

LESZEK B. ORLIKOWSKI, ALEKSANDRA TRZEWIK, MAGDALENA PTASZEK

Zróźnicowanie izolatów *Phytophthora plurivora* z czterech rzek przepływających przez tereny leśne*

Occurrence and differentiation of *Phytophthora plurivora* isolates detected from four rivers running through forest areas

ABSTRACT

Orlikowski L. B., Trzewik A., Ptaszek M. 2012. Zróźnicowanie izolatów *Phytophthora plurivora* z czterech rzek przepływających przez tereny leśne. Sylwan 156 (11): 819-824.

Phytophthora plurivora was isolated from 4 rivers running through forest areas independently from detection period. All isolates colonized rhododendron leaf blades, but necrosis spread faster when cultures obtained from October to December were used for plant tissues inoculation. Obtained results showed genomic diversity of *P. plurivora* isolates. The level of genetic similarity between them varied from 54 to 94%. No correlation between genetic differentiation and pathogenicity of tested isolates was found.

KEY WORDS

Phytophthora plurivora, occurrence, colonization, genomic diversity

ADDRESSES

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

Aleksandra Trzewik – e-mail: aleksandra.trzewik@inhort.pl

Magdalena Ptaszek – e-mail: magdalena.ptaszek@inhort.pl

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

Wstęp

Phytophthora plurivora [Jung, Burgess 2009], znany jeszcze do niedawna jako *P. citricola*, jest obok *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora* i *P. cryptogea* jednym z najczęściej występujących gatunków tego rodzaju w leśnictwie. Po raz pierwszy stwierdzono go w szkółkach leśnych na buku i jodle [Orlikowski i in. 2004a], a następnie na jesionie [Orlikowski i in. 2004b]. Dalsze badania wykazały, że jest to również czynnik chorobotwórczy dla starszych drzew, powodujący zgniliznę korzeni i podstawy pnia oraz zamieranie buka, dębu, jesionu, jodły, sosny i świerka [Orlikowski, Oszako 2009; Orlikowski i in. 2011a, b]. Gatunek ten jest jednym z najgroźniejszych patogenów roślin wrzosowatych [Orlikowski, Szkuta 2003a]. Orlikowski i Szkuta [2003b] stwierdzili objawy zamierania wierzchołków pędów na podlewanych przez zraszanie żywotniku i świerku serbskim, a przyczyną choroby okazał się *P. citricola*. Źródłem tego gatunku może być woda pobierana ze zbiornika w szkółce [Orlikowski 2006]. Odkrycie to spowodowało podjęcie badań nad rolą wody jako źródła *Phytophthora*.

P. plurivora jest jednym z najczęściej występujących czynników chorobotwórczych w ciekach i zbiornikach wodnych [Orlikowski i in. 2011d]. Używanie wody, pobieranej z lokalnych cieków lub zbiorników wodnych do podlewania roślin w szkółkach, może powodować wnoszenie do nasadzeń patogenów roślin, w tym *P. plurivora*. Patogen ten, niezależnie od źródła pochodzenia

* Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (475/N-COST/2009/0).

izolatów, powoduje zgniliznę korzeni i pędów brzozy, buka oraz świerka [Orlikowski i in. 2011a, b, d]. Dotychczas w naszym kraju brakuje danych dotyczących zmienności genomowej izolatów w obrębie tego gatunku w zależności od źródła i umiejscowienia cieków wodnych, okresu detekcji, a także chorobotwórczości tych izolatów dla roślin.

Celem niniejszych badań było uzyskanie informacji o występowaniu i zróżnicowaniu genetycznym izolatów *P. plurivora* w zależności od źródła i terminu ich detekcji oraz odniesienie tych wyników do patogeniczności izolatów omawianego gatunku.

Materiał i metody

Do testów wytypowano 31 kultur *P. plurivora* z poszczególnych rzek i różnych terminów detekcji. Izolaty użyte w badaniach pochodziły z rzek: Korabiewka, Okrzesza, Rawka i Zwierzynka, przepływających przez tereny leśne w województwach mazowieckim i łódzkim (tab. 1). Detekcję omawianego gatunku prowadzono przez cały rok w odstępach miesięcznych, stosując do tego celu liście pułapkowe różanecznika i metodykę podaną w pracy Orlikowskiego i in. [2011c].

Do oceny chorobotwórczości analizowanych izolatów wybrano różanecznik (*Rhododendron* sp.) jako roślinę-gospodarza około 20 gatunków *Phytophthora*, w tym *P. plurivora* [Orlikowski, Szkuta 2003a; Orlikowski i in. 2011c]. 31 izolatów *P. plurivora* z poszczególnych rzek i różnych terminów detekcji inkubowano na pożywce PDA w szalkach Petriego w 25°C w ciemności. Kolonizację tkanek przez analizowane izolaty określano na liściach różanecznika „Nova Zembla”. Wkładano je do kuwet wyłożonych sterylną, wilgotną bibułą filtracyjną, przykrytą cienką nylonową siatką, po czym środek blaszek liściowych nakłuwano igłą i наносzono krążki pożywki o średnicy 5 mm, przerośnięte strzępkami *P. plurivora*. Kuwety okrywano cienką folią i inkubowano w 22-24°C [Orlikowski i in. 2011c]. Po 4 i 6 dniach od inokulacji mierzono średnicę plam nekrotycznych.

W doświadczeniach zastosowano technikę PCR ze starterami niespecyficznymi typu ISSR. Użyto 6 starterów serii 800 (University of British Columbia, USA) oraz starter DBD (GA)7 [Arnau i in. 2001]. Skład mieszaniny reakcyjnej o objętości końcowej 13 µl zawierał: 2,5 mM Mg²⁺, 100 µM każdego dNTP, 0,77 µM startera, 0,325 U *Taq* polimerazy (Fermentas) oraz 13 ng matrycy DNA. Profil termiczny reakcji amplifikacji kształtował się następująco: denaturacja wstępna 95°C – 15 min, 43 cykle 95°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 90 s oraz końcowy etap wydłużania 72°C – 10 min. Każdą reakcję wykonywano trzykrotnie. Polimorfizm produktów amplifikacji oceniano na rozdzielaczach elektroforetycznych barwionych bromkiem etydyny przy pomocy programu BioCapt wersja 1103 (Vilber-Lourmat). Macierz podobieństwa uzyskano przy pomocy programu XLSTAT w oparciu o współczynnik Jaccarda. Dendrogram wykreślano na bazie analizy WPGMA.

Doświadczenie założono w układzie bloków kompletnie losowanych w 4 powtórzeniach po 5 liści w każdym z nich i powtórzono dwukrotnie w odstępie 14 dni. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic między średnimi na poziomie $p=0,05$ oceniano testem t-Duncana.

Wyniki i dyskusja

Występowanie *P. plurivora* w badanych rzekach było niezależne od terminu detekcji (tab. 1-3). Obecność omawianego gatunku w badanych źródłach wody przez większość roku można tłumaczyć występowaniem *P. plurivora* w lasach, przez które te rzeki przepływają i przenoszeniem zoospor patogena razem z wodą opadową lub w czasie okresowych wylewów rzek. Powiązane to jest ze składem gatunkowym drzew leśnych, których organy mogą stanowić źródło energii dla omawianego czynnika chorobotwórczego. Spadające do wody liście lub niekiedy

Tabela 1.

Wykaz izolatów *Phytophthora plurivora*, wykrytych w rzekach i użytych w badaniachList of isolates of *Phytophthora plurivora* detected from rivers used in presented studies

Nazwa rzeki	Liczba izolatów	Nazwa izolatów
Korabiewka	11	PPK1,* PPK3, PPK4, PPK5, PPK6, PPK7, PPK8, PPK9, PPK10, PPK11, PPK12
Okrzeza	8	PPO3, PPO4, PPO5, PPO6, PPO8, PPO9, PPO10, PPO12
Rawka	8	PPR3, PPR4, PPR5, PPR6, PPR7, PPR9, PPR10, PPR11
Zwierzyńka	4	PPZ4, PPZ6, PPZ7, PPZ10

* cyfra odpowiada miesiącowi izolacji; number represents month of the isolation

Tabela 2.

Średnica plam nekrotycznych [mm] na liściach różanecznika po 4 dniach od inokulacji przez izolaty *Phytophthora plurivora* w zależności od miejsca i terminu detekcji
Diameter of necrotic spots [mm] on rhododendron leaves 4 days after inoculation by *Phytophthora plurivora* isolates in relation to river and detection period

Rzeki/Miesiąc	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Korabiewka (PPK)	10 a-d	-	15,8 f-i	12,4 b-g	9,4 a-c	10,1 a-d	10,1 a-d	13,6 d-h	12,6 c-g	16,9 hi	13,2 c-h	13,3 c-h
Okrzeza (PPO)	-	-	10,2 a-d	12,9 c-g	9,8 a-d	8,6 ab	-	11,5 a-e	10,6 a-d	11,2 a-e	-	15,2 e-i
Rawka (PPR)	-	-	7,7 a	10,6 a-d	10,6 a-d	11,0 a-d	18,2 i	-	14,0 d-h	16,0 g-i	13,6 c-h	-
Zwierzyńka (PPZ)	-	-	-	11,9 b-f	-	11,7 a-e	11,0 a-d	-	-	13,5 c-h	-	-

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie p=0,05; częściowo wykorzystano dane z pracy Orlikowskiego i in. [2012]

Values indicated by the same letter do not differ significantly at p=0,05; some data presented earlier by Orlikowski et al. [2012]

Tabela 3.

Średnica plam nekrotycznych [mm] na liściach różanecznika po 6 dniach od inokulacji przez izolaty *Phytophthora plurivora* w zależności od miejsca i terminu detekcji
Diameter of necrotic spots [mm] on rhododendron leaves 6 days after inoculation by *Phytophthora plurivora* isolates in relation to river and detection period

Rzeki/Miesiąc	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Korabiewka (PPK)	16,4 bc	-	25,7 h-l	23,5 g-k	22,4 f-i	19,3 c-g	19,4 c-g	25,0 h-l	21,9 e-i	25,9 i-l	25,7 h-l	26,5 l-m
Okrzeza (PPO)	-	-	17,7 b-f	23,3 g-k	17,2 b-e	14,3 ab	-	23,1 g-j	18,8 b-g	16,8 b-d	-	28,8 lm
Rawka (PPR)	-	-	11,7 a	17,3 b-e	19,1 b-g	20,8 c-h	30,9 m	-	27,8 j-m	28,2 k-m	25,3 h-l	-
Zwierzyńka (PPZ)	-	-	-	20,1 c-g	-	17,8 b-f	22,8 g-j	-	-	21,5 d-i	-	-

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie p=0,05; częściowo wykorzystano dane z pracy Orlikowskiego i in. [2012]

Values indicated by the same letter do not differ significantly at p=0,05; some data presented earlier by Orlikowski et al. [2012]

części pędów są kolonizowane przez zoospory i w ciągu kilku dni tworzą się na nich liczne zoosporangia. Nawet przy niewielkich wahanach temperatury dochodzi do uwalniania się zoospor z zarodni płytkowych. Cykl ten trwa od wiosny do listopada, a *P. plurivora* może rozwijać się nawet przy temperaturze około 5°C [Werres 1995].

Analiza kolonizacji blaszek liściowych różanecznika wskazuje, że niezależnie od źródła i terminu detekcji, wszystkie izolaty powodowały nekrozę liści (tab. 2 i 3). Po 4 dniach inkubacji średnica plam nekrotycznych wahała się od 7,7 do 18,2 mm (rozwój nekrozy od 2 do 4,5 mm/dobę). Zgnilizna rozwijała się nieco szybciej na liściach inokulowanych izolatami wykrytymi w wodzie w okresie od października do grudnia (średnio 3,5 mm/dobę), a najwolniej, gdy blaszki zakażono kulturami uzyskanymi w maju (średnio 2,5 mm/dobę). Po 6 dniach inkubacji średnica plam nekrotycznych wahała się od 11,7 do 30,9 mm (rozwój nekrozy od 2 do 5 mm/dobę), ze średnią z okresu badań dla wszystkich analizowanych rzek równą około 3,7 mm. Na tle tych danych tkanki liści różanecznika kolonizowane były wyraźnie szybciej przez izolaty uzyskane w listopadzie i grudniu (średnio 5,5 mm/dobę). Nie stwierdzono istotnych różnic w chorobotwórczości badanych izolatów poza kulturą wykrytą w Rawce w marcu. Zarówno po 4, jak i 6 dniach inkubacji liście były kolonizowane przez ten izolat w tempie 1,9 mm/dobę, podczas gdy w przypadku izolatu z Korabiewki wartość ta wynosiła co najmniej 4 mm/dobę (tab. 3).

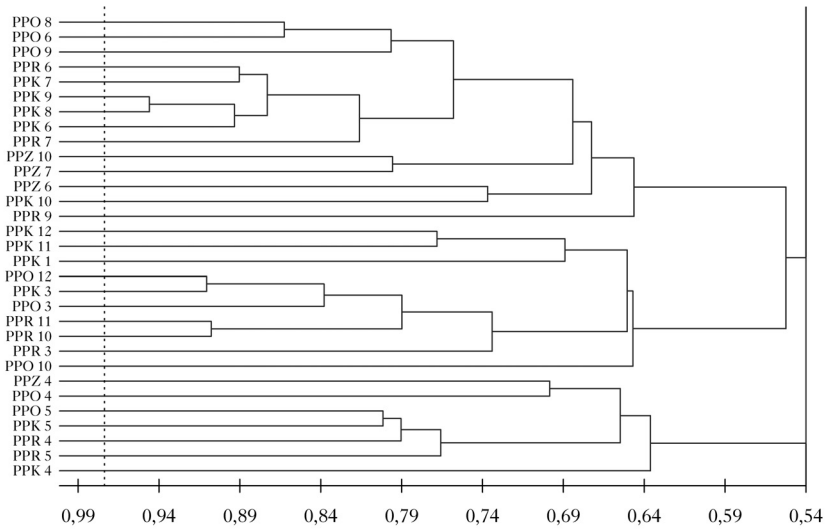
Polimorficzne fragmenty DNA uzyskano w reakcjach ze wszystkimi użytymi starterami. Sekwencje starterów oraz liczbę otrzymanych prążków dla każdego startera przedstawiono w tabeli 4. Podobieństwo genetyczne 31 badanych izolatów *P. plurivora*, określone w oparciu o dane wygenerowane metodą ISSR, kształtowało się na poziomie 54-94% (ryc.). Najwyższe wskaźniki podobieństwa genetycznego zaobserwowano dla izolatów z Korabiewki PPK8 i PPK9. Na dendrogramie wyróżniono trzy skupienia (klastry), w których badane izolaty grupowały się w zależności od okresu ich detekcji. W pierwszym skupieniu znalazły się izolaty uzyskane w miesiącach letnich (czerwiec-wrzesień) oraz dwa izolaty uzyskane w październiku (PPK10 z Korabiewki i PPZ10 ze Zwierzynki). W drugim skupieniu, poza izolatem PPO10, znalazły się izolaty *P. plurivora* otrzymane w miesiącach późnojesiennych i zimowych (styczeń, marzec, listopad i grudzień). W trzecim klastrze zgrupowane zostały izolaty z kwietnia i maja. Pomimo dużego zróżnicowania genetycznego *P. plurivora*, nie stwierdzono znacznych różnic w patogenności izolatów w stosunku do różanecznika. Wyjątek stanowi wspomniany powyżej izolat z Rawki PPR3, który kolonizował liście istotnie najwolniej (tab. 3). Podobne zależności otrzymali Bhat i Browne [2007], którzy odnotowali wysoki poziom zróżnicowania genomowego, natomiast niewielkie zróżnicowanie w agresywności izolatów *P. citricola* wobec pędów migdała.

Tabela 4.

Sekwencje starterów, liczba i charakterystyka prążków wygenerowanych metodą ISSR z DNA 31 izolatów *Phytophthora plurivora*

Nucleotide sequences of primers, number and characteristics of bands produced by ISSR primers with DNA of 31 isolates of *Phytophthora plurivora*

Nazwa	Starter	Liczba uzyskanych prążków	Prążki polimorficzne	
	Sekwencja nukleotydów		Liczba	Procent
808	(AG)8 C	6	5	83
827	(AC)8 G	5	3	60
842	(GA)8 YG	5	5	100
857	(AC)8 YG	6	4	66
889	DBD (AC)7	8	7	88
890	VHV (GT)7	9	8	88
DBD	DBD (GA)7	6	6	100



Ryc.

Podobieństwo genetyczne analizowanych izolatów *Phytophthora plurivora*
Genetic similarity of analysed *Phytophthora plurivora* isolates

Badania Hansena i Delatoura [1999] wskazują na występowanie gatunków *Phytophthora* w lasach dębowych północnej Francji niezależnie od zdrowotności drzew. Wśród wykrytych gatunków dominował *P. citricola* zarówno w nasadzeniach drzew liściastych, jak i iglastych, na co wskazały również wcześniejsze badania Junga i in. [1996]. Wykrywano go bowiem zarówno w lasach z dominacją dębów, jak również z udziałem wiązu, jesionu i olszy. Autorzy ci wskazują, że obok występowania tego gatunku w strumieniach przepływających przez badane lasy, wykrywali go również w lokalnych zagłębieniach wypełnionych wodą. Przy większych opadach deszczu i wroście poziomu wody zarodniki płytkowe *P. plurivora*, występujące w tych zagłębieniach, mogą być roznoszone w lesie, a także wnoszone do lokalnych cieków i rozprzestrzeniane w regionie oraz kraju. Uzyskane dane wskazują na nieco szybszą kolonizację tkanek różanecznika przez izolaty uzyskane z rzek w okresie późnojesiennym i zimowym. Może to wskazywać na wpływ zanieczyszczeń wody, w tym prawdopodobnie i resztek środków ochrony roślin, na aktywność uzyskanych izolatów *P. plurivora*. Jednakże stwierdzone zróźnicowanie genetyczne nie miało wpływu na chorobotwórczość zdecydowanej większości testowanych izolatów tego patogena.

Wnioski

- ✦ *Phytophthora plurivora* okazał się najczęściej występującym gatunkiem w badanych rzekach przepływających przez tereny leśne. Wynika to zapewne z licznych roślin-gospodarzy dla tego patogena i możliwości jego rozprzestrzeniania z tych żywicieli między innymi do różnych źródeł wody.
- ✦ Wykazano, że niezależnie od miejsca i czasu detekcji, izolaty *P. plurivora* były chorobotwórcze dla roślin.
- ✦ Izolaty *P. plurivora* uzyskane z wody od października do grudnia okazały się szybszymi kolonizatorami tkanek liści niż kultury tego gatunku z innych terminów detekcji. Może to świadczyć o zanieczyszczeniu wody przez różne związki w innym okresie detekcji i ich niekorzystnym wpływie na patogen.

✚ Analiza zróżnicowania genomowego 31 izolatów *P. plurivora* wykazała ich 54-94% podobieństwo, przy czym było ono największe dla dwóch kultur z Korabiewki. Mimo dużego zróżnicowania genomowego, stwierdzono niewielkie różnice w patogeniczności izolatów.

Literatura

- Arnau G., Lallemand J., Bourgoin M. 2001. Are AFLP markers the best alternative for cultivar identification? Acta Horti. 546: 301-306.
- Bhat R. G., Browne G. T. 2007. Genetic diversity in populations of *Phytophthora citricola* associated with horticultural crops in California. Plant Dis. 91 (12): 1556-1563.
- Hansen E., Delator C. 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. Ann. For. Sci. 56: 539-546.
- Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. Eur. J. For. Path. 26: 253-272.
- Jung T., Burgess T. I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolate from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. Persoonia 22: 95-110.
- 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 (2): 163-168.
- Orlikowski L. B., Duda B., Szkuta G. 2004a. *Phytophthora citricola* on European beech and silver fir in Polish forest nurseries. J. Plant Prot. Res. 44 (1): 57-64.
- Orlikowski L. B., Oszako T. 2009. Fytofitorozy w szkółkach i drzewostanach leśnych. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Duda B., Szkuta G. 2004b. Występowanie *Phytophthora citricola* na jesionie wyniosłym (*Fraxinus excelsior*) w szkółkach leśnych. Leśne Prace Badawcze 4: 129-136.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Ptaszek M. 2011a. Zagrożenie szkółek leśnych przez gatunki *Phytophthora*. Sylwan 155 (5): 322-329.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Rodziewicz A., Nachwatal J., Thinggard K., Jung. T. 2011b. *Phytophthora* root and collar rot of *Fraxinus excelsior* stands in Poland and Denmark. Forest Pathology 41: 510-519.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011c. Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody. Sylwan 155 (7): 496-499.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T., Meszka B., Sadowski Cz. 2011d. Woda jako źródło przeżywania i rozprzestrzeniania gatunków *Phytophthora*. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 5: 251-261.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Trzewik A., Wierzychowski M. 2012. Występowanie i ocena chorobotwórczości izolatów *Phytophthora* spp. uzyskanych z rzek i zbiornika wodnego. Sylwan 156 (7): 533-541.
- Orlikowski L. B., Szkuta G. 2003a. *Phytophthora citricola* on *Rhododendron* spp. in Polish nurseries. J. Plant Prot. Res. 43 (1): 19-24.
- Orlikowski L. B., Szkuta G. 2003b. First notice of *Phytophthora* tip blight on *Picea omorika* on *Thuja occidentalis* in Poland. Phytopathol. Pol. 28: 63-67.
- Werres S. 1995. Influence of *Phytophthora* isolate and the seed source on the development of beech (*Fagus sylvatica*) seedling blight. Eur. J. For. Path. 25: 381-390.

SUMMARY

Occurrence and differentiation of *Phytophthora plurivora* isolates detected from four rivers running through forest areas

Phytophthora plurivora was isolated from 4 rivers swimming through forest areas independently from detection period. All isolates (31) colonized rhododendron leaf blades, but necrosis spread faster when cultures obtained from October to December were used for plant tissues inoculation. The level of genetic similarity between these isolates varied from 54 to 94%. No correlation between genetic differentiation and pathogenicity of tested isolates was noticed. Isolates of *P. plurivora* were grouped in depending on period of their detection in rivers.