



**PAŃSTWOWA INSPEKCJA OCHRONY ROŚLIN I NASIENICTWA
GŁÓWNY INSPEKTORAT**

ul. Wspólna 30, 00-930 Warszawa
tel: (22) 623 23 02, fax: (22) 623 23 04
www.piorin.gov.pl; e-mail gi@piorin.gov.pl

***Phytophthora cactorum* (Leb. & Cohn) Schröeter
- sprawca zgnilizny korony truskawki**

CZĘŚĆ II - IZOLACJA I IDENTYFIKACJA

Tekst i zdjęcia: dr Grażyna Szkuta
Pytania i uwagi: g.szkuta@piorin.gov.pl

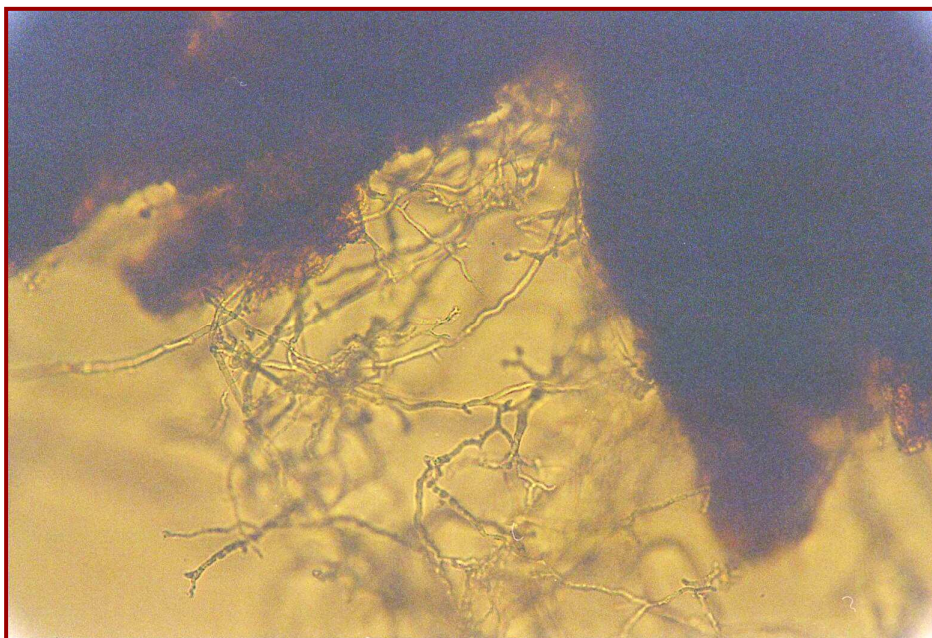
I. METODY IZOLACJI

W celu określenia sprawcy porażenia korony truskawki można zastosować równolegle trzy metody badania tj. stymulację zarodnikowania patogena na chorych fragmentach w roztworach soli, gleby lub wody, izolację pośrednią z użyciem pułapki oraz bezpośrednią izolację na podłoża agarowe.

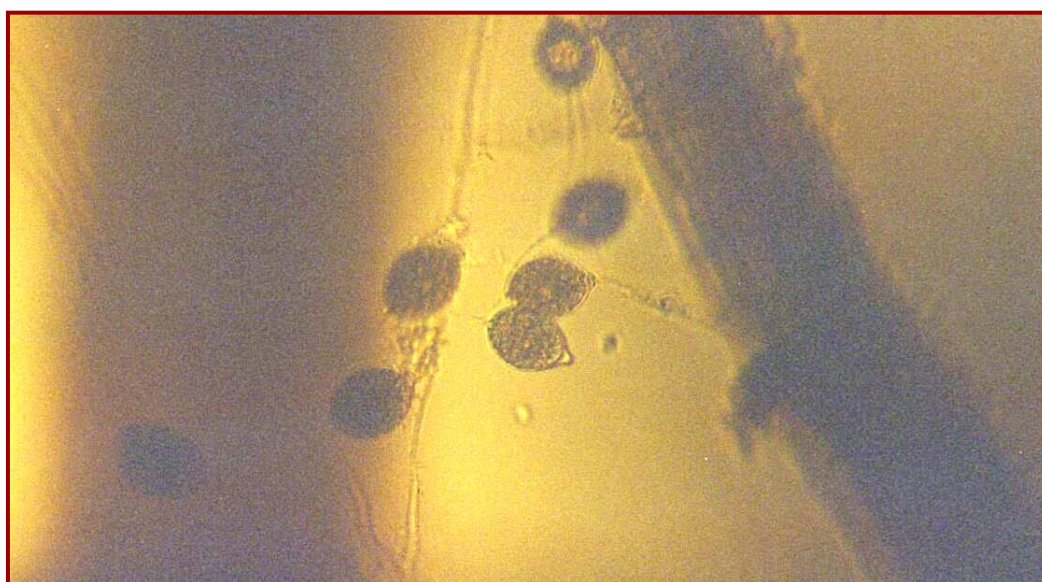
1. Stymulacja zarodnikowania

Pozwala w prosty sposób i w krótkim czasie (24-48 godzin) określić, czy sprawcą zamierania korony truskawki jest *P. cactorum*, bowiem w środowisku wodnym patogen ten tworzy charakterystyczne zoosporangia. Dzięki zastosowaniu tej metody można również rozróżnić, czy sprawcą zamierania jest gatunek z rodzaju *Phytophthora*, czy też *Pythium*. Do stymulacji można wykorzystać następujące roztwory wodne: 1% roztwór glebowy (sterylny lub niesterylny), sól Petriego (ZAŁĄCZNIK), wodę ze stawu lub destylowaną. Fragmenty z pogranicza chorej tkanki obmywa się bieżącą wodą wodociagową, a następnie suszy i wyklada na szalki (śr. 9 cm) z agarem wodnym i zalewa 15 ml odpowiedniego roztworu wodnego. Tak przygotowane płytki inkubuje się na stołach laboratoryjnych w temperaturze pokojowej, przy

zachowaniu naturalnych warunków oświetlenia. Codziennie kontroluje się wzrost mikroorganizmów z użyciem mikroskopu (umieszczając szalkę z badanym materiałem pod obiektywem i pod małym powiększeniem poszukując komórczakowych strzępek plechy *P. cactorum* (fot. 1) oraz typowego zarodnikowania dla tego gatunku (fot. 2 i 3).



Fot. 1. Wzrost strzępek plechy *P. cactorum* w roztworze Petriego.



Fot. 2. Tworzenie typowych dla *P. cactorum* brodawkowych zoosporangiów w roztworze Petriego.



Fot. 3. Zoosporangia *P. cactorum* tworzące się na sympodialnie rozgałęzionych sporangioforach.

2. Izolacja z wykorzystaniem pułapki

W metodzie tej wykorzystuje się zdolność gatunków z rodzaju *Phytophthora* do infekowania zdrowych, nieuszkodzonych tkanek roślinnych (ERWIN I RIBEIRO, 1996; RIBEIRO, 1978). Technika ta polega na inokulacji np. zielonych jabłek odm. Granny Smith fragmentami porażonych tkanek roślinnych. Wcześniej jabłka myje się pod bieżącą wodą z użyciem detergentu, a następnie dezynfekuje 96% alkoholem etylowym. Przy pomocy korkoboru, o średnicy 0,75 cm, robi się otwory i umieszcza w nich przygotowane wcześniej fragmenty, pobrane z porażonej korony truskawki.



Następnie przykrywa się je pozostałą częścią owocu.

Fot. 4. Test pułapkowy z użyciem jabłek

Jeden owoc inokuluje się maksymalnie w 4 miejscach, a następnie zabezpiecza się je taśmą samoprzylepną (Fot. 4). Do każdej próby dołącza się kontrolę negatywną tj. jabłko uszkodzone, ale bez fragmentów badanej tkanki. Każdy owoc umieszcza się w worku foliowym i pozostawia na stołach laboratoryjnych. Po upływie 4-10 dni inkubacji, z miejsc inokulacji, w których pojawiły się nekrotyczne plamy przeprowadza się izolację na odpowiednie podłoża agarowe.

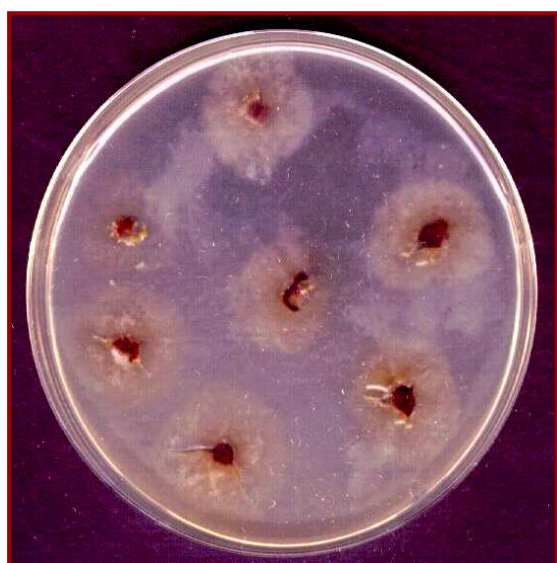
3. Izolacja bezpośrednia na podłoża hodowlane

Izolacja *P. cactorum* na podłoża hodowlane z porażonych części pędu skróconego jest najłatwiejsza w początkowym stadium choroby. Później, pomimo typowych symptomów zgnilizny korony trudno jest uzyskać wzrost patogena na podłożach agarowych. Chociaż jest to gatunek homotaliczny (jednoplechowy) tj. tworzący organy rozmnażania generatywnego zarówno w porażonych tkankach truskawki, jak i na pożywkach agarowych, to stwierdzenie obecności oogoniów w nekrotycznych, zabarwionych na czerwono-brązowo tkankach korony może nastroić sporo trudności.

Do izolacji wybiera się materiał w początkowym stadium choroby, z widocznym już pograniczem. Fragmenty te, o ile jest to uzasadnione, dezynfekuje się krótko w 70% alkoholu etylowym, płucze w wodzie destylowanej sterylnej i suszy. Można również izolować patogena bezpośrednio z porażonej tkanki, po jej uprzednim dokładnym, nawet kilkugodzinnym opłukiwaniu pod bieżącą wodą wodociągową. Następnie postępuje się, jak w przypadku użycia dezynfektantu. Przygotowane do izolacji fragmenty tkanki tną się w sterylnych warunkach na drobne części (ok. 0,5 cm) i wykładają na agar wielowarzywny (V8) (ZAŁĄCZNIK), agar glukozowo-ziemniaczany (AGZ) i agar kukurydziany (CMA). Szalki inkubuje się w ciemności, w temp 23-25°C. Po upływie 24-48 godzin każdą szalkę kontroluje się pod mikroskopem na obecność wzrostu strzępek o cechach morfologicznych dla rodzaju *Phytophthora* (m.in. komórczakowe strzępki, boczne rosnące często prawie pod kątem prostym, hialinowe). W tym celu szalkę Petriego odwraca się do góry dnem i pod małym

powiększeniem mikroskopu poszukuje się strzępek *Phytophthora* sp. Z miejsc, w których stwierdzono wzrost podejrzanych strzępek przeprowadza się reizolację, bowiem strzępki grzybów właściwych szybko przerastają wolno rosnącą plechę *Phytophthora* i wówczas trudno jest uzyskać czyste kultury patogena.

W przypadku izolacji z tkanek roślinnych w początkowym stadium choroby często można uzyskać prawie czysty wzrost *P. cactorum* wokół wyłożonych fragmentów korony lub ogonków liściowych na pożywkach agarowych (Fot. 5 i 6).



Fot. 5. Wzrost *P. cactorum* z ogonków liściowych na V8 - 18°C, 3 dni



Fot. 6. Wzrost *P. cactorum* z korony na pożywce V8z antybiotykiem - 18°C, 5 dni

II. CHARAKTERYSTYKA MORFOLOGICZNA

W obrębie rodzaju *Phytophthora* gatunek ten uważa się za jeden z łatwiejszych do identyfikacji na podstawie cech morfologicznych, bowiem tworzy on zoosporangia (zarodnie płytkowe) i gametangia (lęgnie i plemnie) zarówno w porażonym materiale roślinnym, jak i w czystych kulturach na podłożach agarowych.

1. Plecha (grzybnia)

Strzępki plechy są rozgałęzione prawie pod kątem prostym, a czasami zwężone u podstawy. Młode strzępki mają charakter komórczakowy, jednak ściany poprzeczne

tworzą się w miejscach tworzenia struktur rozmnażania generatywnego, a także w strzępkach starszych. Ich średnica jest zróżnicowana i zależy zarówno od fizycznego i chemicznego składu podłoża hodowlanego, jak i charakteru strzępek, czy są one powietrzne, powierzchniowe, substratowe lub też rosną wewnątrz tkanek rośliny żywicielskiej.

2. Chlamydospory

Tylko u nielicznych izolatów *P. cactorum* stwierdza się obecność chlamydospor. Jednakże u większości izolatów nie obserwuje się tych struktur. Jeśli się one tworzą to powstają zwykle szczytowo (terminalnie), rzadziej międzystrzępkowo (interkalarnie); są zabarwione hialinowo, o cienkich ścianach, których grubość nie przekracza 1,5 μm . Wielkość chlamydospor waha się od 14 do 55 μm , średnie wymiary wynoszą 25-33 μm (GERRETTSON-CORNELL 1994). Z kolei KRÖBER (1985) podaje, że ich wielkość mieści się w zakresie od 16 do 38 μm , a średnie wymiary wynoszą 27,5 μm .

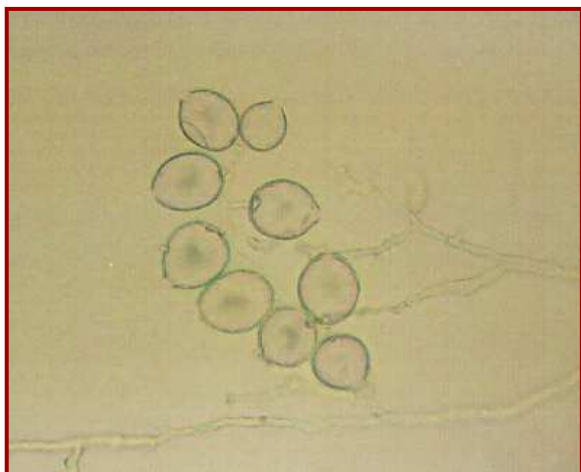
3. Sporangiofory

Są proste lub rozgałęzione sympodialnie. Mogą być zebrane luźno, ale najczęściej mają charakter zwarty i w grupach może tworzyć się od 20 do 30 zoosporangiów. Średnica sporangioforów wynosi od 2 do 5 μm .

4. Zoosporangia (zarodnie pływkowe)

P. cactorum tworzy charakterystyczne zoosporangia brodawkowe (*papillate*) tj. o wyraźnie zaznaczonym zgrubieniu szczytowym i wąskim ujściu (5-7 μm szerokości). Niewielka część zoosporangiów wykazuje cechy typu *semipapillate* (półbrodawkowe), jednakże większość zarodni tworzy charakterystyczne zgrubienie szczytowe (fot. 4). Rzadko obserwuje się obecność więcej niż jednego zgrubienia szczytowego (*papilla*). Dojrzałe zoosporangia odrywają się od sporangioforów (tzw. zoosporangia odpadające), a pozostałe przy zarodniach trzonki są krótkie, zwykle mniejsze lub równe 5 μm długości. Typową cechą dla *P. cactorum* jest formowanie zoosporangiów na sporangioforach rozgałęzionych w sposób sympodialny (fot. 1 i 5). Zwykle powstają one terminalnie, sporadycznie interkalarnie. Zarodnie pływkowe są

kształtu szeroko elipsoidalnego, jajowate lub odwrotnie gruszkowate do wyraźnie okrągłych. KRÖBER (1985) i RIBEIRO (1978) podają, że wielkość zarodni płytkowych mieści się w zakresie 24-55 x 19-40 μm , a ich średnie wymiary wynoszą 35,7 x 26,8 μm . Stosunek ich długości do szerokości wynosi 1,33:1. Z kolei GERRETTSON - CORNELL



(1994) podaje, że wymiary zoosporangiów mieszczą się w zakresie 19-73 x 16-41 μm , a średnie wymiary wynoszą 27-58 x 19-32 μm . Stosunek ich długości do szerokości wynosi od 1 do 1,7, ze średnim stosunkiem równym 1,3-1,4.

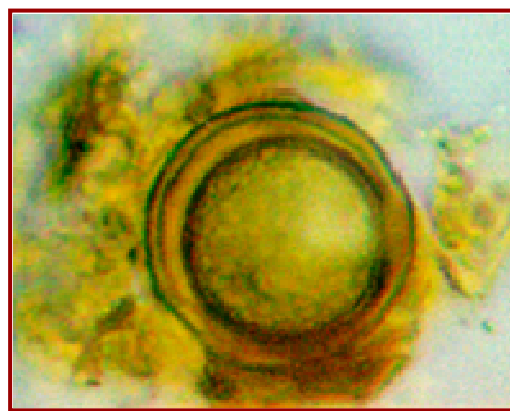
Fot. 7. Puste zoosporangia, o wąskich ujściach, powstające sympodialnie

5. Oogonia (lęgnie)

Oogonia są okrągłe, gładkościenne, o zabarwieniu hialinowym (fot. 2) do lekko bursztynowego (fot. 3). Według GERRETTSON-CORNELL (1994) średnica oogoniów mieści się w zakresie od 18 do 40 μm , a średnie wymiary wynoszą 23-30 μm . Z kolei KRÖBER, (1985) podaje, że zakres wielkości oogoniów jest mniejszy i wynosi od 23 do 35 μm , a średnio 27,4 μm .



Fot. 8. Młode hialinowe oogonium



Fot. 9. Dojrzałe bursztynowe oogonium

6. Anteridia (plemnie)

Anteridia są typu paragenicznego (przylegniowego) i położone są blisko trzonka oogonium (fot. 2, 10). Są one kształtu prawie okrągłego do nieregularnego, jednokomórkowe o wymiarach 9-21 x 9-20 μm . Czasami obserwuje się w tej samej kulturze występowanie nielicznych anteridiów typu amfigenicznego (okołolegniowego) (fot. 10) (GERRETTSON - CORNELL, 1994).



Fot. 10. Położenie anteridium - parageniczne (po lewej), amfigeniczne (po prawej)

7. Oospory

Oospory są ułożone zwykle niesymetrycznie w oogoniach (tzw. oospory apłerotyczne), o ścianie od 1 do 2 μm grubości (fot. 2, 3, 10). Wymiary oospor mieszczą się w zakresie od 15 do 35 μm , średnio 25-27 μm (GERRETTSON-CORNELL, 1994).

P. cactorum jest gatunkiem strefy umiarkowanej, wobec tego optymalna temperatura wzrostu wynosi 23-25°C. Minimalna temperatura wzrostu wynosi 2°C, a maksymalna 31°C.

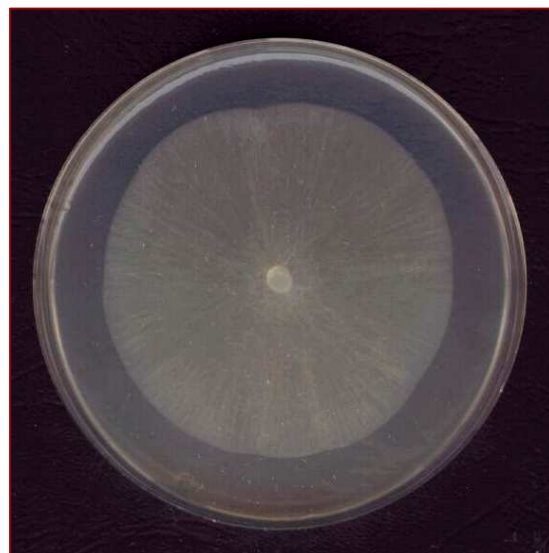
8. Charakterystyka wzrostu na podłożach agarowych

Gatunek ten, wyizolowany z różnych roślin żywicielskich i hodowany na różnego typu podłożach agarowych może tworzyć zróżnicowane wzory kultur - od promienistych aż do typu chryzantemy.

Na pożywce AGZ wzrost tego patogena jest zwarty, stosunkowo wolny, a kultura tworzy lekko płatkowaty wzór (fot. 11). Z kolei na pożywce V8 *P. cactorum* tworzy lekko promienisty wzór kultury (fot. 12) i bardzo licznie tworzą się organy rozmnażania generatywnego, ale mniej licznie zoosporangia.



Fot. 11. Wzrost *P. cactorum* (P0253) na AGZ - temp. 25°C, 5 dni



Fot. 12 Wzrost *P. cactorum* (P0253) na V8 - temp. 25°C, 5 dni

III. ZAŁĄCZNIK

1. Skład soli Petriego (wg KRÖBER, 1985)

Ca(NO ₃) ₂	0,4 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
KCl	0,06 g
H ₂ O dest.	1000 ml

2. 1% roztwór glebowy (wg ERWIN i RIBEIRO, 1996)

10 g gleby mieszać z 1000 ml wody destylowanej. Przefiltrować w celu pozbycia się większych cząstek gleby. Część roztworu poddać sterylizacji w autoklawie przez 15 min w temperaturze 121°C. Roztwór sterylny przechowywać w lodówce (4°C do 1 miesiąca). Roztwór niesterylny przechowywać do 7 dni w tych samych warunkach.

3. Pożywka wielowarzywna (V8)

Sok wielowarzywny*	200 ml
Węglan wapnia	3 g
Agar - Agar	20 g
Woda dest.	800 ml

pH = 5,6

*sok wielowarzywny FORTUNA, AGROS S.A., Łowicz

IV. LITERATURA

- GERRETTSON-CORNELL L., 1994: A compendium and classification of the species of the genus *Phytophthora* de Bary by the canons of the traditional taxonomy. Research Division State Forests of New South Wales, Sydney. Tech. Pap. 45.
- ERWIN D. C. I RIBEIRO O. K., 1996: *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS PRESS, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- KRÖBER H., 1985: Erfahrungen mit *Phytophthora* de Bary und *Pythium* Pringsheim. Mitteil. Biol. Bundesanstalt Land- und Forstwirtschaft 225, Berlin.
- RIBEIRO O. K., 1978: A source book of the genus *Phytophthora*. Vaduz, Liechtenstein: J. Cramer.