

Water as a source of *Phytophthora* spp. and their threat to growing plants

Woda źródłem gatunków *Phytophthora* spp. oraz zagrożenie wynikające z ich występowania dla upraw

Leszek B. Orlikowski¹, Aleksandra Trzewik¹, Magdalena Ptaszek¹, Dorota Tułacz²

Summary

The subject of this study was the detection of *Phytophthora* species from different water sources such as in ponds situated in ornamental nurseries, canals draining off surplus water from nursery and rivers flowing through horticultural and forest areas. Baiting method was used for *Phytophthora* detection. Moreover pathogenicity of *Phytophthora* spp. to some plants commonly cultivated in container ornamental nursery was also estimated. The obtained isolates were identified to species on the base of their morphological features and polymerase chain reaction technique. The most often isolated were *P. lacustris* and *P. plurivora*, next *P. cryptogea*, *P. citrophthora*, and *P. cactorum*. In the laboratory trials all tested isolates colonized plant tissues.

Key words: sources of water, *Phytophthora* spp., detection, identification, colonization

Streszczenie

Celem prowadzonych badań było wykrywanie gatunków *Phytophthora* w różnych źródłach wody: stawach zlokalizowanych na terenie szkółek roślin ozdobnych, kanałach odprowadzających nadmiar wody z kontenerowni oraz rzekach przepływających przez tereny ogrodnicze i leśne. Do izolacji *Phytophthora* z wody wykorzystano metodę pułapkową. Oceniano patogeniczność wybranych gatunków *Phytophthora* w stosunku do niektórych roślin powszechnie uprawianych w kontenerowych szkółkach. Identyfikację uzyskanych izolatów prowadzono w oparciu o dostępne klucze oraz przy wykorzystaniu techniki łańcuchowej reakcji polimerazy. Najczęściej izolowanymi gatunkami były: *P. lacustris* oraz *P. plurivora*, a następnie *P. cryptogea*, *P. citrophthora* i *P. cactorum*. Wykrywano je niezależnie od terminu detekcji, źródła wody oraz umiejscowienia cieków i zbiorników. W laboratoryjnych testach patogeniczności wszystkie badane izolaty *Phytophthora* kolonizowały tkanki roślin.

Słowa kluczowe: źródła wody, *Phytophthora* spp., wykrywanie, identyfikacja, kolonizacja

¹ Instytut Ogrodnictwa
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
leszek.orlikowski@inhort.pl

² Instytut Biofizyki i Biochemii Polskiej Akademii Nauk
Pawiańskiego 5a, 02-106 Warszawa

Wstęp / Introduction

Gatunki rodzaju *Phytophthora* należą do najgroźniejszych patogenów roślin powodujących: nekrozę korzeni, podstawy pędu, zgniliznę owoców i bulw (Erwin i Ribeiro 1996). Występują na wszystkich kontynentach poza Antarktydą, doprowadzając niekiedy do znacznych strat w ekosystemach, a w szczególności w szkółkach roślin ozdobnych i leśnych (Orlikowski 2000; Orlikowski i wsp. 2004). W Polsce coraz częściej izoluje się gatunki tego rodzaju z chorych roślin, gleby i wody (Orlikowski i wsp. 2008). Związane jest to m.in. ze wzrostem międzynarodowego obrotu materiałem roślinnym, zmianą technologii uprawy roślin, głównie z ich produkcją w pojemnikach i systematycznym nawadnianiem oraz nawożeniem (Orlikowski 2000; Brasier 2008). Duże ilości wody niezbędnej do nawadniania upraw powodują wzrost kosztów produkcji roślin, a ograniczenie możliwości korzystania z wód głębinowych powoduje, że producenci roślin korzystają z jej źródeł w lokalnych rzekach, strumieniach czy wodach stojących. Spływający ze szkółek nadmiar wody wraz z zarodnikami *Phytophthora* spp. trafia do rzek i zbiorników wodnych, zanieczyszczając je i dając możliwość ich roznoszenia na duże odległości. Przy pobieraniu skażonej wody do podlewania roślin dochodzi do wniesienia określonego gatunku *Phytophthora* do uprawy (Orlikowski 2006). Okres ostatnich kilku lat to wzrost zainteresowania wodą jako jednym z głównych źródeł tej grupy patogenów (Milgroom i Peever 2003; Hong i Moorman 2005; Orlikowski 2006; Orlikowski i wsp. 2008). Według Honga i Moormana (2005) woda używana do podlewania i skażona przez gatunki rodzaju *Phytophthora* jest głównym, jeśli nie jedynym, źródłem tej grupy patogenów w szkółkach, sadach czy warzywnikach.

Celem prowadzonych badań było wykrywanie gatunków *Phytophthora* w różnych źródłach wody oraz ocena patogeniczności wybranych gatunków *Phytophthora* w stosunku do roślin uprawianych w szkółkach kontenerowych.

Materiały i metody / Materials and methods

Do wykrywania gatunków *Phytophthora* wybrano 4 rzeki: Ner, Okrzesza, Skierniewka i Zwierzynka przepływające przez tereny leśne, zagajniki, łąki oraz pola uprawne województw łódzkiego i mazowieckiego, 4 stawy oraz 2 kanały znajdujące się na terenie szkółek.

Do wykrywania gatunków rodzaju *Phytophthora* użyto liści pułapkowych różanecznika (*Rhododendron* sp.) odmiany Nova Zembla, stosując metodę opisaną przez Themann i Werres (1998) oraz Orlikowskiego i wsp. (2011). Przewieszone do laboratorium liście pułapkowe odkażano powierzchniowo i ich fragmenty wkładano na pożywkę glukozowo-ziemniaczaną (PDA – Potato Dextrose Agar, Merck). Kolonie wyrastające z wyłożonych tkanek przeszczepiano na skosy z pożywką PDA. Uzyskane kultury *Phytophthora* oznaczano do gatunku na podstawie ich cech morfologicznych (Erwin i Ribeiro 1996) oraz przy wykorzystaniu technik molekularnych (Ěrsek i wsp. 1994; Nechwatal i Mendgen 2006; Trzewik

i wsp. 2010; Boersma i wsp. 2000; Nechwatal i wsp. 2012).

Patogeniczność izolatów *P. plurivora*, *P. lacustris*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea* i *P. cactorum*, otrzymanych z różnych źródeł wody, badano w warunkach laboratoryjnych, inokulując pędy wierzby i cyprysika oraz liście różanecznika. Na testowane organy roślin, umieszczone w kuwetach wyłożonych wilgotną bibułą filtracyjną i przykrytych plastikową siatką, nakładano 5 mm średnicy krążki pożywki PDA przerośniętej badanym patogenem. Długość i/lub średnicę nekrozy mierzono po 4–20 dniach inkubacji w temperaturze 22–24°C. Doświadczenia założono w układzie bloków kompletnie losowanych w 4 powtórzeniach po 5 fragmentów roślin. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic pomiędzy średnimi ($p = 0,05$) oceniano testem t-Duncana.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Występowanie *Phytophthora* spp. w badanych źródłach wody stwierdzano przez cały rok. Najczęściej izolowanymi gatunkami były: *P. lacustris* oraz *P. plurivora*, a następnie: *P. cryptogea*, *P. citrophthora* i *P. cactorum*. Wykrywano je niezależnie od terminu, źródła wody oraz umiejscowienia cieków i zbiorników. Uzyskane wyniki wskazują na związek pomiędzy składem gatunkowym *Phytophthora* w wodzie a usytuowaniem rzek, kanałów i stawów. W rzekach przepływających przez tereny ogrodnicze obok *P. plurivora* stwierdzono także *P. cactorum* i *P. citrophthora*. Podobne zależności zaobserwowano również w kanałach i stawach usytuowanych na terenie gospodarstw szkółkarskich. Izolowane ze stawów i kanałów gatunki *P. plurivora*, *P. cryptogea* oraz *P. citrophthora*, to powszechne patogeny występujące w szkółkach roślin ozdobnych. *P. cactorum* jest groźnym patogenem niektórych podkładek wegetatywnych jabłoni (Bielenin i Borecki 1970) oraz truskawek i agrestu (Meszka i Bielenin 2011), natomiast *P. citrophthora* to coraz częściej spotykany czynnik chorobotwórczy roślin iglastych, liściastych oraz bylin (Ptaszek 2008; Orlikowski i wsp. 2009). Obecność wyżej wymienionych gatunków *Phytophthora* w wodzie jest zapewne związana z ich występowaniem w szkółkach. Wcześniejsze badania Orlikowskiego (2006) wskazywały na wodę jako źródło gatunków rodzaju *Phytophthora*. Na bukszpanie i żywotniku odmiany Fastigiata, podlewanymi wodą ze zbiornika znajdującego się na terenie szkoły, stwierdzono symptomy żółknienia pojedynczych pędów, rozszerzające się stopniowo, a następnie ich brązowienie, a w przypadku żywotnika zamieranie wierzchołków pędów. Analiza mikologiczna porażonych tkanek wykazała, że przyczyną choroby był gatunek *P. plurivora*. Ghimre i wsp. (2009) stwierdzili, że na zróżnicowanie gatunków występujących w wodzie ma wpływ zakres i liczba uprawianych roślin, co potwierdziły przeprowadzone badania. Spływający ze szkółek nadmiar wody wraz z zarodnikami *Phytophthora* trafia do rzek i zbiorników wodnych, zanieczyszczając je i umożliwiając ich ponowne wprowadzenie do uprawy podczas podlewania, przyczyniając się tym samym do ich rozprzestrzeniania.

W warunkach laboratoryjnych wszystkie badane izolaty *Phytophthora*, uzyskane z różnych źródeł wody, kolonizowały tkanki testowanych roślin. W doświadczeniach z cyprysikiem Lawsons, najwolniejsze tempo rozwoju nekrozy obserwowano na pędach zainokulowanych kulturami *P. cryptogea* i *P. plurivora*, z kanału w szkółce D (tab. 1, 2). Najszybszym kolonizatorem pędów cyprysika okazał się izolat *P. plurivora* z rzeki Okrzeszy i kanału w szkółce C (tab. 1), natomiast w przypadku *P. cryptogea* kultury izolowane z rośliny gospodarka oraz stawu w szkółce C (tab. 2). W doświadczeniach

z różanecznikiem szybszy rozwój nekrozy obserwowano, gdy blaszki liściowe inokulowano izolatami *P. citrophthora* aniżeli *P. cactorum*. Najbardziej patogeniczny okazał się izolat *P. citrophthora* z kanału w szkółce C (tab. 3). W testach z wierzbą nie stwierdzono istotnych różnic w szybkości rozwoju zgnilizny na zainokulowanych pędach roślin (tab. 4). W celu spełnienia postulatów Kocha z tkanek z objawami chorobowymi reizolowano patogen i ponownie potwierdzano jego przynależność gatunkową za pomocą techniki łańcuchowej reakcji polimerazy ze starterami gatunkowo-specyficznymi.

Tabela 1. Kolonizacja pędów cyprysika Lawsons odmiana Ellwoodii przez izolaty *P. plurivora* z różnych źródeł wody
Table 1. Colonization of Lawsona cypress cultivar Ellwoodii shoot parts by *P. plurivora* from different sources of water

Źródło izolatów <i>P. plurivora</i> Source of <i>P. plurivora</i> isolates	Długość nekrozy [mm] po dniach od inokulacji Length of necrosis [mm] days after inoculation		
	7	13	20
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	13,4 b	17,4 c	20,4 bc
Kanał w szkółce C – Nursery canal C	12,0 b	17,6 c	23,4 cd
Kanał w szkółce D – Nursery canal D	7,9 a	11,5 a	16,0 a
Rzeka Ner – Ner river	12,2 b	14,3 b	17,4 ab
Rzeka Okrzesza – Okrzesza river	14,4 b	20,4 d	24,2 d

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
Means within a column having letters in common do not differ significantly 5% according to Duncan's test

Tabela 2. Kolonizacja pędów cyprysika Lawsons odmiana Ellwoodii przez izolaty *P. cryptogea* z różnych źródeł wody
Table 2. Colonization of cypress Lawsona cultivar Ellwoodii shoot parts by *P. cryptogea* from different sources of water

Źródło izolatów <i>P. cryptogea</i> Source of <i>P. plurivora</i> isolates	Długość nekrozy [mm] po dniach od inokulacji Length of necrosis [mm] days after inoculation		
	7	13	20
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	13,6 c	21,0 c	24,5 b
Kanał w szkółce D – Nursery canal D	8,6 a	11,5 a	13,8 a
Staw w szkółce C – Nursery pond C	13,9 c	18,0 b	21,4 b
Staw w szkółce D – Nursery pond D	9,2 ab	12,6 a	15,3 a
Rzeka Ner – Ner river	10,9 b	13,3 a	15,0 a

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
Means within a column having letters in common do not differ significantly 5% according to Duncan's test

Tabela 3. Kolonizacja liści różanecznika przez izolaty *P. citrophthora* oraz *P. cactorum* z różnych źródeł wody
Table 3. Colonization of *Rhododendron* leaf blades by *P. citrophthora* and *P. cactorum* from different sources of water

Źródło izolatów <i>Phytophthora</i> spp. Source of <i>Phytophthora</i> spp.	Średnica nekrozy [mm] po dniach inokulacji Diameter of necrosis [mm] days after inoculation	
	4	6
<i>P. citrophthora</i>		
Kanał C – Nursery canal C	11,7 c	19,0 c
Kanał D – Nursery canal D	9,0 b	16,3 bc
Rzeka Skierniewka – Skierniewka river	8,5 b	13,0 ab
<i>P. cactorum</i>		
Staw Radziwiłłów – Radziwiłłów pond	7,3 ab	14,0 ab
Rzeka Ner – Ner river	6,1 a	10,6 a
Rzeka Zwierzyniec – Zwierzyniec river	7,1 ab	11,1 a

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
Means within a column having letters in common do not differ significantly 5% according to Duncan's test

Tabela 4. Kolonizacja pędów wierzby (*Salix alba*) przez izolaty *P. lacustris* z różnych źródeł wody i osadów dennych
 Table 4. Colonization of willow (*Salix alba*) by *P. lacustris* from different source of water and sediments

Źródło izolatów <i>P. lacustris</i> Source of <i>P. lacustris</i>	Średnica nekrozy [mm] po dniach inokulacji Length of necrosis [mm] days after inoculation	
	4	6
Rzeki – Rivers		
Okrzesza	10,1 a	32,6 b
Zwierzyniec	15,8 b	35,3 b
Staw w szkółce – Nursery pond		
Staw w szkółce Z – Nursery pond Z	20,6 b	34,6 b
Osady dennie – Sediments		
Rzeka Skierniewka – Skierniewka river	16,6 b	35,6 b
Staw w szkółce C – Nursery pond C	19,6 b	26,0 a
Staw w szkółce D – Nursery pond D	19,5 b	31,8 b

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncan
 Means within a column having letters in common do not differ significantly 5% according to Duncan's test

O występowaniu i zagrożeniu roślin przez gatunki rodzaju *Phytophthora* dowodzą także badania MacDonald i wsp. (1994), Busha i wsp. (2003) oraz Orlikowskiego i wsp. (2010). Ponadto doniesienia Ptaszek i wsp. (2011) potwierdzają chorobotwórczość izolatów *P. citrophthora* i *P. cinnamomi* uzyskanych z wody w stosunku do 4 gatunków roślin. W badaniach tych wykazano, iż izolaty *Phytophthora* z wody kolonizują tkanki roślin w podobnym stopniu, jak z roślin żywicielskich. Pozwala to na stwierdzenie, że występowanie patogenów rodzaju *Phytophthora* w wodzie stwarza realne zagrożenie dla roślin zarówno w środowisku uprawowym, jak i naturalnym.

Wnioski / Conclusions

1. W 10 analizowanych źródłach wody stwierdzono występowanie gatunków *Phytophthora* z dominacją: *P. lacustris*, *P. plurivora*, *P. cryptogea* i *P. citrophthora*.
2. W warunkach laboratoryjnych potwierdzono chorobotwórczość izolatów *Phytophthora* z różnych źródeł wody względem niektórych roślin uprawianych w szkółkach kontenerowych.
3. Uzyskane dane wskazują na cieki i zbiorniki wodne, jako istotne źródła gatunków *Phytophthora*.

Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, decyzja Nr 475/N-COST/2009/0.

Literatura / References

- Bielenin A., Borecki Z. 1970. Zgnilizna pierścieniowa podstawy pnia drzew owocowych powodowana przez grzyb *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. Acta Agrobot. 23: 356–366.
- Brasier C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade plants. Plant Pathol. 57 (5): 792–808.
- Boersma J.G., Cooke D.E.L., Sivasithamparam K. 2000. A survey of wildflower farms in the south-west of Western Australia for *Phytophthora* spp. associated with root rots. Aust. J. Exper. Agricult. 40: 1011–1019.
- Bush E.A., Hong C.X., Stromberg E.L. 2003. Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of recycling irrigation system. Plant Dis. 87: 1500–1506.
- Ěrsek T., Schoelz J.E., English J.T. 1994. PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2616–2621.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul, MN, 562 pp.
- Ghimre S.R., Richardson P.A., Moorman G.W., Lea-Cox J.D., Ross D.S., Hong C.X. 2009. An *in situ* baiting bioassay for detection *Phytophthora* species in irrigation runoff containment basins. Plant Pathol. 58: 577–583.
- Hong C.X., Moorman G.W. 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. Rev. Plant Sci. 24: 189–208.
- MacDonald J.D., Ali-Shtayeh M.S., Kabashima J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. Plant Dis. 78: 607–611.
- Meszka B., Bielenin A. 2011. Agrest – nowym gospodarzem dla *Phytophthora cactorum*. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 51 (3): 1184–1187.
- Milgroom M.G., Peever T.L. 2003. Population biology of plant pathogens. Plant Dis. 87: 608–617.
- Nechwatal J., Bakonyi J., Cacciola S.O., Cooke D.E.L., Jung T., Nagy Z.Á., Vannini A., Vettriano A.M., Brasier C.M. 2012. The morphology, behaviour and molecular phylogeny of *Phytophthora* taxon Salixsoil and its redesignation as *Phytophthora lacustris* sp. nov. Plant Pathology. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02638.x.

- Nechwatal J., Mendgen K. 2006. Widespread detection of *Phytophthora* taxon Salixsoil in the littoral zone of Lake Constance, Germany. Eur. J. Plant Pathol. 114: 261–264.
- Orlikowski L.B. 2000. Najgroźniejsze patogeny w szkółkach roślin ozdobnych. Sylwan 4: 155–159.
- 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. 2004. *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., Szkuta G. 2009. *Phytophthora citrophthora* – nowy patogen roślin ozdobnych i leśnych w Polsce. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 49 (2): 686–690.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2008. Increase of plant threat by *Phytophthora* species in Poland. Phytopathol. Pol. 48: 39–43.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011. Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody. Sylwan 155 (7): 493–499.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T., Wojtkowska M. 2010. Występowanie *Phytophthora* spp. w wodzie i chorobotwórczość wybranych izolatów *P. citricola* dla roślin. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 554: 159–164.
- Ptaszek M. 2008. Occurrence and harmfulness of *Phytophthora citrophthora* to some *Saxifraga* species and cultivars in Poland. Phytopathol. Pol. 48: 25–30.
- Ptaszek M., Orlikowski L.B., Trzewik A., Orlikowska T., Lenc L. 2011. Chorobotwórczość izolatów *Phytophthora* spp. uzyskanych z cieków i zbiorników wodnych. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 6: 187–194.
- Themann K., Werres S. 1998. Verwendung von Rhododendronblättern zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Wurzeln- und Bodenproben. Nachrichtenblatt des Deutsch. Pflanzenschutzd. 50: 37–45.
- Trzewik A., Ptaszek M., Orlikowska T., Orlikowski L.B. 2010. Wykorzystanie techniki PCR w identyfikacji *Phytophthora* do gatunku. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 50 (2): 756–759.