

**Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego
do oceny laboratoryjnej na obecność
grzyba *Neofabraea alba* (*N. vagabunda* wg
<https://www.speciesfungorum.org>)**

Rośliny testowane: **Jabłoń – *Malus* Mill., Grusza – *Pyrus* L., Pigwa –
Cydonia oblonga Mill.**

Termin pobierania prób:

Materiał roślinny powinien być wolny od *N. alba* na podstawie wyników wizualnej oceny polowej. Dopuszczalny próg tolerancji w przypadku materiału roślinnego, na każdym etapie jego produkcji, wynosi 0% roślin wykazujących objawy chorobowe w danej partii ocenianego materiału (Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2019/2072 z dnia 28 listopada 2019 r.)

Próby do badań na obecność patogena w materiale roślinnym należy pobierać raz w roku, wiosną (V-VI) lub jesienią (IX-X), przed nastaniem długotrwałych wysokich lub niskich temperatur powietrza.

Wybór tkanki/części rośliny:

Objawy chorobowe widoczne są najczęściej na rocznych lub dwuletnich pędach, czasem także na pniach w postaci eliptycznych, wydłużonych i nekrotycznych plam powstałych wokół ran stanowiących miejsca infekcji. Zmiany chorobowe powstają zazwyczaj w miejscach po oderwanych liściach, wyciętych pędach oraz wokół innego rodzaju uszkodzeń mechanicznych np. w czasie szczepienia, okulizacji lub po intensywnym opadzie gradu. W miejscu porażenia kora zmienia zabarwienie na jasnobrunatne, tkanki zamierają i zapadają się aż do drewna. Grzyb zimuje saprotroficznie na obumarłej korze lub w formie pasożytniczej w ranach zgorzelowych, gdzie pojawiają się czarne, drobne łoża – acerwulusy o wymiarach 0,4-0,8 mm, z których wyciekają szarobiałe lub kremowe skupienia zarodników konidialnych. Zarodniki konidialne są jednokomórkowe, bezbarwne, słabo lub silnie zakrzywione, z końcami zaokrąglonymi lub nieco spiczastymi, o średnich wymiarach 2-4 x 14-30 µm.

W przypadku wyraźnie widocznych zmian chorobowych, należy pobrać fragment rośliny zawierający porażoną tkankę i przeprowadzić izolację patogena na pożywki mikrobiologiczne. W celu identyfikacji patogena stosuje się metody klasyczne oraz techniki biologii molekularnej.

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu prób należy kierować się następującymi zasadami:

1. W pierwszej kolejności należy pobrać próbę fragmentu pędu z nekrozą powstałą wokół śladów po liściach lub wokół uszkodzenia mechanicznego (w miejscu wycięcia pędu, szczepienia, okulizacji lub uszkodzeń po gradzie).
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! 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.
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	

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności *N. alba*

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 na obecność patogena w porażonym materiale roślinnym można przeprowadzić w dwóch etapach: (1) izolacja na pożywkach mikrobiologicznych; (2) identyfikacja na podstawie morfologii i/lub testów PCR.

(1) W celu izolacji patogena na pożywkę, powierzchnię pędów z objawami nekroz i zgorzeli zdezynfekować 70% etanolem. W warunkach aseptycznych z pogranicza zdrowej i chorej tkanki pobrać drobne fragmenty i przenieść na szalki Petriego z pożywką stałą (zalecane PDA – ziemniaczano – glukozowa, bądź OA – pożywka owsiana). Po 7 dniach inkubacji w temperaturze 20–25°C (optimum ok. 22°C) można obserwować wzrost kultur grzybów.

(2) Należy przeprowadzić ocenę morfologii kultur oraz – jeżeli będą obecne – zarodników konidialnych grzybów (tj. makrokonidiów i mikrokonidiów) i porównać z charakterystyką opisaną dla *N. vagabunda* lub *Phlyctema vagabunda* przez Chen i wsp., 2016; pozwalającą na wstępną klasyfikację uzyskanych kultur do rodzaju *Phlyctema/Neofabraea*. Jeżeli nie można dokonać oceny morfologii zarodników (np. nie są wytwarzane w danej kulturze) lub identyfikacja do gatunku na podstawie obserwowanych cech morfologicznych jest niejednoznaczna, należy uzupełnić proces diagnostyczny o techniki biologii molekularnej, jak np. sekwencjonowanie fragmentu DNA zawierającego fragment genu markerowego beta-tubuliny, z wykorzystaniem starterów F- β tub3 i F- β tub4r (Einax i Voigt, 2003) lub przeprowadzenie reakcji multiplex PCR (oraz analizę produktów reakcji na żelu agarozowym (Michalecka i wsp., 2016), według warunków reakcji i elektroforezy opisanych w niniejszej publikacji. Do izolacji kwasów nukleinowych z kultur aksenicznych patogena można wykorzystać komercyjne zestawy, jak np. GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx), stosując się do zaleceń producenta. W przypadku zastosowania techniki odczytu sekwencji regionu beta-tubuliny, odczytaną sekwencję należy porównać z wynikami dostępnymi w bazie danych GenBank dla *N. alba/P. vagabunda*.

Literatura:

1. Amaral Carneiro G., Walcher M., Storti A., Baric S. 2022. Phylogenetic Diversity and Phenotypic Characterization of *Phlyctema vagabunda* (syn. *Neofabraea alba*) and *Neofabraea kienholzii* Causing Postharvest Bull's Eye Rot of Apple in Northern Italy. *Plant Dis.* 106(2):451-463.
2. Chen, C., Verkley, G. J., Sun, G., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2016). Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezicula*, and related genera. *Fungal Biology*, 120(11), 1291-1322.
3. Einax, E., & Voigt, K. (2003). Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(3), 185-194.
4. Michalecka M., Bryk H., Poniawska A., Seliga P., Puławska J. 2016. Identification and characterization of *Neofabraea* fungi causing bull's eye rot on apple in Poland. *Acta Hort.* 1144, 183-188.
5. Michalecka M., Bryk H., Poniawska A., Seliga P., Puławska J. 2016. Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. *Plant Pathology*, 65, 643-654.
6. Vukotić J., Stojšin V., Nagl N., Petreš M., Hrustić J., Grahovac M., Tanović B. 2022. Morphological, Molecular, and Pathogenic Characterization of *Neofabraea alba*, a Postharvest Pathogen of Apple in Serbia. *Agronomy* 2022, 12, 2015.
7. Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests. 2014. The American Phytopathological Society. Wydanie drugie s. 218.

Opracowanie: dr Agata Broniarek-Niemiec e-mail: agata.broniarek@inhort.pl
dr Monika Michalecka, e-mail: monika.michalecka@inhort.pl