

Co w glebie „piszczy”?

Szybka diagnostyka czynników patogennych w szkółkach leśnych jest dziś możliwa do przeprowadzenia na podstawie analiz DNA.

Analiza sekwencji DNA patogenów w kapilarnym sekwenatorze w Laboratorium Biologii Molekularnej IBL



Konieczność **zastosowania integrowanej ochrony szkótek**, nałożona przez przepisy prawa (**ramka**), powoduje, że poszukiwane są alternatywne metody, pozwalające uzyskać wysoką jakość materiału szkółkarskiego.

Integrowana ochrona roślin

Nowe przepisy, zalecające stosowanie metod alternatywnych w stosunku do pestycydów, zostały uprawomocnione zarządzeniami prawnymi Komisji Europejskiej (art. 14 Dyrektywy 2009/128/WE oraz Rozporządzeniem Integrowana ochrona szkótek leśnych nr 1107/2009 i Rozporządzeniem nr 546/2011, dotyczącymi integrowanej ochrony roślin przed szkodnikami) oraz krajowymi przepisami ustawy z 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin (Dz.U. poz. 455) oraz rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 18 kwietnia 2013 r. w sprawie wymagań integrowanej ochrony roślin (Dz.U. poz. 505).

Unikanie infekcji roślin przez patogeny

Wysiewanie lub wysadzanie roślin odpornych na patogeny może być tanim i przyjaznym dla środowiska sposobem hodowli roślin w szkółkach. Zmniejszenie lub zaniechanie stosowa-

nia pestycydów w szkółkach leśnych pozwala zaoszczędzić zarówno środki finansowe, jak i środowisko naturalne. Jest to zgodne nie tylko z zasadami zapisanymi w międzynarodowej konwencji o ochronie różnorodności biologicznej (CBD), ale również z wprowadzoną do polskich lasów certyfikacją (np. FSC). Jednak aby nie dopuścić do zaistnienia infekcji, trzeba poznać patogeny oraz rośliny, jakie atakują. W szkółkach takie możliwości stwarzają metody analiz DNA próbek gleby i roślin, dzięki nim ujawnione zostaną kwatery, na których stwierdzono patogeny roślin. Testy patogeniczności pozwalają z kolei stwierdzić, jakie gatunki roślin są na nie podatne, a jakie odporne.

Dodatkowo testy DNA wody używanej do podlewania mogą potwierdzić, że jest ona wolna od fitopatogenów, a jeżeli nie, to będzie wymagać przefiltrowania przed użyciem. Warto zaznaczyć, że fungicydy stosowane w szkółkach nie leczą roślin zaatakowanych przez łęgniowce (*Phytophthora*, *Pythium*), lecz tylko maskują rozwój choroby. Gdy chore sadzonki zostaną wysadzone na uprawy lub do drzewostanów leśnych, z reguły przestajemy panować nad dalszym rozprzestrzenianiem się patogenów w środowisku, stąd tak niezmiernie ważne jest prowadzenie systematycznej kontroli w szkółkach.

Nowe możliwości ochrony szkótek

Analiza DNA umożliwia precyzyjną i szybką identyfikację patogenicznych gatunków grzybów, zwłaszcza gdy jest ona trudna do wyko-

nania na podstawie cech morfologicznych. Częsteczką kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) są nośnikami informacji genetycznej (kodu genetycznego), określającej wszystkie cechy strukturalne i funkcjonalne danego organizmu. Precyzyjny układ kombinacji czterech par zasad nukleinowych: A – adeniny, T – tyminy, C – cytozyny i G – guaniny stanowi unikalny zapis informacji genetycznej, charakterystycznej dla danego gatunku a nawet osobnika. W celu wykonania analiz diagnostycznych DNA wystarczy pobrać niewielkie próby materiału organicznego (lub gleby czy wody) i przesać do laboratorium. Tam pozyskuje się (ekstrahuje) i analizuje cząsteczki DNA, w celu uzyskania profilu genetycznego danej próbki. Analizy DNA patogenów w próbkach środowiskowych wykonuje Laboratorium Biologii Molekularnej (LBM) Instytutu Badawczego Leśnictwa.

Zagrożenia szkótek przez patogeny

Szkołki hodujące sadzonki gatunków drzew leśnych narażone są na infekcje przenoszone przez glebę, wodę i same sadzonki, często wprowadzane z innych szkótek położonych w Polsce lub Europie.

W jednej ze szkótek leśnych zauważono niepokojące objawy usychania łodyg i więdnienie liści kilkuletnich sadzonek. Mimo podjęcia szeregu prób rozwiązania problemu tradycyjnymi metodami ochrony roślin, nie udało się zaradzić rozprzestrzenianiu sprawcy choroby.



Przykładowe próbki gleby i rośliny (liść, pędy sadzonek) przesyłane ze szkółki do analiz molekularnych, w celu diagnostyki obecności patogenów drzew leśnych

Jako główne źródło zakażeń podejrzewano glebę sprowadzaną z zagranicy.

Aby zdiagnozować problem, LBM IBL w 2015 r. wykonało ekspertyzę na okoliczność występowania DNA patogenów roślin, z określeniem ich gatunku, w oparciu o metody identyfikacji DNA opracowane w IBL. W związku z tym szkółka przekazała do badań diagnostycznych 13 próbek gleby w plastikowych torebkach o pojemności 200 ml. Dziesięć próbek stanowiło glebę pobraną spod hodowanych roślin z różnych miejsc w szkółce, zaś trzy pochodziły z trzech różnych worków importowanego podłoża. Do badań DNA zazwyczaj wystarcza niewielka ilość materiału roślinnego zebranego w terenie (fragment liścia, łodygi, korzenia), o maksymalnych wymiarach 5 x 5 x 5 cm oraz ok. 1 litra wody lub ok. 100 g gleby.

Metody badań prowadzone w LBM

Otrzymane próby gleby zalewano (każdą w odrębnej kuwecie) wodą destylowaną (1–2 cm nad poziomem gleby) i po starannym usunięciu zanieczyszczeń na powierzchni wody wykładano młode, świeże liście dębu i buka – uprzednio umyte pod bieżącą wodą i wysuszone bibułą filtracyjną. Zastosowanie pułapek roślinnych polega na „przywabieniu” do powierzchni liści ruchliwych zarodników (zoospor przemieszczających się za pomocą wici), które powstały w zarodniach patogenów zlokalizowanych w glebie, na skutek zalania wodą kuwet. Młode tkanki roślinne są w ten sposób szybko zasiedlane przez organizmy patogeniczne, których zarodniki unoszą się na powierzchni wody.



Po kilku dniach inkubacji na blaszkach liściowych pojawiły się ciemne nekrozy, których fragmenty pobrano do wyszczepienia na pożywkę selektywną, zawierającą sok warzywny z antybiotykami. Po kilkutygodniowym okresie hodowli w temperaturze 22°C uzyskano czyste kultury patogenów, które poddano analizom molekularnym.

Analiza taka polega na porównaniu sekwencji takiego fragmentu DNA, który precyzyjnie charakteryzuje dany gatunek. W tym celu wyizolowano cząsteczki DNA z tkanek symptomatycznych, które pojawiły się na liściach dębu i buka, po czym poddano je w termocyklerze standardowym procedurom amplifikacji fragmentów DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. PCR) ze starterami ITS1F/ITS4. Analizę sekwencji przeprowadzono w sekwenatorze kapilarnym, a wynik porównano z internetową bazą sekwencji GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Dzięki temu można porównać otrzymane sekwencje z tymi zdeponowanymi w banku genów i w ten sposób określić gatunki patogenów, mających stuprocentowe podobieństwo z tymi, które są obecne w danej próbce.

Szybka diagnostyka patogenów za pomocą DNA

Na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych potwierdzono obecność 15 różnych gatunków organizmów grzybowych w badanych próbkach gleby pobranych ze szkółki leśnej, a mianowicie: pięć gatunków *Pythium* (*Py. dissotocum*, *Py. irregulare*, *Py. spiculum*, *Py. mamillatum*, *Py. torulosum*), trzy gatunki *Calonectria* (*C. morgani*, *C. canadensis*, *C. ilicicola*) oraz: *Fusarium oxysporum*, *Bionectria ochroleuca*, *Penicillium canescens*, *Cylindrocladium clavatum*, *Mucor moelleri* i *Absidia pseudocylindrospora*. Zarówno gatunek grzyba *F. oxysporum*, jak i różne gatunki łęgniowców z rodzaju *Pythium* są znanymi patogenami siewek drzew i krzewów ozdobnych. Gatunki należące do rodzaju *Fusarium* powodują wędnięcie i zgorzel siewek wielu gatunków lasotwórczych, a przede wszystkim

sosny. Atakowane są już kiełkujące nasiona (zgorzel przedwzschodowa) lub szyjki korzeniowe siewek na wysokości zetknięcia z glebą. W wyniku infekcji powstają charakterystyczne przewężenia i siewki przewracają się (zgorzel powschodowa). Często w zamieraniu siewek udział bierze wysoka temperatura gleby w wyniku nasłonecznienia (zgorzel słoneczna).

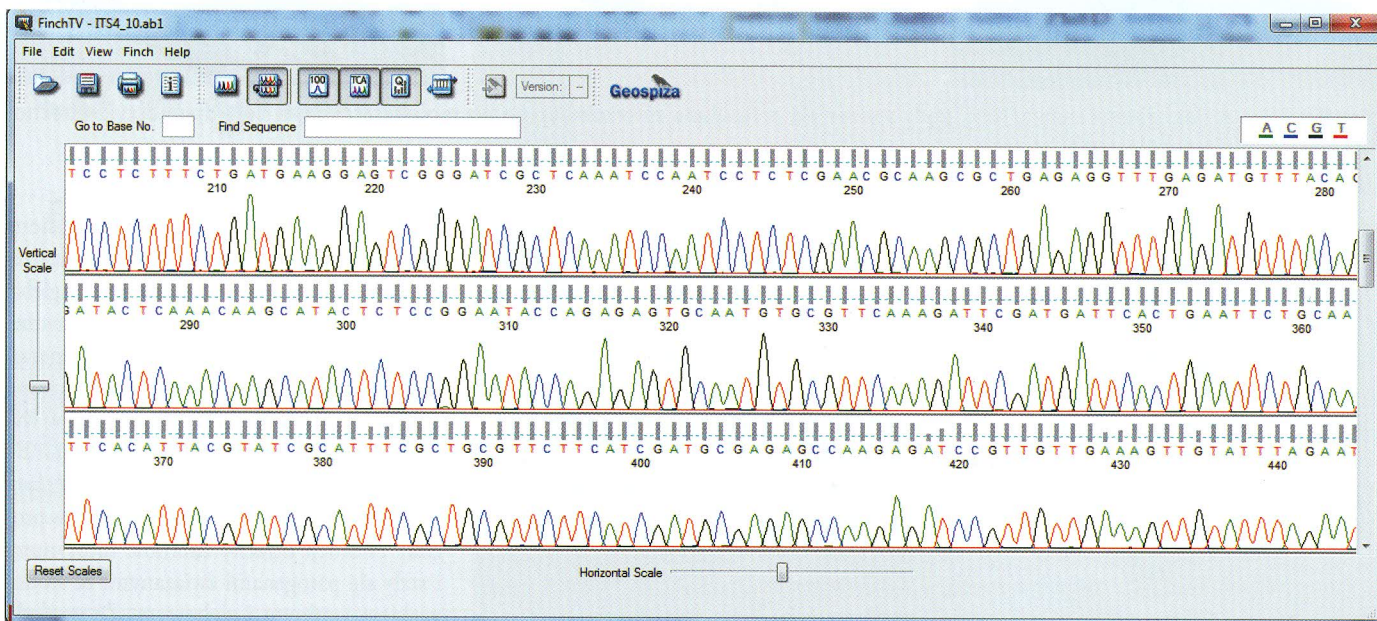
Gatunki z rodzaju *Pythium* i *Phytophthora* należą do łęgniowców *Oomycetes*, które w procesie ewolucji utraciły zdolność fotosyntezy i stały się patogenami związanymi ze środowiskiem wodnym i glebowym. Ze względu na cechy różniące je od grzybów prawdziwych dla tej grupy stworzono oddzielne królestwo *Chromista*. Organizmy te nie są wrażliwe na antybiotyki (tak jak grzyby) i nie posiadają w ścianach komórkowych chityny, dlatego środki grzybobójcze mogą być w ich przypadku nieskuteczne. Z tego względu stwierdzone w glebie szkółki gatunki: *Py. irregulare*, *Py. dissotocum*, *Py. torulosum*, *Py. mamillatum* odpowiedzialne są za uszkodzenia drobnych korzeni (mniejszych niż 2 mm) u wielu hodowanych tam roślin. Na uwagę zasługuje fakt, że *Py. spiculum* (oraz *Py. quercum* i *Py. sterilum*) zostało po raz pierwszy (w 2006 r.) odkryte przez międzynarodowy zespół z udziałem pracowników IBL.

Objawy chorobowe

Stwierdzone w glebie szkółki patogeny stanowią potencjalny rezerwuar zakaźny dla kiełkujących nasion oraz siewek wielu gatunków roślin. Wydzielane przez strzępki patogenów enzymy blokują reakcje obronne roślin i prowadzą w konsekwencji do zamarcia systemów korzeniowych i/lub pędów. Symptomy chorobowe świadczące o obecności patogenu w roślinie to przede wszystkim wędnięcie, przewracanie się i zamieranie, a czasami powstawanie nekrotycznych plam na liściach.

Analizy sekwencji DNA wykonane dla 13 próbek gleby ze szkółki potwierdziły obecność groźnych patogenów: *Pythium irregulare* (w dwóch próbach gleby), *Fusarium oxysporum* (w trzech próbach), *Cylindrocladium clavatum* (w jednej próbce) oraz formy doskonałe grzyba (teleomorfy), należące do rodzaju *Calonectria* (w czterech próbach gleby). Stwierdzenie w glebie szkółki gatunku *Cylindrocladium clavatum* jest nowym doniesieniem i wskazuje ▶

Wyłożone liście dębu i buka na powierzchni wody, którą zalano próbki gleby, w celu pułapkowania (ang. baiting) patogenów



Wynik analizy DNA w laboratorium, wskazujący na obecność *Cylindrocladium clavatum* w badanej próbce gleby. Precyzyjny układ kolejności sekwencji czterech par zasad nukleotydowych A, T, C i G jest niepowtarzalny i charakterystyczny dla każdego gatunku badanego organizmu

na potrzebę podjęcia szczegółowych badań nad znaczeniem grzyba w leśnictwie (ramka).

Przemieszczanie się patogenów

Przenoszenie patogenów wraz z sadzonkami ze szkółek do drzewostanów leśnych stanowi duży problem w wielu krajach Europy. Może to dotyczyć np. gatunków *Fusarium* (*F. solani*, *F. eumartii* i *F. oxysporum*), które mogą być przyczyną zgorzeli, plamistości, więdnienia oraz zamierania roślin o dość gwałtownym przebiegu. Patogeny te często występują u dojrzałych drzew wraz z innymi grzybami, powodując uszkodzenia tkanek kory lub zgniliznę korzeni – ostatnio stwierdzono je w obumarłych pąkach dębów.


Z wcześniejszych badań monitoringowych, które przeprowadzono w 21 szkółkach leśnych i ozdobnych, położonych na terenie 20 nadleśnictw w południowo-zachodniej, wschodniej i centralnej Polski, wynika, że w 14 na 21 analizowanych szkółek leśnych stwierdzono wy-

stępowanie gatunków rodzaju *Phytophthora*. Najczęściej izolowano *P. cactorum* i *P. plurivora*, ale w kilku próbach gleby wykryto również *P. gonapodyides*. Dodatkowo wykonana analiza współzależności pomiędzy miejscem i terminem pobierania prób gleby, gatunkiem rośliny a występowaniem patogenów *Phytophthora* wykazała, że ww. organizmy występują w szkółkach przez cały okres wegetacji, co potwierdzają izolacje wykonane w czerwcu i październiku.

Wg najnowszych danych, opublikowanych przez zespół włoskich badaczy, najwięcej patogenów drzew leśnych z rodzaju *Phytophthora* (ok. 80%) przenoszonych jest przez sadzonki z bryłą korzeniową wraz z przyczepioną do nich glebą. Nic więc dziwnego, że światowy obrót sadzonkami roślin spowodował zawleczenie do Europy wielu nowych, inwazyjnych gatunków szkodników (niciansi, owadów, patogenów grzybowych, łęgniowców, wirusów i bakterii), powodując niespotykane dotychczas zagrożenie europejskich ekosystemów leśnych.

Zalecenia dla praktyki leśnej

Diagnostyka patogenów roślin z wykorzystaniem metod biologii molekularnej jest obecnie uważana za najbardziej wiarygodne i szeroko stosowane narzędzie badawcze, rekomendowane przez międzynarodowe organizacje, takie jak Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin (EPPO) czy Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) oraz Komisję Europejską (DG SANTE). Zastosowanie metod biologii molekularnej w produkcji szkółkarskiej może ułatwić identyfikację patogenów, będących przyczyną wielu chorób. Identyfikacja DNA czynników chorobotwórczych jest możliwa zarówno w zainfekowanych tkankach roślinnych (gdzie umożliwia wykrycie patogenu w fazie latentnej), jak i bezpośrednio w glebie ryzosferowej.

Podsumowując, należy podkreślić, że ocena ryzyka zawleczenia do Europy obcych, inwazyjnych organizmów (wraz z transportem materiału roślinnego) oraz opracowanie skutecznych metod ich wykrywania (ilościowego i jakościowego) są kluczowymi aspektami współczesnej ochrony roślin. Poznanie możliwych dróg przenoszenia obcych organizmów oraz szybkości ich rozprzestrzeniania się, z uwzględnieniem przewidywanych zmian klimatycznych, stanowi podstawę skutecznej ochrony obecnych i przyszłych ekosystemów leśnych. 

Justyna A. Nowakowska
(Laboratorium Biologii Molekularnej, IBL)

Tomasz Oszako
(Zakład Ochrony Lasu, IBL)

Z pola do lasu

Grzyb *Cylindrocladium clavatum* (należący do workowców) nie jest charakterystyczny dla środowiska leśnego, a raczej rolniczego, gdzie uszkadza plantacje ziemniaków, powodując powstawanie raków na bulwach. Występuje także powszechnie w ogrodnictwie, uszkadzając pomidory, paprykę czy tytoń. Na Florydzie izolowano go z chorych (zgorzelowych) korzeni siewek zimozielonych drzew araukarii, eukaliptusów i sosen, może zatem być sprawcą uszkodzenia korzeni i/lub szyi korzeniowych (a czasami nawet plamistości liści) wielu drzew i krzewów. Rodzaj *Calonectria* (stadium niedoskonałe *Cylindrocladium*) został utworzony w 1867 r. na podstawie owocnikowania zaobserwowanego na liściach magnolii.