sp.	28	–	–	45	–	–	39	–	–	40	–	–
Zwierzynka												
<i>Alnus glutinosa</i>	11	–	–	13	–	–	7	–	–	–	–	–
<i>Quercus robur</i>	4	–	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–
<i>Rhododendron</i> sp.	43	–	22	60	–	–	72	–	–	19	32	–
staw Zwierzyniec												
<i>Alnus glutinosa</i>	23	–	–	28	–	–	13	8	–	24	–	7
<i>Quercus robur</i>	10	–	–	–	–	–	6	–	–	–	–	–
<i>Rhododendron</i> sp.	21	–	–	58	–	–	–	24	–	45	–	–

P.Ss – *Phytophthora Salix* soil taxon; *P.ca* – *P. cambivora*; *P.ci* – *P. citricola*

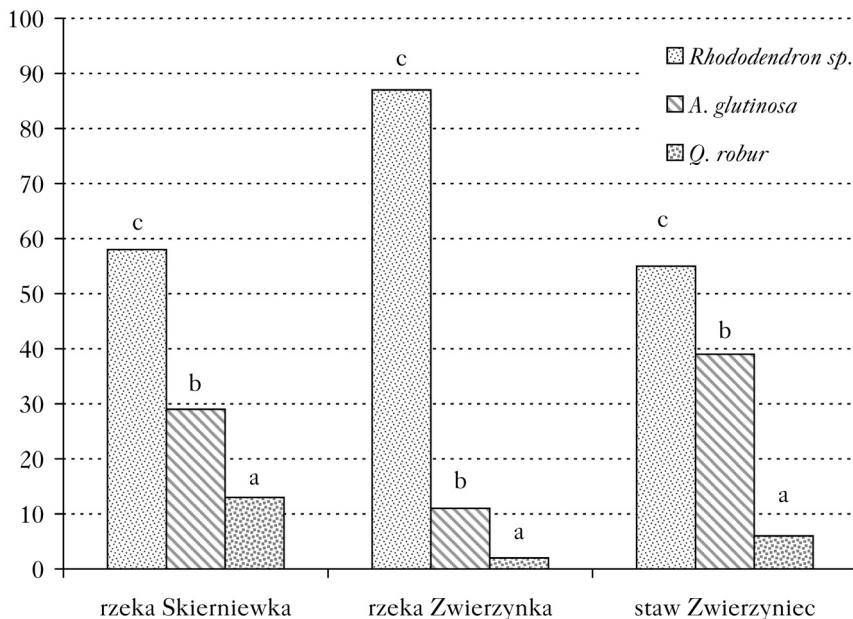


Ryc. 1.

Częstotliwość detekcji gatunków *Phytophthora* w zależności od rośliny pułapkowej

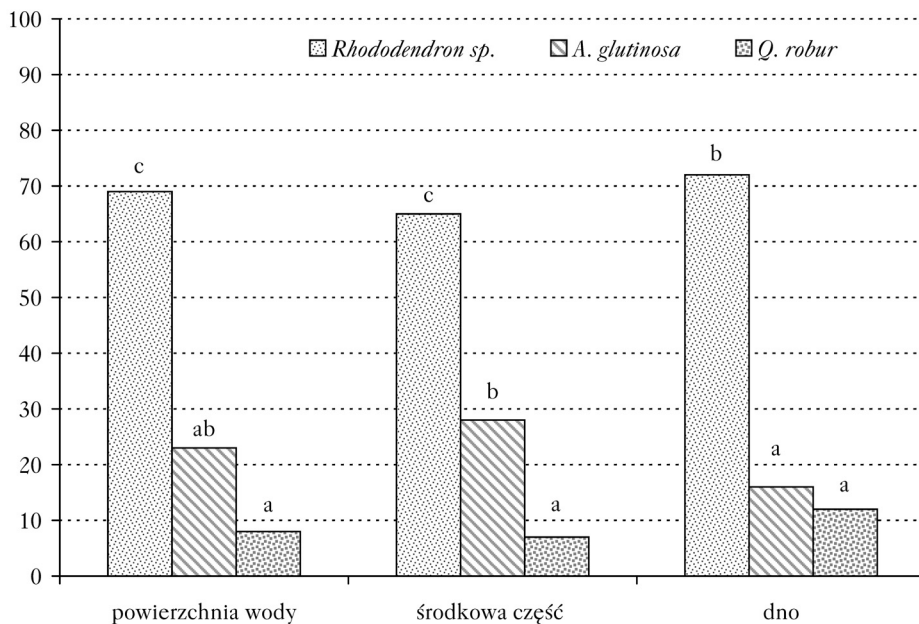
Frequency of *Phytophthora* spp. detection in relation to plant bait species

wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p=0,05$);
values indicated with the same letter do not differ ($p=0,05$)



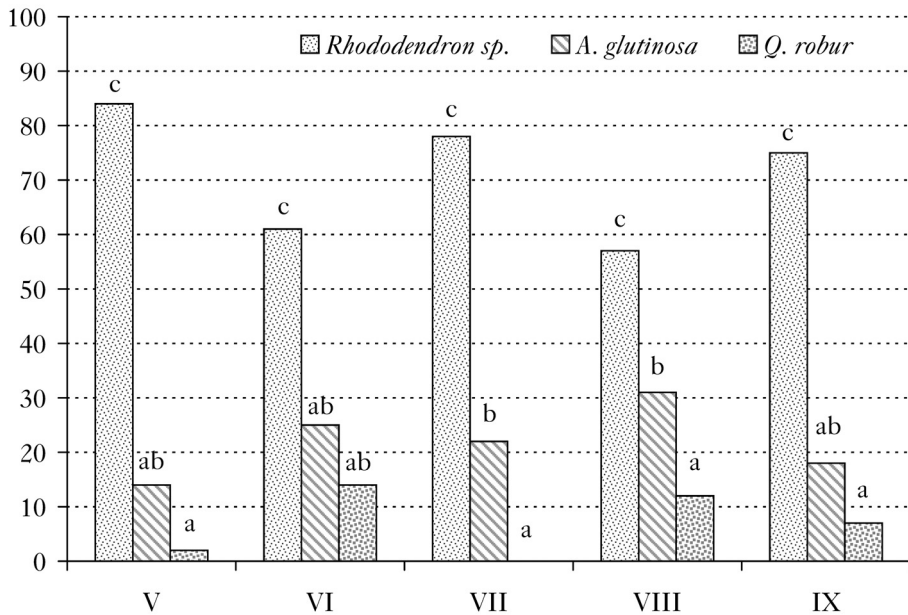
Ryc. 2.

Częstotliwość izolacji gatunków *Phytophthora* [%] w zależności od źródła wody i roślin pułapkowych
 Frequency of *Phytophthora* species isolation [%] in relation to source of water and baiting plant species
 Oznaczenia jak na rycinie 1; denotes as on figure 1



Ryc. 3.

Częstotliwość detekcji *Phytophthora* spp. w zależności od miejsca usytuowania pułapek
 Frequency of *Phytophthora* spp. detection in relation to location of baiting leaves
 Oznaczenia jak na rycinie 1; denotes as on figure 1



Ryc. 4.

Częstotliwość izolacji gatunków *Phytophthora* z wody w zależności od terminu detekcji i gatunku rośliny pułapkowej

Frequency of *Phytophthora* spp. isolation in relation to detection period and baiting plant species

Oznaczenia jak na rycinie 1; denotes as on figure 1

Dyskusja

Wybór pułapek do detekcji *Phytophthora* z wody zależy jest często od konieczności sprawdzenia, czy określony gatunek tego rodzaju występuje w strumieniach, rzekach lub nawet niewielkich kałużach, będących miejscem jego bytowania i rozmnażania [Hansen, Delatour 1999]. W obiektach leśnych często istnieje konieczność sprawdzenia występowania określonego patogena. Przykładem może być *P. quercina*, gatunek powodujący zgniliznę korzeni dębu, który wykrywa się szybko stosując jako pułapkę wierzchołkowe liście dębu [Jung i in 1999; Jung 2009]. W uprawie roślin w obiegu zamkniętym, gdzie wielokrotnie wykorzystuje się tę samą wodę, istnieje szczególnie niebezpieczeństwo zawleczenia i szybkiego rozprzestrzenienia się pojedynczego patogena lub ich grupy. Themann i in. [2002] stosując różne metody detekcji *Phytophthora* w 4 szkółkach ozdobnych z zamkniętym obiegiem wody, wykryli 12 gatunków *Phytophthora*, a część izolatów nie została jeszcze zidentyfikowana. Zdaniem tych autorów, liście różanecznika okazały się jedną z najlepszych pułapek do detekcji tej grupy patogenów. Skuteczność tego sposobu detekcji jest porównywalna z filtrowaniem wody. Jest to zapewne związane z bardzo dużą wrażliwością tej rośliny na omawianą grupę patogenów. Dotychczas stwierdzono na różanecznikach występowanie co najmniej 20 gatunków rodzaju *Phytophthora* i ciągle znajdują się nowe [Orlikowski i in. 2010]. Przedstawione wyniki potwierdzają dane Themann i in. [2002]. Zaletą liści różanecznika jako pułapki jest ich dostępność przez cały rok, łatwa, szybka, tania i prosta metoda detekcji, która może być stosowana w każdej szkółce leśnej lub roślin ozdobnych, w drzewostanach oraz na terenach nadrzecznych.

Uzyskane dane wskazują na występowanie w badanych źródłach wody *P. cambivora*, *P. citricola* oraz najliczniej wykrywanego taksonu *Salixsoil*. Niewielka rzeka Zwierzynka płynie przez tereny leśne i łąki, natomiast Skierniewka – przez pola i lasy, ale również wsie i miasta. Pierwszy z gatunków, znany jako patogen powodujący zgniliznę podstawy pnia buka, klonu, kasztanowca [Jung, Blaschke 1995; Orlikowski i in. 2006] i zapewne innych, nieznanymi jeszcze w kraju roślin żywicielskich, występuje na terenach przyległych do rzek i może być do nich wprowadzany przy intensywnych opadach deszczu lub w czasie wiosennych powodzi. Z kolei *P. citricola* jest często występującym gatunkiem na większości roślin iglastych i liściastych, a także wrzosowatych [Orlikowski, Szkuta 2002; Orlikowski, Ptaszek 2010]. W otoczeniu obu rzek i stawu może zasiedlać dęby, buki, jesiony, olsze, modrzewie oraz borówkę brusznicę. Wykazano, że izolaty tego gatunku, występujące w zbiornikach wodnych w szkółkach roślin ozdobnych, mogą być wprowadzane do upraw w czasie zraszania roślin, powodując między innymi zarazę wierzchołków świerka i żywotnika [Orlikowski 2006].

Wśród uzyskanych izolatów *Phytophthora* ponad 80% stanowił takson *Salxsoil*. Izolowano go z wody obu rzek i stawu niezależnie od umiejscowienia pułapek, ale głównie z dna. Nie był to pierwszy przypadek detekcji tego taksonu, gdyż w 2008 roku izolowano go ze strefy korzeni jesionu z objawami zgnilizny korzeni i podstawy pnia [Orlikowski i in. 2011]. Izolaty *Salixsoil* powodowały zgniliznę korzeni fragmentów pędów oraz blaszek liściowych tej rośliny obok *P. cactorum* i *P. plurivora* [Orlikowski i in. 2011]. Był on również wcześniej izolowany z osadu dennego strefy przybrzeżnej Jeziora Bodeńskiego [Nechwatal, Mendgen 2006]. Autorzy ci podają, iż wykrywano go także w korzeniach wierzby i rozkładającej się olszy w Danii. Badania przeprowadzone na korzeniach wierzby wykazały, że takson ten powodował zgniliznę korzeni *Salix alba* i może być patogenem roślin drzewiastych rosnących na wilgotnych stanowiskach lub terenach często zalewanych [Nechwatal, Mendgen 2006]. Badania nad występowaniem i chorobotwórczością tego taksonu będą również prowadzone w Polsce.

Podziękowania

Autorzy serdecznie dziękują Leśniczemu mgr. Marcinowi Wierzychowskiemu za pomoc w realizowaniu badań.

Literatura

- Bewley W. F., Buddin W. 1921. On the fungus flora of glasshouse water supplies in relation to plant disease. *Ann. Appl. Biol.* 8: 10-19.
- Brasier C. M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol.* 57: 792-808.
- Bush F. A., Hong C., Stromberg E. L. 2003. Fluctuation of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of recirculating irrigation system. *Plant Dis.* 87: 1500-1506.
- Gibbs J. N., Lipscombe M. A., Peace A. J. 1999. The impact of *Phytophthora* diseases on riparian population of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *E. J. Forest Pathol.* 29: 39-50.
- Hansen E., Delatour C. 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. *Ann. For. Sci.* 56: 539-547.
- Hong C. X., Moorman G. W. 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critic Rev. in Plant Sci.* 24: 189-208.
- Hwang J., Oak S. W., Jeffers S. N. 2007. Detection of *Phytophthora ramorum* and other species of *Phytophthora* in streams in natural ecosystems using baiting and filtration methods. *The Sudden Oak Death 3rd Symposium*, Santa Rosa, California.
- Jung T. 2009. Beech decline in central Europe driven by the interaction between infections and climatic extremes. *For. Path.* 39: 73-94.
- Jung T., Blaschke H. 1995. *Phytophthora* root rot in declining forest trees. *Phyton (Horn, Austria)* 36 (3): 95-102.
- Jung T., Blaschke H. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathol.* 53: 197-208.

- Jung T., Blaschke H., Osswald 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.
- Jung T., Cooke D. E. L., Blaschke H., Duncan J. M., Osswald W. 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov. causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.* 103: 785-798.
- Nechwatal J., Mendgen K. 2006. Widespread detection of *Phytophthora* taxon Salixsoil in the littoral zone of Lake Constance, Germany. *E. J. Plant Pathol.* 114: 261-264.
- Orlikowski L. B. 2006. Relationship between source of water used for plant sprinkling and occurrence of *Phytophthora* shoot rot and tip blight in container-ornamental nurseries. *J. Plant Prot. Res.* 46: 163-168.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Szkuta G. 2003. First record of alder *Phytophthora* in Poland. *J. Plant Prot. Res.* 43: 33-40.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Szkuta G. 2006. First record of *Phytophthora* spp. associated with the decline of European beech stand in south-west Poland. *Phytopathol. Pol.* 42: 37-46.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M. 2010. Gatunki *Phytophthora* jako przyczyna zamierania żywotników (*Thuja* spp.) w polskich szkółkach kontenerowych. *Sylwan* 154 (4): 242-248.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Rodziejewicz A., Nechwatal J., Thinggarad K., Jung T. 2011. *Phytophthora* root and collar rot of mature *Fraxinus excelsior* stands in Poland and Denmark. *For. Path.* (w druku).
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Snopczyńska K. 2010. Różanecznik – nowa roślina żywicielska dla *Phytophthora citrophthora* w polskich szkółkach. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 554: 165-170.
- Orlikowski L. B., Szkuta G. 2002. Fytofitorozy w szkółkach roślin ozdobnych w Polsce. *Prace IBL*, s. A. 2: 134-137.
- Oszako T., Orlikowski L. B. 2007. Zagrożenie polskich szkółek leśnych przez gatunki rodzaju *Phytophthora*. *Post. w Ochr. Roś./Progr. in Pl. Prot.* 45: 224-234.
- Streito J. C., Legrand Ph., Tabary F., Jarnouen de Villartay G. 2002. *Phytophthora* disease of alder (*Alnus glutinosa*) in France: investigation between 1995 and 1999. *For. Path.* 32: 171-191.
- Themann K., Werres S., Luttmann R., Diener H. A. 2002. Observation of *Phytophthora* in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock. *Eur. J. Pl. Pathol.* 108: 337-343.
- Thomson S. V., Allen R. M. 1974. Occurrence of *Phytophthora* species and other potential plant pathogens in recirculating irrigation water. *Plant Dis. Repr.* 58: 945-949.
- Zentmayer G. A., Thorn W. A. 1967. Hosts of *Phytophthora cinnamomi*. *Avocado Soc. Yearbook* 51: 177-186.

SUMMARY

Usefulness of plant leaf baits for detection of *Phytophthora* spp. from water

Baits from leaf blades of *Alnus glutinosa*, *Quercus robur* and *Rhododendron* sp. cv. Nova Zembla were used for detection of *Phytophthora* species from 2 rivers and water pond. Plant baits were located on the surface, in middle part of water and on the bottom from June to September with monthly interval. Number of necrotic spots on baiting leaves as well as number of isolates obtained and identified *Phytophthora* species were evaluated. *Phytophthora cambivora*, *P. citricola* and taxon Salixsoil were identified among about 800 isolates obtained. Salixsoil taxon dominated (84%) among detected species and it was noticed at each depth. *Rhododendron* leaf blades were the most effective bait for detection of 2 *Phytophthora* species and taxon independently of water level. There were not significant differences between number of necrotic spots on baiting leaves and detection period.