

**Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego
do oceny laboratoryjnej na obecność
grzyba *Verticillium albo-atrum***

**Rośliny testowane: Jabłoń – *Malus* Mill., Grusza – *Pyrus* L.,
Pigwa – *Cydonia oblonga* Mill. i wybrane gatunki
z rodzaju *Prunus***

Termin pobierania prób

Oceny polowej materiału szkółkarskiego wszystkich kategorii dokonuje się raz w roku w terminie umożliwiającym sprawdzenie wymagań w zakresie wytwarzania i jakości. W przypadku podejrzenia występowania *Verticillium albo-atrum* lub gdy obserwowane objawy nie są jednoznaczne, należy pobrać próby i dokonać oceny laboratoryjnej na obecność tego grzyba (wg. Rozporządzenia 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). Próby ze zdrewniałych organów nadziemnej części drzew powinny być pobrane do badań diagnostycznych możliwie najwcześniej, tj. bezpośrednio po zauważeniu objawów chorobowych w okresie maj - lipiec. W tym celu w okresie wegetacji zalecane jest prowadzenie systematycznych lustracji sadów zraźnikowych, mateczników podkładek wegetatywnych oraz szkółek podkładek jabłoni (*Malus* Mill.), gruszy (*Pyrus* L.), pigwy (*Cydonia oblonga* Mill.) i wybranych gatunków z rodzaju *Prunus* (śliwy, brzoskwini i moreli).

Wybór tkanki/części rośliny:

Patogen może żyć zarówno jako saprofit w postaci grzybni wegetatywnej i nietrwałych zarodników konidialnych w glebie. Do porażenia roślin może dochodzić

przez uszkodzone włósniki bez kutikuli, z których grzybnia zasiedla wiązki przewodzące roślin zaburzając pobieranie wody i powodując chorobę systemu naczyniowego drzew, zwaną również tracheomykozą. W przypadku drzew owocowych należących do rodziny różowatych (do której należy m.in. jabłoń), charakterystycznym objawem tej choroby jest więdnienie liści na długopędach w połowie lata. Liście najczęściej nie odzyskują wigoru i zamierają, a w sytuacji szybkiego ich obumierania zasychają i pozostają na drzewach jeszcze przez kilka tygodni. Więdnięcie liści może występować na całym drzewie, jednej ze stron lub jedynie na wycinku korony, tj. na kilku gałęziach znajdujących się nad sobą lub nawet tylko na jednej gałęzi drzewa, w zależności od skali porażenia. Na przekroju poprzecznym, po przecięciu pnia, gałęzi lub drobniejszych gałązek, przebarwienie drewna w postaci jasnobrązowych plam o nieregularnym kształcie, z czasem łączących się w pierścień wyraźnie ciemniejszej tkanki, świadczy o wystąpieniu wertycyliozy. W przypadku łagodnych infekcji przebarwienie drewna może wystąpić przy braku jakichkolwiek objawów na liściach.

W przypadku gatunków z rodzaju *Verticillium* przyjmuje się, że ich jednostki propagacyjne występują na plantacjach nierównomiernie, w skupieniach.

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu prób należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. W pierwszej kolejności należy pobrać fragmenty pędów, zwracając szczególną uwagę na charakterystyczne objawy wertycyliozy w postaci więdnienia liści, pojawiające się najczęściej na rocznych pędach.
2. We wstępnej fazie rozwoju choroby lub przy łagodnym jej przebiegu, objawy w postaci więdnienia liści mogą być niewidoczne. Wówczas próby należy pobierać w sposób losowy, zwracając baczną uwagę na wygląd przekroju poprzecznego pobieranych pędów.
3. W przypadku podejrzenia występowania *V. albo-atrum* należy pobrać próby z gałęzi lub pni drzew. Charakterystyczne objawy mogą być widoczne w postaci jasnobrązowych plam lub wyraźnych pierścieni, na przekroju pnia.
4. Bezpośrednio po pobraniu, każdą z prób należy dokładnie opisać używając do tego celu etykiet i wodoodpornego mazaka. Następnie pobrany materiał roślinny należy zapakować do oznakowanej torby foliowej lub pojemnika. Próby należy zabezpieczyć także przed przegrzaniem. 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. Miejsce pobrania próby (zdrewniałych pędów drzew) powinno być identyfikowalne, dzięki precyzyjnemu oznaczeniu rośliny, z której pobrano materiał oraz zaznaczeniu tego miejsca na planie kwatery. Pobrane próby przekazać do badań laboratoryjnych

załączając zlecenie na ich wykonanie (formularz dostępny na stronie internetowej Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa, piorin.gov.pl). 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 badania obecności *V. albo-atrum*

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

Obecność grzyba można potwierdzić lub wykluczyć badając dostarczony materiał roślinny.

W przypadku dostarczenia zdrewniałych fragmentów pędów, z miejsc na ich przekroju poprzecznym, w których widoczne są zmiany chorobowe w tkankach przewodzących, należy pobrać cienkie fragmenty drewna. Następnie pobrane skrawki należy pociąć sterylnym skalpelem na kawałki o długości ok. 5-10 mm, zanurzyć na 1 min w 70 % etanolu, przepłukać sterylną wodą, osuszyć w pobliżu płomienia palnika i wyłożyć na stałe podłoże do hodowli mikroorganizmów, np. PDA (agar ziemniaczano-dekstrozowy) lub PLYA (agar śliwkowy z laktozą i ekstraktem drożdżowym) (standard PM 7/78 (1), EPPO 2007). Inkubować w temperaturze pokojowej przez około 10-14 dni do momentu zaobserwowania wzrostu kolonii grzybów. Wyrosłe kultury należy przeszczepić na czyste podłoże i ocenić morfologię grzybni, w poszukiwaniu cech umożliwiających klasyfikację grzybów do gatunku *V. albo-atrum*, lub przynajmniej do rodzaju (Smith, 1965).

W przypadku wątpliwości dla uzyskanych kolonii należy przeprowadzić identyfikację w oparciu o metody biologii molekularnej. W tym celu należy wyizolować kwas nukleinowy grzyba, wykorzystując np. komercyjny zestaw GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx) i stosując się do zaleceń producenta. Z uzyskanym DNA grzyba należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami uniwersalnymi dla grzybów ITS1 i ITS 4 (White i in., 1990), a następnie odczytać sekwencję uzyskanego produktu i porównać ją z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank. Dostępne są również startery oznaczone jako 2. i 3., specyficzne dla gatunku *V. albo-atrum* (Carder i in., 1994), które umożliwiają amplifikację izolatów tego grzyba z wszystkich roślin żywicielskich, za wyjątkiem lucerny (alfaalfa), a następnie produkty reakcji poddać rozdzielni elektroforetycznemu w 1,5 % żelu agarozowym i wizualizacji w świetle UV.

W przypadku diagnozowania obecności *V. albo-atrum* nie ma obecnie dostępnych metod pozwalających na skuteczne wykrywanie tego patogena w glebie. Dostępne metody wykrywania grzybów z rodzaju *Verticillium* w glebie polegają na zliczaniu mikrosklerocjów, jednakże gatunek *V. albo-atrum* w warunkach naturalnych nie tworzy tego typu organów przetrwalnikowych.

Literatura:

OEPP/EPPO (2007) EPPO Standard PP 7/78 (1) *Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae* na chmielu. Biuletyn OEPP/EPPO 37, 528-535.

Smith, H. C. (1965). The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, and *V. tricorpus*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 8 (3), 450-478.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18 (1), 315-322.

Opracowanie: dr Sylwester Masny, e-mail: sylwester_masny@inhort.pl;

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