



Phytophthora – patogeny drzew i krzewów. Detekcja i identyfikacja

Katarzyna Wiejacha¹, Grażyna Szkuta², Leszek B. Orlikowski¹,
Teresa Orlikowska¹

¹Institut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

²Centralne Laboratorium, Główny Inspektorat Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa, Toruń

Phytophthora – pathogens of trees and shrubs. Detection and identification

Summary

The paper summarizes information on the raising up menace of ornamental and forest nurseries by *Phytophthora* spp. caused mostly by *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. ramorum*. Some *Phytophthora* species are especially detrimental, but their identification is not possible on the basis of symptoms. To detect and identify pathogens in the plants (with- and without symptoms), soil and water, reliable tests are required. The survey on methods and techniques reported in the literature which can be used to establish such assays is given. The most needed are the tests based on DNA markers, especially when organized as micro-chips due to the large number of samples which can be screened in a short time.

Key words:

Phytophthora spp., morphological and molecular markers, pathogen detection and identification.

Adres do korespondencji

Katarzyna Wiejacha,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

1. Wstęp

Gatunki z rodzaju *Phytophthora*, ze względu na strzępkowaty charakter plechy oraz tworzenie bezpłciowych i płciowych zarodników uważane były do niedawna za grzyby. Jednak w najnowszych badaniach morfologicznych, biochemicznych i genetycznych dowiedziono, że są to organizmy grzybopodobne, spokrewnione z agami złotymi i brunatnymi. Rodzaj ten jest klasyfi-

kowane do różnych jednostek systematycznych. Kirk i wsp. (1) zaliczają go do królestwa *Chromista*, a Dick (2) oraz Sogin i Patterson (3) do królestwa *Stramenopiles*. O zmianie stanowiska taksonomicznego rodzaju *Phytophthora* zadecydowały m.in. składniki budujące ścianę komórkową (glukany i celuloza), substancje zapasowe (mykoloaminaryna i glukan) oraz fakt, że przez większą część cyklu życiowego są organizmami diploidalnymi, a grzyby haploidalnymi (4,5).

Organizmy te charakteryzuje wysoki stopień pasożytnictwa w stosunku do roślin żywicielskich, a niska zdolność do konkurencji z innymi mikroorganizmami glebowymi. Ta wyspecjalizowana zdolność do infekcji nadaje rodzajowi *Phytophthora* znaczenie ekonomiczne, jako niszczyielskiej grupie patogenów roślin (4,6,7). *Phytophthora* spp. nie są saprobiontami jak wiele innych glebowych patogenów. Przeżywają one w glebie na resztkach roślinnych w formie spoczynkowych chlamydospor i oospor, które w optymalnych warunkach wilgotności i temperatury kiełkują i tworzą zoosporangia. Z zoosporangiów uwalniają się zoospory, które infekują tylko zdrową tkankę roślinną lub świeże rany. *Phytophthora* spp. nie atakują tkanek wcześniej skolonizowanych przez inne mikroorganizmy i dlatego prawie nigdy nie są patogenami wtórnymi. Ich wykrycie w tkankach roślinnych wskazuje, z dużym prawdopodobieństwem, że są pierwotną przyczyną obserwowanych objawów choroby (6).

Liczba opisanych gatunków *Phytophthora* jest coraz większa. W 1996 r. Erwin i Ribeiro (4) informowali o 64 gatunkach. Obecnie, do grupy tych organizmów zaliczone zostały nowe, np. *P. ramorum*, *P. quercina*, *P. nemorosa*, *P. uliginosa* (20), a inne, jak *Phytophthora* z buka czy olszy czekają na swoje nazwy i opisy lub reklasyfikację taksonomiczną.

Patogeny te powodują zgniliznę korzenia, podstawy pnia, pędu, ale również plamistości liści, pąków i owoców. Często objawy chorobowe nie są specyficzne i mogą przypominać powodowane przez inne mikroorganizmy lub czynniki abiotyczne. Niektóre gatunki z tego rodzaju związane są z określoną rośliną żywicielską (np. *P. sojae* atakuje soję, *P. fragariae* var. *fragariae* – truskawkę, *P. quercina* – dęby), inne natomiast mają szeroki zakres roślin żywicielskich. Do gatunków o szerokim spektrum roślin żywicielskich należą m.in. *P. cryptogea*, *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. citrophthora* oraz *P. cinnamomi*. Ten ostatni, poraża ponad 1000 gatunków roślin (4). Różne gatunki mogą powodować podobne objawy chorobowe, np. *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citricola* i *P. citrophthora* powodują podobnie objawiające się zamieranie pędów różanecznika.

Gatunki *P. ramorum*, *P. lateralis*, z olszy i buka, *P. quercina* oraz *P. cinnamomi*, *P. citricola* i inne, są przyczyną poważnych chorób w szkółkach roślin ozdobnych, leśnych oraz lasach, nasadzeniach parkowych i plantacjach produkcyjnych drzewek choinkowych na całym świecie (8-10).

Wraz z intensyfikacją produkcji szkółkarskiej drzew i krzewów ozdobnych w Polsce, która w 2002 r. była w niektórych asortymentach 12-krotnie większa w porównaniu do roku 1989 (11), obserwuje się wzrost porażania upraw szkółkarskich przez *Phytophthora* spp. W naszym zespole z porażonych roślin iglastych wy-

izolowano dotychczas *P. cinnamomi* (z *Chamaecyparis lawsoniana*, *Pinus nigra*, *P. mugho*, *Abies alba*, *Taxus baccata*, *Microbiota decussata*, *Thuja occidentalis*), *P. citricola* (z *Chamaecyparis lawsoniana*, *Thuja occidentalis*, *Abies alba*) i *P. cryptogea* (z *Chamaecyparis lawsoniana*, *Pinus nigra*, *P. mugho*, *Abies alba*). Szczególnie podatne na porażenie przez *Phytophthora* są rośliny z rodziny wrzosowatych – *Andromeda polifolia*, *Calluna vulgaris*, *Daboecia cantabrica*, *Empetrum nigrum*, *Hebe inbricata*, *Kalmia angustifolia*, *Ledum palustre*, *Pieris japonica*, *Rhododendron catawbiense*, z których wyizolowano cztery gatunki patogenów: *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora* i *P. ramorum*. Ponadto, w Polsce *P. cinnamomi* stwierdzono na roślinach berberysu i irgi, *P. cactorum* na porzeczce, różaneczniku i lilaku, *P. nicotianae* na *Skimmia japonica*, a *P. cambivora* na *Acer pennsylvanicum* (12,13). Nasilenie występowania *Phytophthora* spp. jest związane przede wszystkim z przenoszeniem czynników infekcyjnych wraz z importowanym materiałem szkółkarskim, z wprowadzeniem w polskich szkółkach przemysłowych metod produkcji, a także ze stopniowym wzrostem średniej temperatury rocznej (14), która stwarza u nas dogodne warunki dla rozwoju patogenów pochodzących z cieplejszych rejonów klimatycznych.

Zwiększająca się liczba wykrywanych patogenicznych gatunków *Phytophthora* spp. w polskich szkółkach, rozszerzający się zakres roślin żywicielskich i rozprzestrzenianie się chorób przez nie wywoływanych, a także brak możliwości oparcia diagnostyki na objawach chorobowych, powodują konieczność zastosowania metod laboratoryjnych do szybkiej oceny zdrowotności materiału, pod kątem zasiedlenia przez gatunki *Phytophthora*. Przedmiotem pracy naszego zespołu jest określenie zróżnicowania genotypowego patogenów *Phytophthora* spp. występujących w polskich szkółkach i możliwości ich szybkiego wykrywania przy użyciu markerów molekularnych (15).

Praca ta jest przeglądem metod laboratoryjnych wykorzystywanych do identyfikacji patogenów z rodzaju *Phytophthora*.

2. Identyfikacja na podstawie cech morfologicznych

Podstawową i powszechnie stosowaną metodą rozróżniania gatunków *Phytophthora* jest klasyczna metoda identyfikacji, oparta na ocenie cech morfologicznych plechy. Do celów identyfikacyjnych gatunki z rodzaju *Phytophthora* podzielono na 6 głównych grup. Podstawą tego podziału (16) są następujące cechy: obecność zgrubienia szczytowego zoosporangiów i szerokość ujścia pory, zdolność do opadania zoosporangiów i długość trzonka oraz typ plemni, które mogą być parageniczne lub amfigeniczne lub też jednoczesna obecność obu typów u jednego gatunku. Zasady tego podziału zostały utrzymane w zmodyfikowanych i uzupełnionych kluczach do oznaczania gatunków (17,18) i monografii rodzaju *Phytophthora* (4).

Stosowane do dziś kryteria identyfikacji *Phytophthora*, opierające się na cechach obserwowanych w czasie wzrostu kultury na pożywkach można podzielić, wg Waterhouse

i wsp. (19), na wspólne dla głównych grup wydzielonych w obrębie rodzaju (obecność zgrubień szczytowych zoosporangium, zdolność do opadania zoosporangiów oraz typ anteridium), charakterystyczne na poziomie gatunku (m.in. szybkość wzrostu w różnym zakresie temperatur, obecność oogoniów na podłożach agarowych) i charakterystyczne tylko dla niektórych gatunków (wymiary zoosporangiów i stosunek ich długości do szerokości, wymiary oogoniów i morfologia ich ściany, obecność zgrubień strzępkowych w wodzie, chlamydospory, chorobotwórczość oraz wzór kolonii na podłożach agarowych) oraz ważne tylko dla jednego lub dwóch gatunków.

Identyfikację gatunków z rodzaju *Phytophthora* przeprowadza się również wykorzystując alternatywny klucz autorstwa Ho (20). Zgodnie z nim, gatunek *Phytophthora* można opisać na podstawie cech morfologicznych i fizjologicznych, obserwowanych w kulturach agarowych i wodnych lub bezpośrednio na porażonych roślinach żywicielskich.

Identyfikacja morfologiczna polega na określeniu i porównaniu charakterystycznych cech kultur *Phytophthora*, takich jak budowa strzępek plechy, zarodni pływkowych, plemni, lęgni i chlamydospor (5,21,22) na specyficznych podłożach agarowych (4,23). Dodatkowym kryterium mogą być: szybkość wzrostu w zależności od rodzaju pożywki, minimalna i maksymalna temperatura wzrostu, wrażliwość na niektóre związki chemiczne, zdolność do rozkładania skrobi i wytwarzania pigmentów oraz zdolność do kojarzenia z innymi szczepami i gatunkami w obrębie rodzaju, a także patogeniczność w stosunku do danej rośliny żywicielskiej (22,24,25).

Duża różnorodność i plastyczność cech morfologicznych, charakterystycznych zarówno w bezpłciowym jak i płciowym etapie rozwoju, są przyczyną trudności w określaniu przynależności taksonomicznej gatunków *Phytophthora*. Według Ho i Jong (26) głównym problemem w identyfikacji morfologicznej gatunków *Phytophthora* na podłożach są ograniczone możliwości ich różnicowania na podstawie małej liczby cech taksonomicznych, które dodatkowo mogą łatwo ulegać zmianom w warunkach hodowli na podłożach agarowych. Taksonomia oparta na morfologii dotyczy w dużym stopniu cech ilościowych, a kwalifikacja jest możliwa na podstawie różnic udowodnionych statystycznie (27). Z tego powodu, już w latach osiemdziesiątych dostrzeżono potrzebę używania do identyfikacji gatunków *Phytophthora* metod oceniających cechy biochemiczne i genetyczne.

3. Identyfikacja na podstawie markerów białkowych

3.1. Elektroforeza białek

Białka identyfikowanego izolatu można rozdzielać na żelach skrobiowych lub poliakryloamidowych (w warunkach nie- lub denaturujących) i po wybarwieniu porównywać z wzorami rozdziałów białek znanego patogena. Początki stosowania tej

metody do identyfikacji *Phytophthora* spp. datują się na lata sześćdziesiąte ubiegłego wieku, kiedy to porównywano wzory prążkowe białek rozpuszczalnych (cyt. 28). Elektroforeza białek pomogła w przyporządkowaniu taksonomicznym niektórych gatunków z rodzaju *Phytophthora*, wyizolowanych z porażonych roślin, np. *P. cinnamomi*, *P. palmivora*, *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. syringae*, *P. megasperma*, *P. drechsleri*, *P. citricola* (29-31). Metoda ta jest technicznie prosta i tania, choć czasochłonna, ponieważ wymaga uzyskania czystych kultur patogena, a klasyfikacja jest trudna z powodu złożoności wzorów elektroforetycznego rozdziału białek.

Ograniczenie analizy do obserwacji pojedynczych enzymów i ich izoform znacznie zmniejsza liczbę prążków w elektroforogramie i choć procedura jest nieco bardziej skomplikowana, to ten sposób identyfikacji gatunków jest łatwiejszy i częściej używany w praktyce, także obecnie. Izoenzymy są to różne formy tego samego enzymu, kodowane przez różne allele genu. Katalizują one tę samą reakcję, ale różnią się powinowactwem do substratu i szybkością reakcji (32-35). Drobne różnice w sekwencji aminokwasów mogą spowodować zróżnicowanie ruchliwości elektroforetycznej i zmianę punktu izoelektrycznego.

Elektroforezę przeprowadza się w warunkach nie denaturujących, a wynik uzyskuje się po barwieniu pozytywnym żelu polegającym na uzyskaniu barwnej reakcji katalizowanej przez badany enzym. Do tego celu wykorzystuje się barwniki tetrazolowe, których formy utlenione są rozpuszczalne i względnie bezbarwne, a formy zredukowane są nierozpuszczalne i barwne. Zdolność tych barwników do redukcji w wyniku reakcji chemicznej, specyficznej dla badanego enzymu, jest wykorzystywana do wizualizacji prążków zymogramu. Do tego celu wykonuje się również tzw. barwienie negatywne z użyciem fluorochromów.

Enzymami najczęściej stosowanymi do identyfikacji *Phytophthora* spp. są oksydoreduktazy (m.in. dehydrogenaza izocytrynianowa, mleczanowa, jabłczanowa, jabłczanowa dekarboksylująca), transferazy (heksokinaza), izomerazy (izomeraza glukozofosforanowa) oraz inne (32,34-36).

Na podstawie analizy izozymów skorygowano taksonomię opracowaną na podstawie cech morfologicznych dla 12 gatunków *Phytophthora* – *P. botryosa*, *P. hevae*, *P. katsware*, *P. meadii*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megakarya*, *P. mexicana*, *P. boehmeriae* i *P. arecae* i wyodrębnienie charakterystycznych typów elektroforetycznych w obrębie gatunków (36). W badaniach izozymów przeprowadzonych przez Mills i wsp. (37) wskazano, że *P. cryptogea* i *P. drechsleri* stanowią kompleks gatunków, w którym można wyróżnić 10 grup genetycznych. Dokonując interpretacji genetycznej zymogramów *P. cinnamomi*, *P. cactorum* i *P. cambivora* wykazano, że należą one do różnych grup genetycznych i morfologicznych (36). Metoda ta przyczyniła się do wyodrębnienia nowego gatunku – *P. brassicae* sp. nov., spośród izolatów zaliczanych dotychczas do gatunku *P. porri* (38).

Analiza izozymów pozwala nie tylko na identyfikację gatunków *Phytophthora*, ale również jest źródłem cennych informacji o zróżnicowaniu wewnątrzgatunkowym i międzygatunkowym, co jest podstawą oceny czy badany gatunek jest homozygotą,

heterozygotą, czy mieszańcem międzygatunkowym. Man in't Veld i wsp. (35) analizę izozymów wykorzystali do badań nad mieszańcowością izolatu *P. cactorum* x *P. nicotianae* oraz do identyfikacji nowych gatunków *Phytophthora* z olszy i *P. ramorum* (39,40). Wyniki analizy izozymów stały się podstawą rewizji klucza do oznaczania gatunku *P. nicotianae* (23).

3.2. Metody serologiczne

Detekcję *Phytophthora* spp. za pomocą metody serologicznej przedstawił po raz pierwszy Burrell i wsp. (1966), cyt. (4). Dotychczas opracowano kilka metod serologicznej detekcji patogenów roślinnych z rodzaju *Phytophthora*. Najczęściej używane są testy immunoenzymatyczne oparte na technice ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), które pozwalają na detekcję antygenów rodzaju *Phytophthora* oraz poszczególnych gatunków zarówno w porażonych roślinach, jak i w glebie. Technika ELISA opiera się na interakcji wysoce specyficznych przeciwciał z antygenami (białkami, polisacharydami lub kwasami nukleinowymi), charakterystycznymi dla ściśle określonej grupy organizmów z danego rodzaju, bądź też mogących występować wyłącznie u danego gatunku. Po połączeniu antygeny z przeciwciałem (najczęściej immobilizowanym na ściankach studzienek mikropłytek) dodaje się inne przeciwciało, swoiste dla innego miejsca na antygenie przyłączonym do enzymu, powodującego reakcję barwną lub zwiększającego fluorescencję substratu. Ilość przeciwciała wiążącego się z podłożem i drugiego przeciwciała jest zależna od wyjściowej ilości antygeny w próbce. Tak skonstruowany test pozwala na wykrycie nawet niewielkich ilości antygeny (w przypadku białka mniej niż jeden nanogram). Za pomocą zestawów firmy Agri-Diagnostic Associates, Neogen, Agdia oraz Adgen wykrywano, m.in. obecność *P. cinnamomi* w roślinach azalii (41) oraz w glebie (42), gatunku *P. cryptogea* w tkankach szalwii (43), rodzaju *Phytophthora* w roślinach cyprysika, ostrokrzewu, fiołka, iberysa, sosny, hibiskusa, traw oraz maliny (43). Testy ELISA są również przydatne do kontroli rozprzestrzeniania się gatunków *Phytophthora* w glebie (44). Istnieje wiele odmian testów immunoenzymatycznych, które mogą się różnić specyficznością wiązania z przeciwciałem. Dla przykładu, Indirect DAS ELISA oraz membranowy test immunoenzymatyczny były wykorzystane do wykrywania *P. fragariae* – var. *rubi* oraz var. *fragariae* (45).

4. Identyfikacja na podstawie markerów DNA

Podobnie, jak analiza elektroforetyczna białek nie daje szczegółowych informacji o cechach uwarunkowanych genetycznie, tak i wyniki uzyskane przy wykorzystaniu technologii DNA, określając tylko podobieństwa i różnice w budowie DNA, na ogół nie dostarczają informacji o kodowaniu specyficznych cech fenotypowych.

W tym jednak przypadku, analiza opiera się na substancji najbardziej konserwatywnej, obecnej w każdej komórce i o stałej budowie, niezależnie od stadium rozwoju czy warunków wzrostu organizmu. Przedmiotem analizy może być całkowity, genomowy DNA lub jego frakcje, np. mitochondrialny DNA (mtDNA) albo DNA kodujący rybosomalny RNA (rDNA).

Najstarszą techniką generowania markerów DNA jest analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Polega ona na rozdziale elektroforetycznym genomowego DNA pociętego za pomocą wybranych enzymów restrykcyjnych. Porównanie obrazów elektroforetycznych różnych genomów trawionych tym samym enzymem, może wykazać różnice zarówno w ilości jak i długości fragmentów DNA, co związane jest ze zróżnicowaną lokalizacją sekwencji nukleotydów rozpoznawanych przez restryktazę (46). Do identyfikacji organizmów eukariotycznych o dużych genomach, najczęściej wybiera się frakcje DNA, np. DNA mitochondrialny (mtDNA) (48). Utrudnieniem w tej metodzie jest konieczność izolowania DNA z dużej próby i jego frakcjonowanie przez wirowanie w gradiencie CsCl. Detekcja w małych próbach prowadzona jest zazwyczaj na DNA całkowitym, a trawienie enzymami restrykcyjnymi prowadzi wówczas do powstania dużej liczby trudnych do identyfikacji prążków. Dla ułatwienia wydobycia zróżnicowania DNA, przeprowadza się hybrydyzację trawionego DNA genomowego z wyznakowaną radioaktywnie lub fluorescencyjnie sondą (technika *Southern Blotting*). Sondy są sporządzane z różnych frakcji DNA – nie zawsze specyficznych dla badanego genotypu, ale najczęściej są to sklonowane frakcje DNA patogena.

Markery uzyskane przy zastosowaniu techniki RFLP do mtDNA wykorzystano do uściślenia taksonomii *P. cryptogea*, *P. drechsleri* i *P. megasperma*. Pozwoliły one na scharakteryzowanie podobnych do siebie morfologicznie form specjalnych *P. megasperma* f. sp. *glycinea* i *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* (49), oraz gatunków *P. parasitica*, *P. cactorum*, *P. fragariae*, *P. erythroseptica* (37,50,51). Metodę hybrydyzacji DNA zastosowano do badania genetycznego zróżnicowania form *Phytophthora* spp. wyspecjalizowanych w pasożytowaniu na różnych gatunkach roślin (np. *P. megasperma* izolowana z soi, lucerny oraz drzew owocowych) (47,51), stwierdzając polimorfizm wysokopowtarzalnego DNA mitochondrialnego i jądrowego, wyodrębnilo kilka spokrewnionych podgrup (52). Technika hybrydyzacji DNA posłużyła do badania genetycznych różnic w izolatach *P. citrophthora* i do opracowania specyficznych sond, które umożliwiały detekcję patogenów w korzeniach roślin cytrusowych (53). Modyfikacja metody hybrydyzacyjnej pozwala na prowadzenie hybrydyzacji gatunkowo-specyficznych sond do DNA patogena występującego w materiale roślinnym. Ten sposób zastosowano do identyfikacji *P. parasitica* (53) oraz *P. cinnamomi* (54,55).

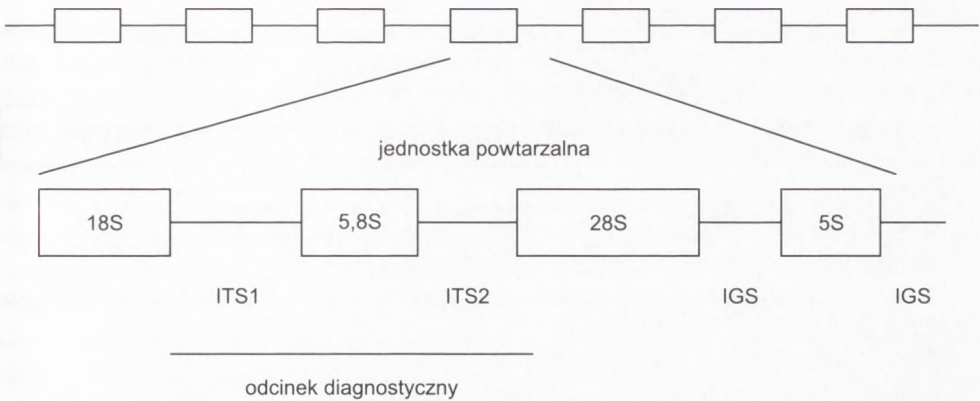
Technika powielania fragmentów DNA – reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) pozwoliła na opracowanie szybkich metod diagnostycznych nie wymagających dużych ilości materiału do analiz (56). Najłatwiejszą wersją metod diagnostycznych opartych na technice powielania, które nie wymagają znajomości specyficznych dla genotypu sekwencji DNA, jest zastosowanie niespecyficz-

nych starterów, np. typu RAPD lub ISSR, za pomocą których można namnażać fragmenty DNA o różnej długości i wśród nich poszukiwać fragmentów różnicujących badane genotypy. Określenie przynależności grupowej może odbywać się na podstawie oszacowania współczynnika podobieństwa, dającego obraz całkowitego polimorfizmu otrzymanego z reakcji powielania z kilkoma/kilkunastoma starterami lub na podstawie identyfikacji pojedynczych produktów, specyficznych dla określonego genotypu, co jest bardziej wiarygodne i łatwiejsze (57).

Bardziej precyzyjną i wiarygodną metodą jest zastosowanie starterów, za pomocą których można namnożyć fragment DNA specyficzny dla określonego gatunku lub formy specjalnej. Specyficzne startery można opracować na podstawie polimorficznych produktów uzyskanych techniką RAPD, ISSR, AFLP i in. lub ze znanych sekwencji genów wykazujących gatunkowospecyficzny polimorfizm. Startery namnażające powtarzalne, tandemowe fragmenty satelitarnego DNA *P. infestans* posłużyły do wykrywania tego patogena w liściach i bulwach ziemniaka (58). Specyficzne startery otrzymane z bibliotek genomowego DNA *P. infestans* i *P. citrophthora* były skuteczne w wykrywaniu tych patogenów w tkankach zainfekowanych roślin pomidora (59).

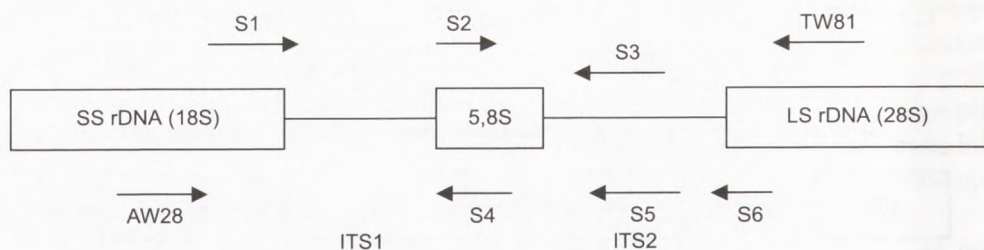
Dla zwiększenia czułości testów PCR, wykrywających obecność patogena w przypadkach słabego porażenia lub w fazie bezobjawowej, co ma duże znaczenie dla detekcji patogenów kwarantannowych, można stosować metodę tzw. wewnętrznego (gniazdowego – *nested*) PCR, gdzie w dwóch kolejnych reakcjach amplifikacji stosuje się kolejno dwie pary starterów. W pierwszej reakcji uczestniczą startery zewnętrzne, obejmujące dłuższy fragment DNA, charakterystyczny dla spokrewnionej grupy organizmów, a w drugiej, gdzie matrycą jest produkt reakcji pierwszej, startery wewnętrzne, specyficzne, np. dla gatunku. Taką technikę zastosowano do wykrywania *P. fragariae* w korzeniach truskawek. O czułości metody świadczy fakt, że pozwalała ona na wykrycie patogena w próbce zawierającej zaledwie 20 zoospor (60).

Bardzo ważną rolę w identyfikacji *Phytophthora* ssp. odgrywa analiza genotypowa z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na bazie sekwencji wewnętrznych przerywników transkrybowanych (ITS – *Internal Transcribed Spacer*) w rDNA. Sekwencje rDNA są ułożone tandemowo, tworząc rodziny genów, zawierające regiony genowe i przerywniki. Każde powtórzenie zawiera kopię genu 18S, 5,8S i 28S oraz dwa przerywniki transkrybowane – ITSy i przerywnik międzygenowy – IGS (rys. 1). Liczba powtórzeń tandemowych oraz liczba subpowtórzeń wewnątrz IGS jest zróżnicowana (61,62). Sekwencje kodujące podjednostki są wysoce konserwatywne, natomiast przerywniki, które stanowią tę część pierwotnego transkryptu rRNA, która zostaje odrzucona w czasie tworzenia dojrzałych, funkcjonalnych części rybosomowego RNA, charakteryzują się wysoką zmiennością. Geny kodujące rRNA ewoluują relatywnie wolno i są przydatne do odróżniania organizmów spokrewnionych w niewielkim tylko stopniu, natomiast fragmenty pomiędzy genami, nie pełniące funkcji kodującej, gromadzą mutacje, co w konsekwencji prowadzi do



Rys. 1. Schemat organizacji tandemowo powtarzanych genów RNA występujących w rDNA *Phytophthora* spp.

dużego zróżnicowania pomiędzy gatunkami i populacjami. Ta właściwość podjednostek rDNA stanowi, że są one modelowymi elementami genotypu do poszukiwania sekwencji markerowych na różnych poziomach taksonomicznych (63-65). W wyniku badań sekwencji przerywników u gatunków rodzaju *Phytophthora*, stwierdzono, że region ITS II jest mniej zróżnicowany niż ITS I, przy czym różnice te mogą być zarówno wynikiem zamiany pojedynczych par zasad, jak i wielokrotnymi insercjami i delecjami. Większość zmian jest wspólna dla kilku gatunków, lecz istnieją też unikatowe zamiany nukleotydów, charakterystyczne dla pojedynczych gatunków. Tylko jeden fragment ITS I wykazywał pełną homologię u wszystkich przebadanych gatunków *Phytophthora*, podczas gdy bardziej konserwatywny region ITS II składał się z wielu fragmentów homologicznych (66). Powtarzalne odcinki rDNA wielu gatunków *Phytophthora* zostały zsekwencjonowane (66) i na tej podstawie zostały zaprojektowane startery powielające dużą część fragmentu powtarzalnego oraz odcinki wybrane jako unikatowe dla większej liczby gatunków lub nawet jednego gatunku (rys. 2) (58,67,68). Alternatywą jest amplifikacja fragmentów typowych dla kilku gatunków i wydobywanie zróżnicowania międzygatunkowego na podstawie analizy restrykcyjnej (65,67,69). Obecnie można przeprowadzić identyfikację ponad 40 gatunków *Phytophthora* z wykorzystaniem trawienia restrykcyjnego powielonych fragmentów ITS (65). Tylko nieliczne gatunki nie mogą być oznaczane metodą PCR + RFLP, np. nie można odróżnić gatunków *P. infestans*, *P. mirabilis* i *P. phaseoli*, a także *P. ramorum* od *P. lateralis*. Sekwencjonowanie powielonych fragmentów dla celów diagnostycznych jest zbyt kosztowne, choć w niektórych przypadkach jest stosowane jako analiza uzupełniająca. W przypadku gdy detekcję wykonuje się w materiale roślinnym, glebie lub wodzie, gdzie ilość DNA patogena jest niewielka, pomocna może być metoda gniazdowego PCR, chociaż wzrasta wówczas niebezpieczeństwo skażenia i fałszywie pozytywnego odczytu (60,70). Identyfikację



Rys. 2. Schemat powtarzalnej jednostki rDNA wraz z przykładowym umiejscowieniem starterów stosowanych do amplifikacji regionów ITS.

gatunkową można przeprowadzać także przy zastosowaniu hybrydyzacji wyizolowanego DNA do sondy sporządzonej na podstawie specyficznej sekwencji fragmentu ITS, wyznakowanej radioaktywnie, za pomocą której wykrywano *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora* i *P. megakarya* (27) lub wyznakowanej czynnikami luminescencyjnymi, np. digoksygeniną, która umożliwiała detekcję kilku gatunków *Pythium* i *Phytophthora* (71). Wówczas gdy pokrewieństwo pomiędzy gatunkami jest bliskie, jak np. pomiędzy *P. ramorum* i *P. lateralis* i brak różnic diagnostycznych w rDNA, poszukuje się ich w innych genach, np. beta-tubuliny (72).

Zwiększenie możliwości detekcji *Phytophthora* ssp. jest pochodną coraz lepszego poznania genotypów oraz rozwojem technik analitycznych. Obok technik RAPD, RFLP, AFLP, PCR + RFLP są stosowane takie, jak polimorfizm konformacji jednoniciowego DNA (SSCP – *Single-Strand Conformation Polymorphism*) oraz allelo-specyficzna reakcja łańcuchowa polimerazy (AS-PCR – *Allele-Specific Polymerase Chain Reaction*) (71) lub reakcja łańcuchowa ligazy (LCR – *Ligase Chain Reaction*) (72). Wszystkie proponowane metody masowego testowania dla celów identyfikacji lub diagnostyki powinny być szybkie, powtarzalne, wykrywające patogeny w tkankach roślinnych, glebie i wodzie, możliwie mało zależne od personalnych umiejętności wykonującego test oraz tanie.

Proces oczyszczania kultur po izolacji i ocena morfologiczna wymagają co najmniej 10-14 dni, co nie jest do zaakceptowania dla służb fitosanitarnych dokonujących kontroli materiału w obrocie międzynarodowym. Analiza DNA wyizolowanego z czystych kultur jest znacznie łatwiejsza niż analiza prób pobranych z materiału roślinnego, gleby lub wody. Wówczas może być konieczne równoległe stosowanie dwóch lub trzech metod detekcji. Często śledzi się równoczesne występowanie kilku gatunków patogenów, co jest znacznie trudniejsze. Idealem jest opracowanie testów, które w jednej reakcji z kilkoma parami starterów mogą wykrywać kilka patogenów, np. multiplex-PCR, który zastosowano do równoczesnej identyfikacji *P. lateralis*, *P. cinnamomi* i *P. gonapodyides* (68,73).

Taką możliwość daje technika mikro-chipów (*bio-chips* lub *micro-arrays*). Pozwala ona na równoległą w czasie identyfikację wielu prób i patogenów, ponieważ na po-

wierzchni kilku-kilkudziesięciu mm² stałego podłoża (szkło, silikon, plastik) można osadzić do kilkuset tysięcy oligonukleotydowych sond o długości od 10 do 100 nukleotydów, do których hybryduje wyznakowane fluorescencyjnie DNA. Ponieważ każda sonda ma swoją pozycję na chipie, odczytanie sygnału w danym punkcie pozwala na określenie, do jakiej sekwencji przyłączyło się badane DNA. Strategię detekcji 30 gatunków *Phytophthora* przy użyciu systemu PamChipTM przedstawili Schoen i wsp. (74).

Innym zagadnieniem związanym z detekcją patogenów jest uzyskanie informacji o tym, czy w badanym środowisku uprawowym znajdują się żywe czy martwe mikroorganizmy. Taką informację można uzyskać analizując RNA, np. przy użyciu metody RT-PCR ze specyficznymi starterami (75). Analiza ta, bardziej skomplikowana ze względu na izolację i obróbkę RNA, w wielu przypadkach jako jedyna daje odpowiedź na pytanie o skuteczne zwalczanie.

W badaniach populacyjnych i epidemiologicznych ważna jest informacja o ilości propagul w badanej próbie. W tym przypadku wskazane jest stosowanie techniki PCR podającej ilość produktu w czasie kolejnych cykli reakcji. Taką metodę, w połączeniu z multiplex PCR zastosowano do wykrywania *P. ramorum* i *P. lateralis* oraz *P. ilicis-like* (76).

5. Podsumowanie

Kilka gatunków z rodzaju *Phytophthora* – *P. cinnamomi*, *P. ramorum*, *P. cryptogea*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae*, a także kilka innych, dotychczas nie zidentyfikowanych, izolowanych coraz powszechniej z olszy, jesionu i buka, to patogeny zagrażające szkółkom drzew i krzewów oraz nasadzeniom leśnym, ogrodowym i parkowym. Gatunki z rodzaju *Phytophthora* wykształciły wyjątkowe zdolności do rozprzestrzeniania się za pośrednictwem szybko powstających zoospor i przeżywania oospor. Uważa się, że są one odpowiedzialne za większość chorób szyjki korzeniowej drzew. W nasadzeniach trwałe objawy choroby pojawiają się po długim czasie od zainfekowania korzeni, najczęściej po wystąpieniu niesprzyjających warunków pogodowych, np. suszy, gdy patogen się rozprzestrzenił i nie ma możliwości wyleczenia drzewa. Gospodarcze znaczenie *Phytophthora* spp. wzrasta z powodu intensyfikacji handlu międzynarodowego, przemysłowych metod produkcji szkółkarskiej (77) oraz sprzyjających warunków klimatycznych (14). Wymienione gatunki *Phytophthora* mogą porażać różne gatunki roślin, wywołując podobne objawy, ale szkodliwość tych porażek jest różna. Kilka gatunków patogena może porażać tę samą roślinę i wówczas może dojść do wytworzenia form mieszańcowych o nowych cechach (78). Wiedza na temat przynależności gatunkowej sprawcy jest ważna dla przyjęcia odpowiedniej strategii prewencji i zwalczania, szczególnie metodami ochrony biologicznej. Ważna jest także kontrola materiału w imporcie i eksporcie. *Phytophthora cinnamomi*, a także *P. ramorum* są w wielu krajach uznane za patogeny

kwarantannowe, podlegające obowiązkowi zwalczania i zerowej tolerancji obecności w materiale nasadzeniowym.

Chociaż metod identyfikacji jest wiele, to liczą się jedynie te, które są szybkie, wiarygodne i możliwe do automatyzacji, co spełnia kryterium masowości oraz obniża koszty. Obecnie, z całą pewnością są to metody oparte na markerach DNA, które służą do opracowania różnymi technikami kluczy molekularnych do oznaczania gatunków *Phytophthora*. Dla skonstruowania takich markerów potrzebna jest szczegółowa wiedza o sekwencji fragmentów DNA, które są szczególnie przydatne w diagnostyce, np. rDNA. Zaletą rDNA jest duża liczba kopii w komórce, co zwiększa szansę wykrywania w małych próbach oraz w przypadku porażenia bezobjawowego. Niezależnie od upowszechniania się w praktyce testów opartych na technikach gniazdowego PCR i PCR + RFLP, trwają prace nad dalszą optymalizacją testów, uwzględniających liczebność propagul patogena w próbce oraz obecność żywych propagul. Obecnie dąży się do sporządzenia praktycznych testów opartych na technice hybrydyzacji na *mikro-chipach*. Fitopatolodzy przestrzegają, że wiedza na temat identyfikacji i detekcji organizmu w środowisku naturalnym i uprawowym nie może być oderwana od patogeny. Sugeruje to konieczność ścisłej współpracy pomiędzy genetykami, biotechnologami i fitopatologami.

Literatura

1. Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., Stalpers J. A., (2001), *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed., CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
2. Dick M. W., (1997), *Mycol. Res.*, 101, 385-394.
3. Sogin M. L., Patterson D. J., (2001), *Stramenopiles. The Tree of Live Web Project*, 9th ed. R. Maddison, <http://tolweb.org/tree?group=Stramenopiles&contgroup=Eukaryotes>
4. Erwin D. C., Ribeiro O. K., (1996), *Phytophthora Disease Worldwide*, APS PRESS, St. PAul, MN, USA.
5. Szkuta G., Orlikowski L. B., (2002), *Prace IBL, Ser. A, 2*, 138-144.
6. Tsao P. H., (1990), *Bulletin OEPP/EPPPO*, 20, 11-17.
7. Ristaino J. B., Gumpertz M. L., (2000), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 38, 541-546.
8. Hansen E., (2002), *Sudden Oak Death Online Symposium*, <http://sod.apsnet.org/Papers/Hansen/default.htm>.
9. Moralejo E., Descals E., (2003), *Sudden Oak Death Online Symposium*, <http://sod.apsnet.org/Papers/>.
10. Werres S., (2002), *Sudden Oak Death Online Symposium*, <http://sod.apsnet.org/Papers/>.
11. Marosz A., (2002) *Ogrodnictwo*, 1, 21-23.
12. Orlikowski L. B., Szkuta G., (2002a), *Prace IBL, ser. A, 2*, 134-137.
13. Orlikowski L. B., Jaworska-Marosz A., Szkuta G., (2002), *Phytopathol. Pol.*, 24, 17-26.
14. Brasier C., (2003), *Sudden Oak Death Online Symposium*. <http://sod.apsnet.org/Papers/Brasier/default.htm>.
15. Wiejacha K., Szkuta G., Orlikowska T., (2002), *Bull. Polish Acad. Sci.*, 50, 165-171.
16. Waterhouse G. M., (1963), *Mycol. Pap.* 92, *Commonw. Mycol. Inst.*, Kew, Surrey, UK.
17. Newhook F. J., Waterhouse G. M., Stamps D. J., (1978), *Mycol. Pap.*, 143, *Commonw. Mycol. Inst.* Kew, Surrey, UK.
18. Stamps D. J., Waterhouse G. M., Newhook F. J., Hall G. S., (1990), *Mycol. Pap.*, 162, *Commonw. Agric. Bur. Int.*

19. Waterhouse G. M., Newhook F. J. I., Stamps J. D., (1983), in: *Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*, APS Press, St. Paul, MN, USA, 139-147.
20. Ho H. H., (1981), *Mycologia*, 73, 705-714.
21. Ribeiro O. K., (1978), *A Source Book of the Genus Phytophthora*, Ed. Cramer J., Hirschberg, Germany.
22. Wilcox W. F., (1989), *Phytopathology*, 79, 93-101.
23. Hall G., (1993), *Mycol. Res.*, 97, 559-574.
24. Luo L., Ho H. H., Jong S. C., (1988), *Mycotaxon*, 32, 199-217.
25. Shew H. D., Benson D. M., (1982), *Phytopathology*, 72, 1029-1032.
26. Ho H. H., Jong S. C., (1987), *Mycotaxon*, XXIX, 207-232.
27. Lee S. B., White T. J., Taylor J. W., (1993), *Phytopathology*, 83, 177-181.
28. Brasier C. M., (1991), in: *Phytophthora Symposium of the British Mycological Society, the British Society for Plant Pathology, the Society of Irish Plant Pathologists*, Dublin 1989, 104-128.
29. Clare B. G., Zentmyer G. A., (1966), *Phytopathology*, 56, 1334-1335.
30. Hall R., Zentmyer G. A., Erwin D. C., (1969), *Phytopathology*, 59, 770-774.
31. Bielenin A., Jeffers S. N., Wilcox W. F., Jones A. L., (1988), *Phytopathology*, 78, 1402-1408.
32. Micales J. A., Bonde M. R., Peterson G. L., (1986), *Mycotaxon*, XXVII, 405-449.
33. Bonde M. R., Micales J. A., Peterson G. L., (1993), *Plant Dis.*, 77, 961-968.
34. Man in't Veld W. A., (1995), *Diagnostic Centre of Plant Protection Service*, Wageningen, the Netherlands Annual Report, 90-97.
35. Man in't Veld W. A., Veenbaas-Rijks W. J., Ilieva E., de Cock A. W. A. M., Bonants P. J., Pieters R., (1998), *Phytopathology*, 88, 922-929.
36. Oudemans P., Coffey M. D., (1991), *Mycol. Res.*, 95, 1025-1046.
37. Mills S. D., Förster H., Coffey M. D., (1991), *Mycol. Res.*, 95, 31-48.
38. Man in't Veld W. A., de Cock A. W. A. M., Ilieva E., Levesque C. A., (2002), *Eur. J. Plant Pathol.*, 108, 51-62.
39. Gruyter de H., Man in't Veld W. A., (2000), *Plant Protection Service Annual Report 2000*, Wageningen, the Netherlands.
40. Werres S., Martwitz R., Man in't Veld W. A., de Cock A. W. A. M., Bonants P. J. M., de Weerd M., Themann K., Ilieva E., Baayen R. P., (2001), *Mycol. Res.*, 105, 1155-1165.
41. Benson D. M., (1991), *Plant Dis.*, 75, 478-482.
42. Cahill D. M., Hardham A. R., (1994), *Phytopathology*, 84, 1284-1292.
43. McDonald J. D., Stites J., Kabashima J., (1990), *Plant Dis.*, 74, 655-659.
44. Miller S. A., Madden L. V., Schmitthenner A. F., (1997), *Phytopathology*, 87, 101-107.
45. Burns R., George E., (1995), *Bull. OEPP/EPPO*, 25, 31-37.
46. Panabières F., Marais A., Trentin F., Bonnet P., Ricci P., (1989), *Mol. Plan Biol.*, 79, 1105-1109.
47. Förster H., Kinscherf T. G., Leong S. A., Maxwell D. P., (1989), *Can. J. Bot.*, 67, 529-537.
48. Carter D. A., Archer S. A., Buck, Shaw D. S., Shattock R. C., (1990), *Mycol. Res.*, 94, 1123-1128.
49. Förster H., Kinscherf T. G., Leong S. A., Maxwell D. P., (1987), *Curr. Genet.*, 12, 215-218.
50. Förster H., Kinscherf T. G., (1988), *Mycologia*, 80, 466-478.
51. Förster H., Coffey M. D., (1993), *Mycol. Res.*, 97, 1101-1112.
52. Förster H., Oudemans P., Coffey M. D., (1990), *Exp. Mycol.*, 14, 18-31.
53. Goodwin P. H., Kirkpatrick B. C., Duniway J. M., (1990), *Appl. Environ. Microb.*, 56, 669-674.
54. Goodwin P. H., Kirkpatrick B. C., Duniway J. M., (1989), *Phytopathology*, 79, 716-721.
55. Judelson H. S., Messenger-Routh B., (1996), *Phytopathology*, 86, 763-768.
56. Henson J. M., French R., (1993), *Ann. Rev. Phytopathol.*, 31, 81-109.
57. Chang T. T., Yang W. W., Wang W. Y., (1996), *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 37, 165-171.
58. Niepold F., Schöber-Butin B., (1995), *Microbiol. Res.*, 150, 379.
59. Érsek T., Schoelz J.E., English J.T., (1994), *Appl. Environ. Microb.*, 60, 2616-2621.
60. Bonnants P. J. M., Hagenaar-de Weerd M., van Gentpelzer M. P. E., Lacourt I., Cooke D. E. L., Dunstan J. M., (1997), in: *Diagnosis and identification of plant pathogens*, Ed. Dehne H. W., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 43-45.
61. O'Donell K., (1992), *Curr. Genet.*, 22, 213-220.

62. Lee S. B., Taylor J. W., (1992), *Mol. Biol. Evol.*, 9, 636-653.
63. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., (1990), in: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Eds. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., Academic Press, San Diego, USA, 315-322.
64. Crawford A. R., Bassam B. J., Drenth A., Maylean D. J., Irwin J. A., (1996), *Mycol. Res.*, 100, 437-443.
65. Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Wagels G., Brasier C. M., (2000), *Fungal Genet. Biol.*, 30, 17-32.
66. Cooke D. E. L., Duncan J. M., (1997), *Mycol. Res.*, 101, 667-677.
67. Ristaino J. B., Madritch M., Trout C. L., Parra G., (1998), *Appl. Env. Microbiol.*, 64, 948-954.
68. Winton L. M., Hansen E. M., (2001), *For. Path.*, 31, 275-283.
69. Drenth A., Irwin J. A. G., (2001), *A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation*, RIRDC Publication No 01/36, RIRDC Project No UQ-68A.
70. Stammler G., Seemüller E., (1993), *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 100, 394-400.
71. Lévesque A., Harlton C. E., de Cock A. W. A. M., (1998), *Phytopathology*, 88, 213-222.
72. Bilodeau G., Levesque C. A., de Cock A. W. A. M., Kristjansson G., McDonald J., Hamelin R. C., (2003), *Sudden Oak Death Science Symposium (15-18 Dec. 2002)*, Monterey, USA
<http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymp/poster/poster56.html>.
73. Tooley P. W., Hatziloukas E., Scott D. L., Carras M. M., (2002), *Can. J. Plant Pathol.*, 24, 294-301.
74. Shoen C., van Beuningen, de Weerd M., Hilhorst R., Chan A., Boender P., Bonants P., (2002), *COST Action 853 Meeting*, <http://www.cost853.ch/PresentationsWaedi02.htm>.
75. Scott D. L., Deahl K. L., (1998), *Agric. Res. Service*, <http://www.nalusda.gov/ttic/tektran/data000008/56/0000085634.html>.
76. Ivors K., Garbelotto M., (2002), *Sudden Oak Death Science Symposium*, Monterey, Dec. 15-18
<http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymp/poster/poster10.html>.
77. Szkuta G., Orlikowski L. B., Jamart G., (2001), *Materiały V Konf. Sekcji Chorób Roślin Drzewiastych PTFIT*, Poznań-Błazejewko 29 maja-1 czerwca 2001, 25-31.
78. Brasier C. M., Cooke D. E. L., Duncan J. M., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5878-5883.