

Multiplexowa detekcja gatunków *Phytophthora* przy użyciu platformy Fluidigm

Multiplex detection of *Phytophthora* spp. using the Fluidigm platform

Katarzyna Sikora¹ , Tomasz Oszako^{1,4} , Katarzyna Kubiak⁵ ,
Justyna Anna Nowakowska² , Tadeusz Malewski^{3*} 

¹Institut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3; 05-090 Raszyn; ²Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, ul. Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa;

³Muzeum i Instytut Zoologii, PAN, Zakład Technik Molekularnych i Biometrycznych, ul. Wilcza 64, 00-679 Warszawa; ⁴Instytut Nauk Leśnych Politechniki Białostockiej w Hajnówce, Piłsudskiego 1A, 17-200 Hajnówka; ⁵Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Lotnictwa, Zakład Teledetekcji, al. Krakowska 110/114, 02-256 Warszawa

*Tel. +48 533755260, e-mail: tmalewski@miiz.waw.pl

Abstract. The genus *Phytophthora* plays an important role not only in agriculture but also in forest ecosystems. As the number of known *Phytophthora* species continues to grow, identifying new isolates in this genus has become increasingly challenging even by DNA sequencing. Therefore, the development of proper techniques for detection and identification is crucial for monitoring and control of these pathogens in the forestry sector. In recent years, new molecular methods using innovative approaches have indeed been developed. However, the majority of these methods was designed to detect single *Phytophthora* species. Techniques that are able to target multiple species would offer advantages, especially for the assessment of *Phytophthora* diversity in the environment. This paper describes a multiplex assay for the identification of eight *Phytophthora* isolates, down to the species level, based on a Fluidigm platform employing pyrosequencing. The obtained results showed that for an accurate determination of the species, it is sufficient to know the sequence of two markers, ITS and COX1. The sensitivity of this test is sufficient to identify *Phytophthora* in a pure culture. Unfortunately, analysis based on a pyrosequencing platform does not provide enough data to simultaneously identify multiple *Phytophthora* species in samples collected in the field. This problem could be resolved in the future by sequencing using more efficient platforms like Illumina or IonTorrent.

Keywords: forest soil, oomycetes, oak dieback, pathogens, next generation sequencing

Słowa kluczowe: gleby leśne, oomycety, zamieranie dębów, patogeny, sekwencjonowanie nowej generacji

1. Wstęp

Od szeregu lat gatunki rodzaju *Phytophthora* są przyczyną znacznych strat w szkółkach drzew ozdobnych i leśnych oraz w drzewostanach. Gatunki chorobotwórcze rodzaju *Phytophthora* należą do glebowych patogenów charakteryzujących się wysokim stopniem pasożytnictwa w stosunku do roślin żywicielskich. Stanowią one znaczne zagrożenie dla młodych uszkodzonych oraz nieuszkodzonych tkanek roślinnych (Oszako 2005; Oszako et al. 2007), powodując zgniliznę podstawy pędu i korzeni oraz zarazę wierzchołków pędów. Analiza strat powodowanych przez gatunki *Phytophthora* w uprawie roślin w szkółkach pojemnikowych wykazała, że mogą one dochodzić nawet do 80%. *Phytophthora* była przyczyną zgnilizny korzeni oraz zgnilizny podstawy pędu lub pnia (Orlikowski, Ptaszek 2010; Orlikowski et al. 2012).

Patogeniczne lęgniowce z rodzaju *Phytophthora* stanowią duże zagrożenie dla szeroko rozumianej produkcji roślinnej, zarówno rolnej, jak i leśnej. Obecnie formalnie opisano 142 gatunki *Phytophthora*, a 43 z nich otrzymało tymczasowe nazwy (Cook et al. 2000; Yang et al. 2017). Wczesna detekcja i dokładna identyfikacja czynnika chorobotwórczego jest niezastąpiona w skutecznej ochronie roślin, szczególnie na poziomie produkcji materiału szkółkarskiego (Oszako et al. 2007). Działania prewencyjne umożliwiają bowiem niedopuszczenie do infekcji poprzez dobór płodozmianu roślin odpornych lub tolerujących choroby powodowane przez fitopatogeny. Taka strategia jest zgodna z aktami prawnymi Unii Europejskiej o integrowanej ochronie roślin: dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE (Dyrektywa 2009) oraz rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady 1107/2009/WE (Rozporządzenie 2009).

Wpłynęło: 29.07.2020 r., zrecenzowano: 14.09.2020 r., zaakceptowano: 6.10.2020 r.

Wyniki wielu badań prób środowiskowych wykazały, że często w danej próbce występuje więcej niż jeden gatunek patogeniczny; jednakże wiele obecnie używanych technik analiz DNA nie jest w stanie zidentyfikować mieszanek gatunków *Phytophthora* (Hulvey et al. 2010). Ponadto molekularne metody identyfikacji oparte jedynie na podstawie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) zostały opracowane głównie dla najważniejszych z ekonomicznego punktu widzenia gatunków *Phytophthora*, jak: *P. infestans* (Mont.) de Bary, *P. ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld, *P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. (Martin, Tooley 2004; Schena et al. 2006), *P. megasperma* Drechsler, *P. plurivora* T. Jung and T.I. Burgess, *P. pseudosyringae* T. Jung & Delatour, *P. quercina* T. Jung and T.I. Burgess (Nowakowska et al. 2017), *P. multififormis* Brasier & S.A. Kirk, *P. hungarica* Szabo & Lakatos (Nowakowska et al. 2016), podczas gdy dla wielu innych gatunków nadal brak specyficznych metod detekcji. Ze względu na bliskie pokrewieństwo wielu gatunków *Phytophthora* niemożliwa jest skuteczna identyfikacja tychże patogenów na podstawie tylko i wyłącznie jednej sekwencji np. fragmentu ITS, co stanowi duży problem metodyczny (Riddell et al. 2019). Znacznie większe możliwości identyfikacji stwarzają platformy analityczne, takie jak m.in. mikromacierze (Sikora et al. 2012) lub sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) (Vettraino et al. 2012; Mora-Sala et al. 2019; Morris et al. 2019).

Celem niniejszych badań było opracowanie skutecznej metody identyfikacji gatunków *Phytophthora* w oparciu o markery jądrowe: ITS (internal transcribed spacer) i czynnik elongacji 1 α (TEF1) oraz markery mitochondrialne: gen pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej (COX1) i gen pierwszej podjednostki dehydrogenazy (NADH). Analizę prowadzono na platformie Fluidigm, która dzięki dołączaniu unikatowych sekwencji, umożliwia amplifikację wielu markerów w mieszaninie różnych próbek DNA jednocześnie, w połączeniu z pirosekwencjonowaniem na platformie 454.

2. Materiał i metody

Fragmenty zainfekowanych tkanek (nekroz) wykładano na podłoże selektywne V8-PARP, po czym szalki Petriego inkubowano przez 2–3 dni w 22°C w ciemności (tab. 1). Następnie wyrastające strzępki przenoszono na stałe podłoże hodowlane V8A i inkubowano w takich samych warunkach przez kolejne 7 dni (Ivors 2015). Po uzyskaniu czystych kultur pobierano strzępki patogenów i zaszczepiano płynne podłoże hodowlane V8, a po upływie 5 dni hodowli z uzyskanego mycelium ekstrahowano DNA za pomocą zestawu odczynników GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Waltham, USA) według wskazówek producenta.

Próbki gleby pobierano szpadlem wokół drzew wykazujących symptomy chorobowe w koronach (zamieranie pędów) w odległości około 1 m od pni drzew, z głębokości 20 cm w dwóch miejscach (około 0,5 kg) i mieszano razem (tab 2). Namnażanie selektywne patogenów z gleby przeprowadzono

Tabela 1. Wyniki analizy próbek z czystych kultur metodą Real Time PCR

Table 1. Results of pure culture sample analysis on Real Time PCR

Numer próby Sample no	Pochodzenie Provenance	Gatunek Species	Wartość C_t C_t value
1*	Konstantynowo	<i>Phytophthora cactorum</i>	20,00
2*	Piaski	<i>Phytophthora quercina</i>	19,77
3*	Konstantynowo	<i>Phytophthora alni</i>	23,18
4*	Brzeg	<i>Phytophthora gallica</i>	17,73
5*	Brzeg	<i>Phytophthora lacustris</i>	18,23
6*	Oborniki	<i>Phytophthora bilorbang</i>	25,66
7*	Legnica	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	21,03
8*	Oborniki	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	23,57
9	Oborniki	<i>Phytophthora lacustris</i>	23,42
10	Oborniki	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	20,43
11	Oborniki	<i>Phytophthora</i> sp.	21,14
12	Oborniki	<i>Phytophthora bilorbang</i>	21,58
13	Oborniki	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	21,34
14	Wołów	<i>Phytophthora bilorbang</i>	19,06
15	Oborniki	<i>Phytophthora</i> sp.	20,95
16	Brzeg	<i>Phytophthora</i> sp.	17,41
17	Krotoszyn	<i>Phytophthora quercina</i>	19,13
18	Piaski	<i>Phytophthora quercina</i>	24,79
19	Konstantynowo	<i>Phytophthora cactorum</i>	18,69
20	Konstantynowo	<i>Phytophthora plurivora</i>	21,69
21	Konstantynowo	<i>Phytophthora plurivora</i>	22,93
22	Konstantynowo	<i>Phytophthora quercina</i>	22,95
23	Konstantynowo	<i>Phytophthora cactorum</i>	19,91
24	Konstantynowo	<i>Phytophthora plurivora</i>	22,27

*próbki wybrane do analizy na platformie Fluidigm / samples selected for analysis on Fluidigm platform

Tabela 2. Wyniki analizy próbek gleby metodą Real Time PCR
Table 2. Results of soil sample analysis on Real Time PCR

Numer próby Sample no	Pochodzenie Provenance	Panujący gatunek drzewa Dominant tree species	Wartość C_t C_t value
25*	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	35,27
26*	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	33,14
27*	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	36,10
28*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39,42
29*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39,67
30*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	37,25
31*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39,26
32*	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	39,07
33*	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38,56
34*	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38,48
35	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	38,18
36	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	36,16
37	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	35,75
38	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
39	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
40	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39,81
41	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
42	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39,55
43	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
44	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
45	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
46	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38,23
47	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	>40
48	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38,84
49	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38,44
50	Szkółka	<i>Alnus glutinosa</i>	38,02
51	Szkółka	<i>Alnus glutinosa</i>	36,07

*próbki wybrane do analizy na platformie Fluidigm / samples selected for analysis on Fluidigm platform

na pożywcę selektywnej PB-PARP (PeaBroth PARP) z dodatkiem mieszaniny antybiotyków oraz PCNB według protokołu opisanego przez Kubiak i in. (2012). DNA ekstrahowano za pomocą zestawu PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, Carls-

bad, USA) według wskazówek producenta. Stężenie DNA mierzono na spektrofotometrze NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Identyfikacja *Phytophthora* za pomocą Real Time PCR

Obecność materiału genetycznego *Phytophthora* w próbkach DNA wydzielonych z czystych kultur oraz próbek gleby potwierdzono na podstawie łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time PCR). W reakcji zastosowano startery uniwersalne dla rodzaju *Phytophthora* FITS_15Ph i RITS_279Ph oraz sondę molekularną All_Phytophthora typu TaqMan (Kox et al. 2007). Mieszanina reakcyjna zawierała: 1 x bufor reakcyjny (TaKaRa, Kusatsu, Shiga, Japan), 250 nM każdego ze starterów, 83 nM sondy, barwnik referencyjny ROX oraz 1 ng DNA. Profil termiczny reakcji: denaturacja wstępna w 94°C, 3 min; amplifikacja (40 cykli) – denaturacja w 94°C, 5 sek., przyłączanie starterów i amplifikacja w 60°C, 1 min. Odczyt fluorescencji nastąpił po każdym etapie amplifikacji. W celu stwierdzenia obecności patogenu określano wartość cyklu progowego (C_t), w którym sygnał fluorescencji osiągnie wartość graniczną pozwalającą na jego wykrycie. Wartość ta jest odwrotnie proporcjonalna do ilości DNA badanego patogenu w próbce (Dorak 2007). Na podstawie wartości fluorescencji sondy TaqMan (C_t) stwierdzono obecność *Phytophthora*, a także wybrano próbki do analizy na platformie Fluidigm.

Przygotowanie bibliotek amplikonów do pirosekwencjonowania

Do analizy składu gatunkowego przygotowano biblioteki składające się z amplikonów ITS, COX1, TEF i NADH1. W tym celu przeprowadzono dwuetapową amplifikację markerów. W pierwszym etapie amplifikowano markery z odpowiednimi dla danego regionu starterami: ITS (White et al. 1990), COX1 (Martin et al. 2003), TEF i NADH1 (Kroon et al. 2004). W drugim etapie wykonano amplifikację mieszaniny produktów PCR otrzymanych w pierwszym etapie ze starterami oflankowanymi sekwencjami unikatowymi (ang. barcode) umożliwiającymi przypisanie sekwencji do próbki oraz niezbędnymi do pirosekwencjonowania: 5'-ACA-CTGACGACATGGTTCTACA-3' do starterów wiodących oraz 5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3' do starterów wstecznych. Amplifikację przeprowadzono na aparacie Fluidigm Biomark HD (Fluidigm, San Francisco, CA, USA) w Plant Research Institute, Wageningen, Holandia.

Pirosekwencjonowanie

Produkty amplifikacji zmieszano w równych proporcjach, pobierając po 4 µl każdej z reakcji. Tak przygotowaną mieszaninę amplikonów rozdzielono w żelu agarozowym o stężeniu 1%. Z żelu agarozowego wycinano odpowiedniej długości produkty PCR i oczyszczano za pomocą zestawu odczynników QIAquick (Qiagen, Hilden, Germany) zgod-

nie z instrukcją producenta. Oczyszczone DNA pirosekwencjonowano w Greenomics Plant Research International BV, na Uniwersytecie Wageningen w Holandii na sekwencjonatorze Roche/454 Titanium. Otrzymane sekwencje analizowano w programie CLC Genomics Workbench (Qiagen, Hilden, Germany). Identyfikację gatunkową przeprowadzono na podstawie porównania otrzymanych sekwencji DNA z sekwencjami zdeponowanymi w internetowej bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI) www.ncbi.nlm.nih.gov oraz Q-bank <https://qbank.eppo.int> (Bonants et al. 2013)

3. Wyniki i dyskusja

W ciągu ostatnich dwóch dekad różnorodność gatunków *Phytophthora* była szeroko badana poprzez analizę zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA. Do najczęściej stosowanych markerów należą ITS i COX1 (Martin, Tooley 2004). Rzadziej w badaniach stosowano β -tubulinę (Villa et al. 2006), czynnik elongacji 1 α (Van't Klooster et al. 2000), czy dehydrogenazę NADH1 (Kroon et al. 2004).

Analiza DNA wydzielonego z czystych kultur wykazała obecność *Phytophthora* we wszystkich 24 izolatach (tab. 1). Wartość cyklu progowego (C_t) wynosiła od 18,23 do 25,66. Obecność *Phytophthora* stwierdzono również w 21 z 28 analizowanych próbek gleby, ale miały one znacznie wyższą wartość C_t , która wynosiła od 33,14 do 39,67, co świadczy o mniejszej ilości DNA pochodzącej od *Phytophthora* (tab. 2).

Większość metod opartych na reakcjach PCR wykrywa pojedyncze gatunki w próbce i nie nadaje się do badania różnorodności gatunkowej *Phytophthora* w próbkach środowiskach (Scheda et al. 2008). Perspektywiczne są natomiast metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS). W wyniku pirosekwencjonowania otrzymano od 1 do 475 sekwencji w analizowanych próbkach (tab. 3). Najwięcej sekwencji (2–475) otrzymano dla ITS, znacznie mniej (1–36) dla pozostałych genów. Szczególnie wyraźnie widać to w przypadku analizy próbek gleby, gdzie dla ITS otrzymano od 17 do 474 sekwencji, natomiast dla NADH od 0 do 12, a dla COX1 od 0 do 2 sekwencji. Sekwencjonowanie TEF w próbkach gleby było nieskuteczne. Duża liczba otrzymanych sekwencji ITS może być uwarunkowana wysoką liczbą sekwencji ITS w genomie *Phytophthora*. W genomie *P. cactorum* jest 376 kopii rDNA (Yang et al. 2018). Można przypuszczać, że u innych gatunków *Phytophthora* liczba kopii rDNA, w którego skład wchodzi ITS1 i ITS2, może być również duża.

Analiza otrzymanych sekwencji w BLAST wykazała, że do określenia przynależności gatunkowej (identyczność sekwencji >97%) *P. cactorum* również skutecznie można stosować ITS, COX1 lub NADH. Wszystkie otrzymane sekwencje tych genów zostały poprawnie przypisane do gatunków. Geny ITS i COX1 pozwalają również poprawnie zidentyfikować *P. quercina*, natomiast w przypadku *P. alni* Brasier & S.A. Kirk poprawne przypisanie do gatunku zapewnia tylko COX1. Poprawną identyfikację *P. bilorbang* i *P. gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman zapewniają geny COX1 i TEF.

Regiony ITS jądrowego rybosomalnego DNA (rDNA) są najczęściej sekwencjonowane u *Phytophthora*, ponieważ występują w wysokiej liczbie kopii, mają wysoką zmienność, a do ich amplifikacji względnie łatwo dobrać startery. Niestety zmienność ITS jest nie zawsze wystarczająca do identyfikacji gatunkowej *Phytophthora* (Cooke et al. 2000; Kroon et al. 2004). Była ona niewystarczająca do poprawnego przypisania sekwencji do gatunku *Phytophthora alni*, *P. bilorbang* i *P. gonapodyides*. Dla tych gatunków skutecznym genem był COX1. Analiza sekwencji dwóch markerów ITS i COX1 pozwoliła określić przynależność gatunkową każdej próbki. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami Yang i Hong (2018), którzy sugerują sekwencjonowanie dwóch markerów do identyfikacji gatunkowej *Phytophthora*.

W próbkach DNA wydzielonych z gleby pobranej w drzewostanach zidentyfikowano zarówno patogeny należące do

Tabela 3. Liczba sekwencji z badanych próbek po pirosekwencjonowaniu

Table 3. Number of obtained sequences after samples pyrosequencing

Numer próby No of sample	Gen / Gene			
	ITS	COX1	TEF	NADH1
Czysta kultura / Pure culture				
1	38	6	2	3
2	23	16	1	2
3	0	0	0	0
4	40	19	23	0
5	39	11	36	1
6	5	21	3	0
7	2	1	0	0
8	16	26	23	0
Gleba / Soil				
25	211	2	0	0
26	17	0	0	0
27	475	1	0	0
28	255	0	0	0
29	287	0	0	12
30	239	0	0	0
31	259	1	0	0
32	114	0	0	1
33	151	0	0	0
34	161	0	0	0

rodzajów *Cryptococcus*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium* czy *Neonectria*, jak i ich antagonistów z rodzaju *Trichoderma* czy inne niepatogeniczne dla roślin saprotrofy jak *Mortierella*, pleśnie: *Mucor* i *Penicilium* (pędzlaki) czy jamkówkę *Fibroporia* (z rodziny żagwiowatych). Pirosekwencjonowanie nie wykryło obecności *Phytophthora* w żadnej próbce gleby, pomimo pozytywnego wyniku otrzymanego w reakcji Real Time PCR. Wskazuje to na niższą czułość sekwencjonowania na platformie 454 w porównaniu do Real Time PCR. Ilość *Phytophthora* w porównaniu do ilości innych organizmów w próbkach gleby jest mniejsza. Różnica wartości C_t dla próbek DNA wydzielonych z gleby w stosunku do próbek z czystych kultur wynosiła 7,48–21,34 cykli PCR. Ilość matrycy w próbce jest odwrotnie proporcjonalna do wartości C_t , a w każdym cyklu PCR ilość amplikonu w przybliżeniu dwukrotnie się zwiększa, co oznacza, że ilość *Phytophthora* była poniżej 1% ($1/2^{7,478}=0,056$). Otrzymane wyniki sugerują, że do analizy obecności *Phytophthora* w próbkach środowiskowych potrzebne są bardziej wydajne niż pirosekwencjonowanie platformy, np. Illumina czy IonTorrent (Catala et al. 2015; Aguayo et al. 2018; Burgess et al. 2018; Riddell et al. 2019).

Molekularne analizy DNA są wysoce przydatne jako metody wczesnego i szybkiego ostrzeżenia przed groźnymi gatunkami grzybów i łęgniowców (*Phytophthora*, *Pythium*) w glebie i wodzie pochodzących ze szkółek, upraw i drzewostanów leśnych (Kox et al. 2007; Nowakowska et al. 2016; Nowakowska et al. 2017). Szczególnie weryfikacja zdrowotności sadzonek wysadzanych na uprawy leśne ma zasadnicze znaczenie dla trwałości i różnorodności biologicznej przyszłych lasów.

4. Wnioski

Multipleksowa analiza sekwencji ułatwia identyfikację patogenów z rodzaju *Phytophthora*, szczególnie w przypadkach, gdy bliskie pokrewieństwo uniemożliwia analizę tylko na podstawie jednego markera. Stwierdzono, że do identyfikacji gatunku wystarcza analiza dwóch markerów: ITS i COX1.

Wydajność sekwencjonowania platformy Roche/454 Titanium nie jest wystarczająca do multipleksowej identyfikacji gatunków *Phytophthora* w próbkach glebowych.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

Źródło finansowania badań

W pracy wykorzystano wyniki badań Instytutu Badawczego Leśnictwa sfinansowanych ze środków Lasów Państwowych.

Literatura

Aguayo J., Fourrier-Jeandel C., Husson C., Ioos R. 2018. Assessment of passive traps combined with high-throughput sequencing to

study airborne fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e02637-17. DOI 10.1128/AEM.02637-17.

- Bonants P., Edema M., Robert V. 2013. Q-bank, a database with information for identification of plant quarantine plant pest and diseases. *EPPO Bulletin* 43: 211–215. DOI 10.1111/epp.12030.
- Catala S., Pérez-Sierra A., Abad-Campos P. 2015. The use of genus-specific amplicon pyrosequencing to assess *Phytophthora* species diversity using eDNA from soil and water in northern Spain. *PLOS ONE* 10(3): e0119311. DOI 10.1371/journal.pone.0119311.
- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagels G., Brasier C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17–32. DOI 10.1006/fgbi.2000.1202.
- Dorak M.T. 2007. Real-Time PCR. Taylor and Francis, Oxford, UK. 333 s. ISBN 9780203967317, DOI 10.4324/9780203967317.
- Dyrektywa 2009. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów (Dz.U. L 309 z 24.11.2009, art. 14).
- Hulvey J., Gobena D., Finley L., Lamour K. 2010. Co-occurrence and genotypic distribution of *Phytophthora* species recovered from watersheds and plant nurseries of eastern Tennessee. *Mycologia* 102(5): 1127–1133. DOI 10.3852/09-221.
- Ivors K.L. 2015. Laboratory Protocols for *Phytophthora* Species. APS Press, ISBN 978-0-89054-496-9, DOI 10.1094/9780890544969.
- Kox L., Heurneman I., Vossenbergh van den B., Beld van den I., Bonants P., Gruyter de H. 2007. Diagnostic values and utility of immunological, morphological and molecular methods for in planta detection of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 97: 1119–1129. DOI 10.1094/phyto-97-9-1119.
- Kroon L.P.N.M., Bakker F.T., van den Bosch G.B.M., Bonants P.J.M., Flier W.G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41: 766–782. DOI 10.1016/j.fgb.2004.03.007.
- Kubiak K., Oszako T., Jabłoński T. 2012. Detekcja fitopatogenów z rodzaju *Phytophthora* w glebach leśnych za pomocą analiz DNA. *Sylwan* 156(6): 437–443. DOI 10.2478/ffp-2014-0016.
- Martin F.N., Tooley P.W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95: 269–284. DOI 10.2307/3762038.
- Martin F.N., Tooley P.W. 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94: 983–991. DOI 10.1094/phyto.2004.94.9.983.
- Mora-Sala B., Gramaje D., Abad-Campos P., Berbegal M. 2019. Diversity of *Phytophthora* species associated with *Quercus ilex* L. in three Spanish regions evaluated by NGS. *Forests* 10: 979. DOI 10.3390/f10110979.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba A., Borys M., Oszako T. 2016. Molekularna diagnostyka wybranych patogenów z rodzaju *Phytophthora* w ramach integrowanej ochrony roślin. *Sylwan* 160(5): 365–370. DOI 10.1111/efp.12303.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba A., Oszako T. 2017. Rapid diagnosis of pathogenic *Phytophthora* species in soil by real-time PCR. *Forest Pathology* 47(2): e12303. DOI 10.1111/efp.12303.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M. 2010. Narastające problemy chorobowe w produkcji pojemnikowej roślin iglastych. *Postępy Ochrony Roślin* 50(2): 678–685.

- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T., Szkuta G., Meszka B., Skrzypczak Cz. 2012. Zagrożenie upraw ogrodniczych przez gatunki rodzaju *Phytophthora*. *Postępy w Ochronie Roślin* 52(1): 92–100.
- Oszako T. 2005. Zagrożenie szkótek i drzewostanów, ze szczególnym uwzględnieniem olszy przez gatunki rodzaju *Phytophthora*. *Sylwan* (6): 55–61. DOI 10.26202/sylvan.9200501.
- Oszako T., Orlikowski L.B., Trzewik A. 2007. Zagrożenie polskich szkótek leśnych przez gatunki rodzaju *Phytophthora*. *Progress in Plant Protection* 47: 224–234. DOI 10.14199/ppp-2015-011.
- Riddell C.E., Frederickson-Matika D., Armstrong A.C., Elliot M., Forster J., Hedley P.E., Morris J., Thorpe P., Cooke D.E., Pritchard L., Sharp P.M., Green S. 2019. Metabarcoding reveals a high diversity of woody host-associated *Phytophthora* spp. in soils at public gardens and amenity woodlands in Britain. *PeerJ* 7: e6931. DOI 10.7717/peerj.6931.
- Rozporządzenie 2009. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady 1107/2009/WE z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin (Dz.U. L 309 z 24.11.2009, art. 55).
- Schena L., Dunkan J.M., Cooke D.E.L. 2008. Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57(1): 64–75. DOI 10.1111/j.1365-059.2007.01689.x.
- Schena L., Hughes K.J.D., Cooke D.E.L. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* 7(5): 365–379. DOI 10.1111/j.1364-3703.2006.00345.x.
- Van't Klooster J.W., van den Berg-Velthuis G., van West P., Govers F. 2000. *Tefl*, a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 α . *Gene* 249: 145–151. DOI 10.1016/S0378-1119(00)00151-7.
- Vettraino A.M., Bonants P., Tomassini A., Bruni N., Vannini A. 2012. Pyrosequencing as a tool for the detection of *Phytophthora* species: error rate and risk of false Molecular Operational Taxonomic Units. *Letters in Applied Microbiology* 55(5): 390–396. DOI 10.1111/j.1472-765x.2012.03310.x.
- Villa N.O., Kageyama K., Asano T., Suga H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* 98: 410–422. DOI 10.3852/mycologia.98.3.410.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 315–322. DOI 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.
- Yang M., Duan S., Mei X., Huang H., Chen W., Liu Y., Guo C., Yang T., Wei W., Liu X., He X., Dong Y., Zhu S. 2018. The *Phytophthora cactorum* genome provides insights into the adaptation to host defense compounds and fungicides. *Scientific Reports* 8: 6534. DOI 10.1038/s41598-018-24939-2.
- Yang X., Hong C. 2018. Differential usefulness of nine commonly used genetic markers for identifying *Phytophthora* species. *Frontiers in Microbiology* 9: 2334. DOI 10.3389/fmicb.2018.02334.
- Yang X., Tyler B.M., Hong C. 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus* 8(2): 355–384. DOI 10.5598/imafungus.2017.08.02.09.

Wkład autorów

K.S. – koncepcja, eksperyment, analiza wyników, redakcja tekstu; T.O. – koncepcja, redakcja tekstu; K.K. – analiza wyników, eksperyment, redakcja tekstu; J.A.N. – koncepcja, analiza wyników, redakcja tekstu; T.M. – analiza wyników, redakcja tekstu

Multiplex detection of *Phytophthora* spp. using the Fluidigm platform

Katarzyna Sikora¹ , Tomasz Oszako^{1,4} , Katarzyna Kubiak⁵ , Justyna Anna Nowakowska² , Tadeusz Malewski^{3*} 

¹Forest Research Institute, Department of Forest Protection, Sękocin Stary, 3 Braci Leśnej St; 05–090 Raszyn, Poland; ²Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Environmental Sciences, 1/3 Wóycickiego St, 01–938 Warsaw, Poland; ³Museum and Institute of Zoology of Polish Academy of Sciences, Department of Molecular and Biometric Techniques, 64 Wilcza St, 00–679 Warsaw, Poland; ⁴Białystok University Of Technology, Institute of Forest Sciences, 1A Piłsudskiego St, 17–200 Hajnówka, Poland; ⁵Łukasiewicz Research Network – Institute of Aviation, 110/114 Krakowska Ave., 02–256 Warsaw, Poland

*Tel. +48 533755260, e-mail: tmalewski@miiz.waw.pl

Abstract: The genus *Phytophthora* plays an important role not only in agriculture but also in forest ecosystems. As the number of known *Phytophthora* species continues to grow, identifying new isolates in this genus has become increasingly challenging even by DNA sequencing. Therefore, the development of proper techniques for detection and identification is crucial for monitoring and control of these pathogens in the forestry sector. In recent years, new molecular methods using innovative approaches have indeed been developed. However, the majority of these methods was designed to detect single *Phytophthora* species. Techniques that are able to target multiple species would offer advantages, especially for the assessment of *Phytophthora* diversity in the environment. This paper describes a multiplex assay for the identification of eight *Phytophthora* isolates, down to the species level, based on a Fluidigm platform employing pyrosequencing. The obtained results showed that for an accurate determination of the species, it is sufficient to know the sequence of two markers, ITS and COX1. The sensitivity of this test is sufficient to identify *Phytophthora* in a pure culture. Unfortunately, analysis based on a pyrosequencing platform does not provide enough data to simultaneously identify multiple *Phytophthora* species in samples collected in the field. This problem could be resolved in the future by sequencing using more efficient platforms like Illumina or IonTorrent.

Keywords: forest soil, oomycetes, oak dieback, pathogens, next generation sequencing

1. Introduction

For several years now, species of the genus *Phytophthora* have been the cause of significant losses in ornamental tree nurseries and forest stands. The pathogenic species of the genus *Phytophthora* belong to soil pathogens characterised by a high degree of parasitism in their host plants. They pose a significant threat to young, damaged and undamaged plant tissues (Oszako 2005; Oszako et al. 2007), causing rot of the shoot base and roots and shoot tip blight. An analysis of losses caused by *Phytophthora* species in the cultivation of plants in container nurseries showed that they can reach up to 80%. *Phytophthora* was the cause of root and shoot base or stem rot (Orlikowski, Ptaszek 2010; Orlikowski et al. 2012).

Pathogenic oomycetes of the genus *Phytophthora* constitute a great threat to broadly understood plant production, both agricultural and forest. Currently, 142 species of *Phytophthora* are formally described, and 43 of them have been given temporary names (Cook et al. 2000; Yang et al. 2017). Early detection and accurate pathogen identification is irreplaceable in effective plant protection, especially at the level of producing nursery material (Oszako et al. 2007). Preventive measures make it possible to avoid infection by selecting plants for crop rotation that are resistant or tolerate diseases caused by phytopathogens. Such a strategy is in line with the legal acts of the European Union on integrated plant protection: Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council (Directive 2009) and Regulation 1107/2009/EC of the European Parliament and of the Council (Regulation 2009).

Received: 29.07.2020 r., accepted after revision: 6.10.2020 r.

The results of many tests of field samples have shown that often more than one pathogenic species is present in a given sample; however, many of the DNA analysis techniques currently in use are unable to identify the *Phytophthora* species mix (Hulvey et al. 2010). Furthermore, molecular identification methods based solely on the polymerase chain reaction (PCR) have been developed mainly for the economically most important *Phytophthora* species such as: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld, *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. (Martin, Tooley 2004; Schena et al. 2006), *Phytophthora megasperma* Drechsler, *Phytophthora plurivora* T. Jung and T.I. Burgess, *Phytophthora pseudosyringae* T. Jung & Delatour, *Phytophthora quercina* T. Jung and T.I. Burgess (Nowakowska et al. 2017), *Phytophthora multiformis* Brasier & S.A. Kirk, *Phytophthora hungarica* (Nowakowska et al. 2016), while there are still no specific detection methods for many other species. Due to the close relationship of many *Phytophthora* species, it is impossible to effectively identify these pathogens on the basis of only one sequence, e.g. the ITS fragment, which is a major methodological problem (Riddell et al. 2019). Analytical platforms such as microarrays (Sikora et al. 2012) or next-generation sequencing (NGS) (Vettraino et al. 2012; Mora-Sala et al. 2019; Morris et al. 2019) provide much greater possibilities for identification.

The aim of this study was to develop an effective method of *Phytophthora* species identification based on nuclear markers: ITS (internal transcribed spacer) and the elongation factor 1 α (TEF1), as well as mitochondrial markers: the gene of cytochrome oxidase subunit 1 (COX1) and the gene of dehydrogenase subunit 1 (NADH). The analysis was conducted using the Fluidigm platform, which, thanks to the addition of unique sequences, enables the simultaneous amplification of multiple markers in a mixture of different DNA samples, combined with pyrosequencing using the 454 platform.

2. Material and methods

Fragments of infected tissues (necrosis) were placed on V8-PARP selective medium, after which the Petri dishes were incubated for 2–3 days at 22°C in the dark (Table 1). Then the growing strands were transferred to V8A selective medium and incubated under the same conditions for another 7 days (Ivors 2015). After pure cultures were obtained, the pathogen strands were collected and inoculated into the V8 liquid culture medium, and after 5 days of culture, DNA was extracted from the obtained mycelium using the GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions.

Soil samples were taken with a spade around trees showing symptoms of disease in the crowns (shoot dieback) at a distan-

Table 1. Results of pure culture sample analysis on Real Time PCR

Sample no	Provenance	Species	C _t value
1*	Konstantynowo	<i>Phytophthora cactorum</i>	20.00
2*	Piaski	<i>Phytophthora quercina</i>	19.77
3*	Konstantynowo	<i>Phytophthora alni</i>	23.18
4*	Brzeg	<i>Phytophthora gallica</i>	17.73
5*	Brzeg	<i>Phytophthora lacustris</i>	18.23
6*	Oborniki	<i>Phytophthora bilorbang</i>	25.66
7*	Legnica	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	21.03
8*	Oborniki	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	23.57
9	Oborniki	<i>Phytophthora lacustris</i>	23.42
10	Oborniki	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	20.43
11	Oborniki	<i>Phytophthora</i> sp.	21.14
12	Oborniki	<i>Phytophthora bilorbang</i>	21.58
13	Oborniki	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	21.34
14	Wołów	<i>Phytophthora bilorbang</i>	19.06
15	Oborniki	<i>Phytophthora</i> sp.	20.95
16	Brzeg	<i>Phytophthora</i> sp.	17.41
17	Krotoszyn	<i>Phytophthora quercina</i>	19.13
18	Piaski	<i>Phytophthora quercina</i>	24.79
19	Konstantynowo	<i>Phytophthora cactorum</i>	18.69
20	Konstantynowo	<i>Phytophthora plurivora</i>	21.69
21	Konstantynowo	<i>Phytophthora plurivora</i>	22.93
22	Konstantynowo	<i>Phytophthora quercina</i>	22.95
23	Konstantynowo	<i>Phytophthora cactorum</i>	19.91
24	Konstantynowo	<i>Phytophthora plurivora</i>	22.27

*samples selected for analysis on Fluidigm platform

Table 2. Results of soil sample analysis on Real Time PCR

Sample no	Provenance	Dominant tree species	C _t value
25*	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	35.27
26*	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	33.14
27*	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	36.10
28*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39.42
29*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39.67
30*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	37.25
31*	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39.26
32*	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	39.07
33*	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38.56
34*	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38.48
35	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	38.18
36	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	36.16
37	Kościan	<i>Fraxinus excelsior</i>	35.75
38	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
39	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
40	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39.81
41	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
42	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	39.55
43	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
44	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
45	Karczma Borowa	<i>Quercus petraea</i>	>40
46	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38.23
47	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	>40
48	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38.84
49	Krotoszyn	<i>Quercus robur</i>	38.44
50	Szkółka	<i>Alnus glutinosa</i>	38.02
51	Szkółka	<i>Alnus glutinosa</i>	36.07

*samples selected for analysis on Fluidigm platform

ce of about 1 m from the tree trunks, from a depth of 20 cm in two places (about 0.5 kg) and mixed together (Table 2). The selective multiplication of pathogens from the soil was conduc-

ted in PB-PARP (PeaBroth PARP) selective medium with the addition of a mixture of antibiotics and PCNB according to the protocol described by Kubiak et al. (2012). DNA was extracted using the PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was measured on the NanoDrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Identification of *Phytophthora* with real-time PCR

The presence of *Phytophthora*'s genetic material in DNA samples extracted from the pure culture and soil samples was confirmed on the basis of real-time PCR. The reaction used the FITS_15Ph and RITS_279Ph universal primers for *Phytophthora* and the TaqMan-type All_Phytophthora molecular probe (Kox et al. 2007). The reaction mixture contained: 1 x reaction buffer (TaKaRa, Kusatsu, Shiga, Japan), 250 nM of each primer, 83 nM of probe, ROX reference dye and 1 ng DNA. The reaction thermal profile: pre-denaturation at 94°C, 3 min; amplification (40 cycles) – denaturation at 94°C, 5 s, primer annealing and amplification at 60°C, 1 min. fluorescence reading followed each amplification step. In order to determine the presence of the pathogen, a threshold cycle value (Ct) was determined, in which the fluorescence signal reaches the limit for its detection. This value is inversely proportional to the amount of DNA of the tested pathogen in the sample (Dorak 2007). Based on the TaqMan probe's fluorescence value (Ct), the presence of *Phytophthora* was confirmed and samples were selected for analysis using the Fluidigm platform.

Preparation of amplicon libraries for pyrosequencing

Libraries consisting of ITS, COX1, TEF and NADH1 amplicons were prepared for species composition analysis. For this purpose, a two-stage marker amplification was performed. In the first stage, markers with region-specific starters were amplified: ITS (White et al. 1990), COX1 (Martin et al. 2003), TEF and NADH1 (Kroon et al. 2004). In the second stage, the mixture of PCR products obtained in the first stage was amplified with barcoded primers, enabling sequences to be assigned to the sample and needed for the pyrosequencing: 5'-ACACTGACGACATGGTTCTACA-3' for the forward primers and 5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3' for the reverse primers. Amplification was performed in the Fluidigm Biomark HD (Fluidigm, San Francisco, CA, USA) at the Plant Research Institute, Wageningen, the Netherlands.

Pyrosequencing

Amplification products were mixed in equal proportions, taking 4 µl of each from the reaction. The mixture of amplicons

prepared in this way was separated in 1% agarose gel. PCR products were cut out from the agarose gel to a suitable length and cleaned with a set of QIAquick reagents (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The purified DNA was pyrosequenced at Greenomics Plant Research International BV, University of Wageningen in the Netherlands on a Roche/454 Titanium sequencer. The obtained sequences were analysed in the CLC Genomics Workbench program (Qiagen, Hilden, Germany). Species identification was performed on the basis of comparing the obtained DNA sequences with those deposited in the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) – www.ncbi.nlm.nih.gov – and Q-bank – <https://qbank.eppo.int> (Bonants et al. 2013).

3. Results and discussion

Over the last two decades, the diversity of *Phytophthora* species has been extensively studied by analysing both nuclear and mitochondrial DNA. ITS and COX1 are among the most commonly used markers (Martin, Tooley 2004). β -tubulin (Villa et al. 2006), elongation factor 1 α (Van't Klooster et al. 2000) or NADH1 dehydrogenase (Kroon et al. 2004) are more rarely used in studies.

The analysis of the DNA extracted from the pure cultures showed the presence of *Phytophthora* in all 24 isolates (Table 1). The threshold cycle value (C_t) ranged from 18.23 to 25.66. The presence of *Phytophthora* was also found in 21 out of 28 analysed soil samples, but they had a much higher C_t value, from 33.14 to 39.67, which indicates less *Phytophthora*-derived DNA (Table 2).

Most PCR-based methods detect individual species in a sample and are not suitable for testing *Phytophthora* species diversity in field samples (Sचना et al. 2008). NGS methods are promising. The pyrosequencing resulted in 1 to 475 sequences in the analysed samples (Table 3). Most sequences (2–475) were obtained for ITS, much less (1–36) for the remaining genes. This is particularly clear in the case of the soil sample analysis, where 17 to 474 sequences were obtained for ITS, 0 to 12 for NADH and 0 to 2 sequences for COX1. TEF sequencing of the soil samples was ineffective. The large number of obtained ITS sequences may be conditioned by the high number of ITS sequences in the *Phytophthora* genome. The *Phytophthora cactorum* genome has 376 copies of rDNA (Yang et al. 2018). It can be assumed that other *Phytophthora* species may also have a high number of rDNA copies, which includes ITS1 and ITS2.

The analysis of the obtained sequences in BLAST showed that ITS, COX1 or NADH can be used equally effectively to determine the species *Phytophthora cactorum* (the sequence was identical for > 97%). All obtained sequences of these genes were correctly assigned to the species. ITS

and COX1 genes also allow for the correct identification of *Phytophthora quercina*, while only COX1 ensures the correct species assignment for *Phytophthora alni* Brasier & S.A.Kirk. COX1 and TEF genes ensure the correct identification of *Phytophthora bilobang* and *Phytophthora gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman.

The ITS regions of nuclear ribosomal DNA (rDNA) are most often sequenced for *Phytophthora* because they have a high number of copies, high variability and primers are relatively easy to select for their amplification. Unfortunately, ITS variability is not always sufficient to identify *Phytophthora* species (Cooke et al. 2000; Kroon et al. 2004). It was insufficient to correctly assign sequences to the species *Phytophthora alni*, *Phytophthora bilobang* and *Phy-*

Table 3. Number of obtained sequences after samples pyrosequencing

No of sample	Gene			
	ITS	COX1	TEF	NADH1
Pure culture				
1	38	6	2	3
2	23	16	1	2
3	0	0	0	0
4	40	19	23	0
5	39	11	36	1
6	5	21	3	0
7	2	1	0	0
8	16	26	23	0
Soil				
25	211	2	0	0
26	17	0	0	0
27	475	1	0	0
28	255	0	0	0
29	287	0	0	12
30	239	0	0	0
31	259	1	0	0
32	114	0	0	1
33	151	0	0	0
34	161	0	0	0

Phytophthora gonapodyides. For these species, COX1 was the effective gene. Analysis of the sequence of two markers, ITS and COX1, allowed the species in each sample to be determined. The results obtained are consistent with those of Yang and Hong (2018), who suggest sequencing two markers for *Phytophthora* species identification.

In the DNA samples extracted from the soil taken in the stands, pathogens belonging to the genera *Cryptococcus*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium* and *Neonectria* were identified, as well as their antagonists from the genus *Trichoderma* and other saprotrophs that are not plant pathogens, such as *Mortierella*, the moulds *Mucor* and *Penicillium* or *Fibroporia* (from the family Fomitopsidaceae). Pyrosequencing did not detect the presence of *Phytophthora* in any soil sample, despite the positive result obtained in the real-time PCR. This indicates a lower sequencing sensitivity in the 454 platform compared to real-time PCR. The amount of *Phytophthora* compared to other organisms in the soil samples is lower. The difference in Ct values for DNA samples extracted from soil compared to pure culture samples was 7.48–21.34 PCR cycles. The amount of template in the sample is inversely proportional to the Ct value, and in each PCR cycle, the amount of amplicon approximately doubles, which means that the amount of *Phytophthora* was below 1% ($1/2^{7,478}=0.056$). The results obtained suggest that more efficient platforms are needed than the pyrosequencing platform, e.g. Illumina or Ion Torrent, to analyse the presence of *Phytophthora* in field samples (Catala et al. 2015; Aguayo et al. 2018; Burgess et al. 2018; Riddell et al. 2019).

Molecular DNA analyses are highly useful as early and rapid warning methods for dangerous fungi and oomycete species (*Phytophthora*, *Pythium*) in the soil and water of nurseries, crops and forest stands (Kox et al. 2007; Nowakowska et al. 2016; Nowakowska et al. 2017). In particular, verifying the health of seedlings planted for forest crops is essential for the sustainability and biodiversity of future forests.

4. Conclusions

Multiplex sequence analysis facilitates the identification of pathogens of the *Phytophthora* genus, especially in cases where close relationships prevent analysis on the basis of only one marker. It was found that the analysis of two markers: ITS and COX1 sufficed to identify species.

The sequencing efficiency of the Roche/454 Titanium platform is not sufficient for the multiplex identification of *Phytophthora* species in soil samples.

Conflict of interest

The authors declare the lack of potential conflicts of interest.

Funding sources

The work used the results of research conducted by the Forest Research Institute financed by the State Forests.

References

- Aguayo J., Fourrier-Jeandel C., Husson C., Ios R. 2018. Assessment of passive traps combined with high-throughput sequencing to study airborne fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e02637-17. DOI 10.1128/AEM.02637-17.
- Bonants P., Edema M., Robert V. 2013. Q-bank, a database with information for identification of plant quarantine plant pest and diseases. *EPPO Bulletin* 43: 211–215. DOI 10.1111/epp.12030.
- Catala S., Pérez-Sierra A., Abad-Campos P. 2015. The use of genus-specific amplicon pyrosequencing to assess *Phytophthora* species diversity using eDNA from soil and water in northern Spain. *PLOS ONE* 10(3): e0119311. DOI 10.1371/journal.pone.0119311.
- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagels G., Brasier C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17–32. DOI 10.1006/fgbi.2000.1202.
- Dorak M.T. 2007. Real-Time PCR. Taylor and Francis, Oxford, UK. 333 s. ISBN 9780203967317, DOI 10.4324/9780203967317.
- Dyrektywa 2009. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów (Dz.U. L 309 z 24.11.2009, art. 14).
- Hulvey J., Gobena D., Finley L., Lamour K. 2010. Co-occurrence and genotypic distribution of *Phytophthora* species recovered from watersheds and plant nurseries of eastern Tennessee. *Mycologia* 102(5): 1127–1133. DOI 10.3852/09-221.
- Ivors K.L. 2015. Laboratory Protocols for *Phytophthora* Species. APS Press, ISBN 978-0-89054-496-9, DOI 10.1094/9780890544969.
- Kox L., Heurneman I., Vossenbergh van den B., Beld van den I., Bonants P., Gruyter de H. 2007. Diagnostic values and utility of immunological, morphological and molecular methods for in planta detection of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 97: 1119–1129. DOI 10.1094/phyto-97-9-1119.
- Kroon L.P.N.M., Bakker F.T., van den Bosch G.B.M., Bonants P.J.M., Flier W.G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41: 766–782. DOI 10.1016/j.fgb.2004.03.007.
- Kubiak K., Oszako T., Jabłoński T. 2012. Detection of *Phytophthora* in forest soils using DNA analysis. *Sylwan* 156(6): 437–443. DOI 10.2478/ffp-2014-0016.
- Martin F.N., Tooley P.W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95: 269–284. DOI 10.2307/3762038.
- Martin F.N., Tooley P.W. 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length poly-

- morphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94: 983–991. DOI 10.1094/phyto.2004.94.9.983.
- Mora-Sala B., Gramaje D., Abad-Campos P., Berbegal M. 2019. Diversity of *Phytophthora* species associated with *Quercus ilex* L. in three Spanish regions evaluated by NGS. *Forests* 10: 979. DOI 10.3390/f10110979.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba A., Borys M., Oszako T. 2016. Molecular diagnostic of *Phytophthora* pathogens as a tool for Integrated Pest Management. *Sylwan* 160(5): 365–370. DOI 10.1111/efp.12303.
- Nowakowska J.A., Malewski T., Tereba A., Oszako T. 2017. Rapid diagnosis of pathogenic *Phytophthora* species in soil by real-time PCR. *Forest Pathology* 47(2): e12303. DOI 10.1111/efp.12303.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M. 2010. Narastające problemy chorobowe w produkcji pojemnikowej roślin iglastych. *Progress in Plant Protection* 50(2): 678–685.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T., Szkuta G., Meszka B., Skrzypczak Cz. 2012. Risk of horticultural plants by *Phytophthora* species. *Progress in Plant Protection* 52(1): 92–100.
- Oszako T. 2005. Menace of nurseries and stands (with special regards to alder) with *Phytophthora* species. *Sylwan* 149(6): 55–61. DOI 10.26202/sylwan.9200501.
- Oszako T., Orlikowski L.B., Trzewik A. 2007. Menace to polish forest nurseries by *Phytophthora* species. *Progress in Plant Protection* 47: 224–234. DOI 10.14199/ppp-2015-011.
- Riddell C.E., Frederickson-Matika D., Armstrong A.C., Elliot M., Forster J., Hedley P.E., Morris J., Thorpe P., Cooke D.E., Pritchard L., Sharp P.M., Green S. 2019. Metabarcoding reveals a high diversity of woody host-associated *Phytophthora* spp. in soils at public gardens and amenity woodlands in Britain. *PeerJ* 7: e6931. DOI 10.7717/peerj.6931.
- Rozporządzenie 2009. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady 1107/2009/WE z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin (Dz.U. L 309 z 24.11.2009, art. 55).
- Schena L., Duncan J.M., Cooke D.E.L. 2008. Development and application of a PCR-based ‘molecular tool box’ for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57(1): 64–75. DOI 10.1111/j.1365-059.2007.01689.x.
- Schena L., Hughes K.J.D., Cooke D.E.L. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* 7(5): 365–379. DOI 10.1111/j.1364-3703.2006.00345.x.
- Van’t Klooster J.W., van den Berg-Velthuis G., van West P., Govers F. 2000. *Tef1*, a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 α . *Gene* 249: 145–151. DOI 10.1016/S0378-1119(00)00151-7.
- Vettraino A.M., Bonants P., Tomassini A., Bruni N., Vannini A. 2012. Pyrosequencing as a tool for the detection of *Phytophthora* species: error rate and risk of false Molecular Operational Taxonomic Units. *Letters in Applied Microbiology* 55(5): 390–396. DOI 10.1111/j.1472-765x.2012.03310.x.
- Villa N.O., Kageyama K., Asano T., Suga H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* 98: 410–422. DOI 10.3852/mycologia.98.3.410.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 315–322. DOI 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.
- Yang M., Duan S., Mei X., Huang H., Chen W., Liu Y., Guo C., Yang T., Wei W., Liu X., He X., Dong Y., Zhu S. 2018. The *Phytophthora cactorum* genome provides insights into the adaptation to host defense compounds and fungicides. *Scientific Reports* 8: 6534. DOI 10.1038/s41598-018-24939-2.
- Yang X., Hong C. 2018. Differential usefulness of nine commonly used genetic markers for identifying *Phytophthora* species. *Frontiers in Microbiology* 9: 2334. DOI 10.3389/fmicb.2018.02334.
- Yang X., Tyler B.M., Hong C. 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus* 8(2): 355–384. DOI 10.5598/imafungus.2017.08.02.09.

Authors’ contributions

K.S. – concept, experiment, analysis of results, text editing; T.O. – concept, text editing; K.K. – experiment, analysis of results, text editing; J.A.N. – concept, analysis of results, text editing; T.M. – analysis of results, text editing.