

First report on *Phytophthora* spp. and *Pythium litorale* occurrence in Beskid's rivers (of the Ukrainian Carpathians)

Pierwsze doniesienie o występowaniu *Phytophthora* spp. i *Pythium litorale* w rzekach Beskidu Ukraińskich Karpat

Iryna Matsiakh¹, Volodymyr Kramarets¹, Leszek B. Orlikowski², Aleksandra Trzewik²

Summary

Occurrence of *Phytophthora* species in the rivers Stryj and Yasenytsya and in the lake situated in the National Park of „Skoliwski Beskidy” in Ukraina was studied. Detection of the pathogen was carried out in October and November in 2011. Baiting technique with rhododendron leaf baits cultivar Nova Zembla was used for microorganisms isolation from water. Species were identified on the basis of their morphological features and using molecular methods. Studies showed the occurrence of the species *Phytophthora gonapodyides*, *P. lacustris* and *Pythium litorale* in analyzed water sources. In the laboratory conditions the pathogenicity of obtained isolates to rhododendron was determined. This has been the first report of *Phytophthora* species in water sources in the Ukraine.

Key words: *Phytophthora* species, water sources, baiting technique, detection, identification, pathogenicity

Streszczenie

Badano występowanie *Phytophthora* spp. w rzekach Stryj i Yasenytsya oraz jeziorze zlokalizowanym w Parku Narodowym „Skoliwski Beskidy” na Ukrainie. Detekcja miała miejsce na przełomie października i listopada 2011 roku. Do izolacji mikroorganizmów z wody zastosowano liście pułapkowe różanecznika odmiana Nova Zembla. Identyfikację wykrytych gatunków przeprowadzono na podstawie ich cech morfologicznych i przy użyciu metod molekularnych. Badania wykazały występowanie: *Phytophthora gonapodyides*, *P. lacustris* oraz *Pythium litorale* w analizowanych źródłach wody. W warunkach laboratoryjnych określono patogeniczność otrzymanych izolatów względem różanecznika. Jest to pierwsze doniesienie o występowaniu gatunków *Phytophthora* w rzekach i zbiorniku wodnym na Ukrainie.

Słowa kluczowe: *Phytophthora*, źródła wody, detekcja, identyfikacja, patogeniczność

¹ National Forestry University of Ukraine
O. Kobulaynska st. 1, 79005 Lviv
iramatsah@ukr.net

² Instytut Ogrodnictwa
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Wstęp / Introduction

Badania nad występowaniem gatunków *Phytophthora* spp. w środowisku wodnym prowadzono od lat 20. XX wieku (Bewley i Buddin 1921; Themann i wsp. 2002; Hong i Moorman 2005). Począwszy od lat 90. w różnych źródłach wody wykryto ponad 20 gatunków *Phytophthora*, a obok nich także przedstawicieli rodzajów: *Pythium*, *Fusarium* i *Rhizoctonia* (Themann i wsp. 2002; Hong i Moorman 2005). Na istotną rolę wody w rozprzestrzenianiu się *Phytophthora* spp. w szkółkach, w Wielkiej Brytanii, Francji i Niemczech zwrócili uwagę Gibbs i wsp. (1999), Streito i wsp. (2002) oraz Jung i Blaschke (2004). Gatunki tego rodzaju są przenoszone w czasie opadów oraz podczas podlewania roślin wodą pobieraną bezpośrednio z rzek lub ze zbiorników wodnych. W sprzyjających warunkach może to doprowadzić nawet do epidemii (Hunter i Kunimoto 1974; Keim i wsp. 1981; Shea i wsp. 1983). W Polsce pierwsze badania nad tym zagadnieniem zapoczątkował Orlikowski (2006), a następnie Orlikowski i wsp. (2007). Autorzy stwierdzili, że przyczyną zamierania wierzchołków: świerku, żywotnika i różanecznika w dwóch szkółkach roślin ozdobnych w 2005 r., był gatunek *P. citricola* Sawada, a rozprzestrzenianiu się zarazy wierzchołków pędów sprzyjała wietrzna i deszczowa pogoda z temperaturą 18–22°C. Z kolei Oudermans (1999) ze zbiorników i kanałów rekultywacyjnych izolował *P. cinammoni*, który jest znanym patogenem ponad 3 tysięcy roślin żywicielskich (Brasier 2008). W Niemczech z wody pochodzącej ze zbiorników i studni znajdujących się na terenie 4 szkółek roślin ozdobnych, izolowano 12 gatunków *Phytophthora* spp. (Themann i wsp. 2002), a dominującymi gatunkami okazały się: *P. gonapodyides* (Petersen) Buisman, *P. drechsleri* Tucker, *P. cryptogea* Pethybr. et Laff. i *P. citricola*. Patogeny te były wykrywane w ciągu całego sezonu wegetacyjnego, ale najczęściej w listopadzie.

Na Ukrainie nie prowadzono dotychczas badań nad występowaniem gatunków *Phytophthora* w wodzie.

Celem badań była detekcja i identyfikacja *Phytophthora* spp. w dwóch rzekach i jeziorze oraz określenie patogeniczności wybranych izolatów względem różanecznika.

Materiały i metody / Materials and methods

Do badań wytypowano 3 obiekty, tj. 2 rzeki – Stryj (przepływająca przez terytorium Skoliwskich Beskidów) i Yasenytsya (przepływająca przez terytorium Górno-Dnistrowskich Beskidów) oraz jezioro zlokalizowane w Parku Narodowym „Skoliwski Beskidy” na obrzeżach miasta Skole.

W badaniach wykorzystano liście różanecznika odmiany Nova Zembla jako pułapki, stosując metodę opisaną przez Themann i Werres (1998) oraz Orlikowski i wsp. (2011). Na przełomie października i listopada 2011 roku wierzchołkowe pędy różanecznika z 8–10 liśćmi ścinano, przywiązywano do sznurka długości około 4 m i wrzucano do wody, 2–3 m od brzegu, tak aby powierzchnia liści miała stały kontakt z wodą. Pędy wyjmowano po 7 dniach i przewożono w torebkach

foliowych do laboratorium. Liście pułapkowe myto wodą wodociągową, a następnie wodą destylowaną i suszono pomiędzy warstwami bibuły filtracyjnej. Następnie liczono liczbę nekrotycznych plam jako wskaźnik liczebności *Phytophthora* w wodzie. Fragmenty nekrotycznych tkanek o średnicy około 3 mm wykładano na pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar, Merck). Po 24–48 godzinach inkubacji w temperaturze 25°C w ciemności, wyrastające wokół wyłożonych skrawków kolonie przeszczepiano na skosy z PDA. Kultury oczyszczono i wybrane izolaty oznaczono do gatunku na podstawie cech morfologicznych (Erwin i Ribeiro 1996). Wyniki identyfikacji potwierdzono badaniami molekularnymi (Nechwatal i Mendgen 2006; Trzewik i wsp. 2010). Gatunki *Phytophthora* oznaczono wykorzystując startery specyficzne dla gatunku stosując metodę opisaną przez (Nechwatal i Mendgen 2006) oraz trawienie enzymami restrykcyjnymi fragmentu DNA (deoxyribonucleic acid) zawierającego ITS1 i ITS2 według Cooke i wsp. (2000).

Testy patogeniczności wybranych izolatów *Phytophthora* przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na liściach różanecznika odmiana Nova Zembla. Na środek blaszek liściowych, umieszczonych w kuwetach wyłożonych wilgotną bibułą filtracyjną i przykrytą plastikową siatką, nakładano 5 mm średnicy krążki pożywki V8 przerośniętej patogenem. Kuwety inkubowano w temperaturze 20–22°C. Średnicę nekrozy mierzono po 5 i 7 dniach inkubacji. Doświadczenie założono w układzie bloków kompletnie losowanych, w 4 powtórzeniach po 5 liści. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic pomiędzy średnimi na poziomie $p = 0,05$ oceniano testem Duncana.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Występowanie gatunków rodzaju *Phytophthora* stwierdzono w 2 rzekach oraz jeziorze zarówno w październiku, jak i listopadzie. Przynależność do gatunku potwierdzono stosując metody molekularne (rys. 1, 2). Analiza liczby plam na liściach pułapkowych różanecznika, jako miara liczebności gatunków *Phytophthora* w wodzie wykazała, że istotnie więcej nekrotycznych plam na liściach pułapkowych było w jeziorze oraz rzece Yasenytsya (tab. 1). Największą różnorodność gatunków odnotowano w jeziorze (tab. 2). Oprócz *P. gonapodyides* i *P. lacustris* z wód jeziora izolowano także *Pythium litorale*. Natomiast w rzece Yasenytsya wykryto *P. gonapodyides* i *P. lacustris*, a w rzece Stryj – *P. lacustris* i *P. litorale*. Podobne wyniki uzyskał Nechwatal i Mendgen (2006). W strefie przybrzeżnej jeziora Constance z ryzosfery badacze izolowali *Phytophthora* takson Salixsoil, który pierwotnie uznano za *P. gonapodyides*, a w 2011 roku oznaczono jako *P. lacustris* (Nechwatal i wsp. 2012). Bardziej szczegółowa analiza wykazała znacznie wyższy stopień agresywności *P. lacustris* w stosunku do *Salix alba* aniżeli *P. gonapodyides* (Nechwatal i Mendgen 2006). Autorzy uważają, że gatunek ten może być groźnym patogenem korzeni roślin drzewiastych, rosnących w miejscach wilgotnych lub zalewanych, a ze względu na podobieństwo do *P. gonapodyides* może występować częściej niż dotychczas sądzono. Również Hansen i Delatour (1999) izolowali

Tabela 1. Liczba plam nekrotycznych na liściach pułapkowych oraz liczba uzyskanych kolonii *Phytophthora*
 Table 1. Number of necrotic spots on baiting leaves and number of *Phytophthora* colony

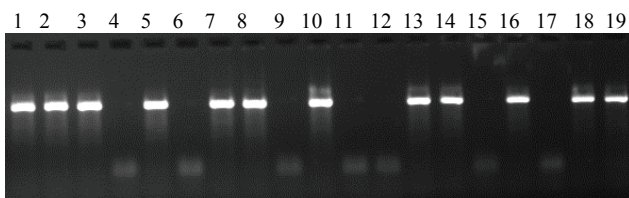
Źródło izolatu Source of isolate	Liczba plam nekrotycznych na liściach pułapkowych Number of necrotic spots on baiting leaves	Liczba uzyskanych kolonii Number obtained of colony
Rzeka Stryj – Stryj river	56,3 a	19
Jezioro – Lake	101,5 b	14
Rzeka Yasenytsya – Yasenytsya river	112,8 b	13

Średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
 Mean values in the columns marked with the same letter are not significantly different (at 5%) according to Duncan's test

Tabela 2. Kolonizacja liści różanecznika przez wybrane izolaty *Phytophthora* spp. i *P. litorale*
 Table 2. Colonization of *Rhododendron* leaves by selected isolates of *Phytophthora* spp. and *P. litorale*

Numer izolatu Isolate number	Izolat Isolate	Źródło izolatu Source of isolate	Średnica nekrozy po 5 i 7 dniach od inokulacji Diameter of necrosis 5 and 7 days after inoculation [mm]	
			5	7
22A	<i>P. lacustris</i>	rzeka Stryj Stryj river	15,9 c	25,5 d
3D	<i>P. litorale</i>	jezioro – lake	7,4 b	11,1 b
3C	<i>P. lacustris</i>	jezioro – lake	7,7 b	13,1 bc
1D	<i>P. lacustris</i>	rzeka Yasenytsya Yasenytsya river	10,3 b	16,3 c
1A	<i>P. litorale</i>	rzeka Yasenytsya Yasenytsya river	3,2 a	4,2 a
3A	<i>P. gonapodyides</i>	rzeka Yasenytsya Yasenytsya river	4,4 a	8,5 b

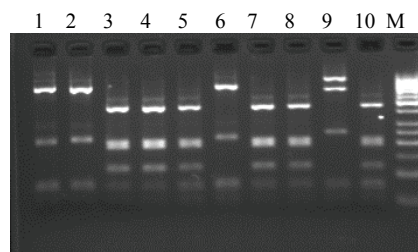
Średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
 Mean values in the columns marked with the same letter are not significantly different (at 5%) according to Duncan's test



Rys. 1. Produkty PCR potwierdzające przynależność gatunkową otrzymanych izolatów przy użyciu starterów gatunkowo-specyficznych Ph1/Ph2 (Nechwatal i Mendgen 2006) dla *P. lacustris*. Ścieżki: 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 – *P. lacustris*, 19 – izolat referencyjny P245 *P. lacustris*

Fig. 1. PCR products confirming taxonomic status obtained with the species-specific primers Ph1/Ph2 (Nechwatal and Mendgen 2006) for *P. lacustris*. Line: 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 – *P. lacustris*, 19 – reference isolate P245 *P. lacustris*

z wody *P. gonapodyides*. Zaskakujący jest fakt braku izolacji z wody izolatów *P. citricola*. Z badań Orlikowskiego (2006) oraz Orlikowskiego i wsp. (2007, 2010) wynika, że gatunek ten w ostatnich latach dominował w różnych źródłach wody w Polsce. Izolowano go przez cały rok zarówno z rzek przepływających przez tereny ogrodnicze, jak i leśne, a także ze zbiorników i cieków wodnych zlokalizowanych na terenie gospodarstw ogrodniczych. Ponadto Orlikowski i wsp. (2010) wykazali zdolność do kolonizacji liści olszy, topoli, różanecznika i wierzby przez izolaty *P. citricola* otrzymane z wody.



Rys. 2. Produkty trawienia restrykcyjnego regionu ITS enzymem *AluI*. Ścieżka: 1, 2, 6 – *Pythium litorale*, 3, 4, 5, 7, 8, 10 – *P. gonapodyides*, 9 – *Pythium* spp., M – marker wielkości 50bp DNA Ladder (Fermentas)

Fig. 2. Products of restriction digestion of ITS region with *AluI* enzyme. Line: 1, 2, 6 – *Pythium litorale*, 3, 4, 5, 7, 8, 10 – *P. gonapodyides*, 9 – *Pythium* spp., M – marker 50bp DNA Ladder (Fermentas)

Wszystkie badane izolaty kolonizowały tkanki różanecznika, przy czym stwierdzono zróżnicowaną reakcję roślin na testowane kultury (tab. 2). Najszybszy rozwój nekrozy obserwowano w wyniku inokulacji blaszek liściowych izolatem *P. lacustris* (22A) z rzeki Stryj. Najmniej patogenicznym okazał się gatunek *P. litorale* (1A) z rzeki Yasenytsya, a następnie *P. gonapodyides* izolat (3A) z jeziora zlokalizowanego w Parku Narodowym „Skoliwski Beskidy”. W celu spełnienia postulatów Kocha ze zmienionych chorobowo tkanek reizolowano czynnik chorobotwórczy i ponownie oznaczano go do gatunku.

Wnioski / Conclusions

1. W analizowanych źródłach wody stwierdzono występowanie gatunków: *P. gonapodyides*, *P. lacustris* i *P. litorale*.
2. Jest to pierwsze doniesienie o występowaniu gatunków rodzaju *Phytophthora* w wodzie na Ukrainie.
3. Wszystkie badane izolaty kolonizowały liście różnecznika, przy czym najmniej patogenicznym okazał się *P. litorale* (1A) z rzeki Yasenytsya, a najszybszy rozwój nekrozy obserwowano na blaszkach liściowych zainokulowanych izolatem *P. lacustris* (22A) z rzeki Stryj.

Literatura / References

- Bewley W.F., Buddin W. 1921. On the fungus flora of greenhouse water supplies in relation to plant disease. *Ann. Appl. Biol.* 8 (1): 10–19.
- Brasier C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade plants. *Plant Pathol.* 57 (5): 792–808.
- Cooke D., Godwin-Keene G., Williams N., Smith J., Cooper J. 2000. PhytID – identification of plant pathogenic *Phytophthora* species by ITS fingerprinting. <http://www.phytid.org>, dostęp: 20.03.2012.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul, MN, 562 pp.
- Gibbs J.N., Lipscombe M.A., Peace A.J. 1999. The impact of *Phytophthora* disease on rapirian population of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *Eur. J. For. Pathol.* 29 (1): 39–50.
- Hansen E., Delatour C. 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. *Ann. For. Sci.* 56 (7): 539–547.
- Hong C.X., Moorman G.W. 2005. Plant pathogens in irrigated water: challenges and opportunities. *Critical Rev. Plant Sci.* 24 (3): 189–208.
- Hunter J.E., Kunimoto R.K. 1974. Dispersal of *Phytophthora palmivora* by wind-blown rain. *Phytopathology* 64 (2): 202–206.
- Jung T., Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathol.* 53 (2): 197–208.
- Keim R., Klure L.J., Zentmeyer G.A. 1981. A foliage blight of eunymus caused by *Phytophthora*. *Calif. Agric.* 35 (5/6): 16–17.
- Nechwatal J., Bakony J., Cacciola S.O., Cooke D.E.L., Jung T., Nagy Z.Á., Vannini A., Vettraino 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 Pathol.* 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 (3): 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 (2): 163–168.
- Orlikowski L.B., Trzewik A., Orlikowska T. 2007. Water as potential source of *Phytophthora citricola*. *J. Plant Prot. Res.* 47 (2): 121–132.
- 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. *Żesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 554: 159–164.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011. Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody. *Sylwan* 155 (7): 493–499.
- Oudermans P.V. 1999. *Phytophthora* species associated with cranberry root rot and surface irrigation water in New Jersey. *Plant Dis.* 83 (3): 251–258.
- Shea S.R., Shearer B.L., Tipperett J.T., Deegan P.M. 1983. Distribution, reproduction and movement of *Phytophthora cinnamoni* on sites highly conducive to jarrat dieback in South Western Australia. *Plant Dis.* 67 (9): 970–973.
- Streito J.C., Legrand P., Tabary F., De Villartay G.J. 2002. *Phytophthora* disease of alder (*Alnus glutinosa*) in France: investigation between 1995 and 1999. *Forest Pathol.* 32 (3): 179–191.
- Themann K., Werres S. 1998. Verwendung von rhododendronblättern zum nachweis von phytophthora-arten in wurzeln- und bodenproben. *Nachrichtenblatt des Deutsch. Pflanzenschuttsd.* 50: 37–45.
- Themann K., Werres S., Luttmann R., Diener H.A. 2002. Observatoin of *Phytophthora* spp. in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock. *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (4): 337–343.
- 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.