

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do oceny laboratoryjnej na obecność grzyba *Godronia cassandrae*

Testowane rośliny: Borówka wysoka - *Vaccinium corymbosum* L.

Termin pobierania prób:

Ocenę polową – wizualną przeprowadza się w miejscu wytwarzania materiału szkółkarskiego: elitarnego w stopniu przedbazowym oraz elitarnego w stopniu bazowym – dwa razy w roku, i raz w roku w miejscu wytwarzania materiału kwalifikowanego i CAC. Szkółkarski materiał roślinny powinien być uznany za wolny lub praktycznie wolny od *Godronia cassandrae* na podstawie wyników oceny wizualnej (Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia z 31 marca 2017 r. w sprawie szczegółowych wymagań dotyczących wytwarzania i jakości materiału szkółkarskiego; Dz.U. 2017 poz. 757 z późniejszymi zmianami). Oceny pędów na okoliczność wystąpienia objawów powodowanych przez *G. cassandrae* najlepiej wykonać wiosną, w okresie od ruszenia wegetacji do kwitnienia i/lub wczesną jesienią, przez okresem przebarwiania się liści. W przypadku wątpliwości podczas inspekcji wizualnej materiału szkółkarskiego, z roślin należy pobrać próby pędów i poddać ocenie laboratoryjnej na obecność *G. cassandrae*.

Wybór tkanki/części rośliny:

Grzyb *G. cassandrae* jest sprawcą choroby zwanej zgorzelą pędów borówki wysokiej. Pierwsze objawy choroby są zwykle widoczne latem, w postaci charakterystycznych nekroz, przypominających wyglądem tarczę strzelecką, otoczonych czerwono-purpurową obwódką. Do infekcji 1-2-letnich pędów najczęściej dochodzi wczesną jesienią; wówczas wokół miejsc wniknięcia patogena, powstają eliptyczne wodniste plamy, które z czasem czerwienieją. W kolejnym sezonie, wiosną i latem plamy powiększają się często obejmując cały obwód pędu. Nekrozy na pędach mogą sięgać 10 cm długości, niekiedy obejmują także szyjkę korzeniową, co powoduje zamieranie całego krzewu. Kora w miejscu nekroz staje się srebrzystoszara, pęka i łuszczy się, a na jej powierzchni pojawiają się drobne, czarne struktury zarodnikotwórcze grzyba (owocniki stadium konidialnego grzyba – tutaj: piknidia). Latem, ze względu na panujące wysokie temperatury, liście na porażonych pędach

szybko wędną i z czasem przebarwiają się na czerwono lub brązowo, wyróżniając porażone pędy na tle zdrowych zielonych pędów. Grzyb wnika do pędów najczęściej przez blizny poliściowe oraz naturalnie występujące pęknięcia na pędach, a także przez uszkodzenia mechaniczne skórki lub kory. **W przypadku zaobserwowania uwodnionych lub nekrotycznych zmian na niezdrewniałych pędach, z tendencją do szarzenia, pękania i łuszczenia się tkanek w miejscu zmian, zlokalizowanych wokół śladów poliściowych, uszkodzeń mechanicznych i/lub pęknięć kory szczególnie u podstawy młodych pędów, należy pobrać fragmenty pędów z opisanymi zmianami z uwzględnieniem kilku – kilkunastocentymetrowego zapasu i poddać je badaniom laboratoryjnym.**

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu prób należy kierować się następującymi zasadami:

1. W pierwszej kolejności należy pobrać próbę z niezdrewniałego pędu z uwodnioną lub zgorzelową nekrozą zlokalizowaną koncentrycznie względem spodziewanych miejsc wniknięcia grzyba (tj. blizny poliściowe, uszkodzenia). Należy zwrócić uwagę na nekrozy przypominające wyglądem centrum tarczy strzeleckiej, z wyraźną ciemniejszą obwódką, a także, w przypadku starszych nekroz, na obecność czarnych owocników na obumarłej srebrzystoszarej tkance roślinnej.
2. Jedna próba powinna pochodzić z jednej rośliny, oznakowanej w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację zainfekowanych roślin.
3. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) roślin, z których pobrano próby, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.
4. Próby należy pobrać do trwale oznakowanych torebek foliowych i zabezpieczyć przez ich zamknięcie. W przypadku wyższych temperatur (powyżej 25°C) zaleca się umieszczenie prób w tzw. lodówce turystycznej, pojemniku styropianowym albo "torbie na mrożonki" z wkładem chłodzącym. Nie dopuszczać do zamrożenia prób!
5. Pobrane próby przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na ich wykonanie (formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa, www.gov.pl/piorin). Dodatkowo należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz pisemną informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu":

Data pobrania próby (dd mm rrrr)	
Dane producenta: <ul style="list-style-type: none">• Imię i nazwisko• Adres kontaktowy• Telefon• Adres e-mail	

Adres plantacji	
Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: pędy)	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobierano próby	
Dodatkowe informacje dotyczące m.in. występowania podejrzanych symptomów, chorób, szkodników lub rozpoznanych źródeł infekcji w pobliżu badanych roślin	

Metody laboratoryjne badania obecności *Godronia cassandrae*

Po dostarczeniu do laboratorium, próby umieścić w temperaturze (+4°C do +10°C). Mogą być one przechowywane w warunkach chłodni maksymalnie przez okres kilku dni.

Badania pod kątem obecności patogena w materiale roślinnym można przeprowadzić dwutorowo: (1) wykrywanie bezpośrednio w porażonym materiale i (2) izolacja na pożywki agarowe, a następnie identyfikacja na podstawie morfologii grzybni oraz reakcji PCR.

(1). Wykrywanie grzyba bezpośrednio w porażonym materiale – test w wilgotnej komorze. W przypadku widocznej nekrozy z obecnymi piknidiami, próby należy umieścić w komorach z wilgotną bibułą filtracyjną. Fragmenty pędów (dł. 5–7 cm), zawierających tkanki zdrowe oraz chorobowo zmienione, należy przemyć wodą destylowaną, a następnie inkubować w wilgotnych komorach w temperaturze 22–25°C i warunkach naprzemiennego światła i ciemności (12h/12h). W ciągu kilku - kilkunastu godzin z piknidiów wycieka szary lub szarokremowy śluz, stanowiący skupienie zarodników konidialnych. W celu obserwacji morfologii zarodników należy pobrać kroplę z zarodnikami za pomocą sterylnej igły i umieścić ją w kropli wody destylowanej na szkiełku podstawowym. Następnie przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzeć pod mikroskopem świetlnym. Niezależnie, zarodniki powinny zostać naniesione w rozcieńczeniach na pożywkę agarową (np. PDA) w celu zaindukowania wzrostu kultur grzyba.

(2). Izolacja grzyba na podłoża mikrobiologiczne, identyfikacja na podstawie morfologii oraz testów PCR.

(a) Materiał roślinny (pędy) wykazujący objawy należy pokroić sterylnym nożem na kawałki 1–2 cm. Materiał należy przepłukać sterylną wodą, a następnie zanurzyć na 1 min w 2% roztworze NaOCl i ponownie przemyć sterylną wodą. Po wysuszeniu pocięte fragmenty roślin należy umieścić na pożywce mikrobiologicznej zestalonej. Zalecane pożywki do obserwacji wzrostu *G. cassandrae* to: PDA oraz standardowa pożywka brzezkowa MA. Kultury początkowo są białawe, z czasem stają się oliwkowo lub żółto-zielone. Na starszych kulturach (ok. 2 miesiące) mogą tworzyć się piknidia.

Morfologię charakterystycznych struktur zarodnikotwórczych oraz zarodników grzyba *G. cassandrae* opisano w literaturze (Strømeng i Stensvand, 2011; oraz odnośniki).

(b) Test PCR. Do izolacji kwasów nukleinowych, zarówno z czystych kultur grzyba, jak i materiału roślinnego z wyraźnymi objawami choroby, można wykorzystać komercyjne zestawy, jak np. GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx). W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta. Z uzyskanym DNA grzyba należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami ITS 1 : 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' oraz ITS4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (White et al., 1990, stężenia reagentów i profil termiczny reakcji tamże), a następnie odczytać sekwencję uzyskanego produktu i porównać ją z wynikami dostępnymi w bazie sekwencji GenBank dla *G. cassandrae*.

Literatura:

1. Polashock, J. J., Caruso, F. L., Averill, A. L., Schilder, A., & Press, A. P. S. (Eds.). (2017). Compendium of blueberry, cranberry, and lingonberry diseases and pests. Second Edition, APS Press, American Phytopathological Society; pp 23-24.
2. Strømeng, G. M., & Stensvand, A. 2011. Godronia Canker (*Godronia cassandrae* f. sp. *vaccinii*) in highbush blueberry. The European Journal of Plant Science and Biotechnology, 5 (Special Issue 1), 35-41.
3. White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (ed.) Academic Press, San Diego, CA.: 315-322.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

MA = Malt Agar = agarowa pożywka z ekstraktem maltozowym

PDA = Potato Dextrose Agar = agarowa pożywka glukozowo-ziemniaczana

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

Opracowanie: dr Monika Michalecka, e-mail: monika.michalecka@inhort.pl