

## **Zadanie 1.2 Optymalizacja metod wykrywania, monitorowania i zwalczania kwarantannowego nicienia węgorka sosnowca (*Bursaphelenchus xylophilus*) oraz jego wektora – żerdzianki sosnowki (*Monochamus galloprovincialis*) w warunkach środowiskowych Polski**

Kierownik zadania: prof. dr hab. Marek Tomalak

Realizacja zadań zaplanowanych w harmonogramie na rok 2022 objęła badania terenowe i laboratoryjne. Przeanalizowano ok. 160 prób drewna z różnych rejonów kraju – głównie sosny opanowanej przez żerdziankę sosnowką oraz chrząszczy tego owada odłowionych do pułapek feromonowych. Spośród nicieni z rodzaju *Bursaphelenchus* w sosnie najczęściej wykrywano *Bursaphelenchus mucronatus* (główny cel naszych poszukiwań), okazjnie *B. pinophilus* (7 prób) i sporadycznie *B. fraudulentus* (2 próby). Wiosną, pospolicie występował również *B. piniperdae*, którego populacje ginęły w drewnie już w czerwcu, a nieliczne larwy dyspersyjne znajdowano w chrząszczach korników (cetyńców – *Tomicus* spp.). W żadnej z badanych prób nie wykryto obecności kwarantannowego, patogenicznego dla sosny węgorka sosnowca (*B. xylophilus*). U blisko spokrewnionego z grupą 'xylophilus' gatunku *B. tryphloeii* wykryto i opisano proces pasożytnictwa w ciele owada wektora (*Nematology*, 2022). Jest to pierwsze, eksperymentalnie potwierdzenie występowania tego zjawiska u larw dyspersyjnych nicienia z rodzaju *Bursaphelenchus*. W ramach badań nad zmiennością morfologiczną *B. xylophilus* wykazano możliwość przekazywania rzadkiej cechy obecności mukrona do populacji 'typowych' (z szeroko zaokrąglonym ogonem samicy) w wyniku krzyżowania wewnątrzgatunkowego. Obserwacja ta ma istotne znaczenie praktyczne dla prawidłowej identyfikacji morfologicznej tego nicienia, szczególnie na obszarach, gdzie pospolicie występuje rodzimy *B. mucronatus*, który zawsze posiada mukron.

W ramach kontynuacji badań nad scharakteryzowaniem spontanicznego procesu hybrydyzacji międzygatunkowej pomiędzy rodzimym, niepatogenicznym *B. mucronatus* i potencjalnie inwazyjnym *B. xylophilus* wyprowadzono dwie rekombinacyjne linie wsobne hybryd (*Recombinant Inbred Lines* – RIL) pomiędzy *B. xylophilus* x *B. mucronatus* Olsztyn i *B. xylophilus* x *B. mucronatus* Lwówek, prezentujące podobną, wysoką żywotność potomstwa, lecz istotne różnice w zakresie patogeniczności w stosunku do sosny. Kontynuacja indywidualnego krzyżowania pomiędzy rodzeństwem zwiększyła zakres zmienności tej cechy w obrębie potomstwa badanych populacji RIL. Wyniki tych prac sugerują wysoką relatywność znaczenia obserwowanej hybrydyzacji międzygatunkowej dla patogeniczności populacji potomnych nicieni, jak również wskazują na konieczność uwzględniania w dalszych badaniach także innych elementów bionomii obu nicieni, które mogą być istotne dla zdrowia rośliny-gospodarza (tj. sosny).

W bieżącym okresie przeprowadzono badania nad molekularnym wykrywaniem występowania osobników hybryd międzygatunkowych linii rekombinacyjnych (RIL) pomiędzy *B. xylophilus* i *B. mucronatus* w sztucznie inokulowanej sośnie (siewki). Poszczególne fragmenty martwych roślin poddawano ekstrakcji nicieni, a następnie uzyskane ekstrakty wodne, zarówno te, w których stwierdzono obecność żywych nicieni, jak również te, w których wykazywano jedynie ich śladowe pozostałości (m. in. resztki kutikuli) analizowano przy pomocy techniki real-time PCR. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką czułość tej techniki. Umożliwiła ona wykrycie hybryd międzygatunkowych *B. xylophilus* i *B. mucronatus* zarówno we fragmentach roślin, w których fizycznie były obecne nicienie, jak również w tych, w których były jedynie ich resztki i śladowe ilości DNA.

W bieżącym roku molekularnie identyfikowano również nicienie występujące w chrząszczach żerdzianki sosnówki, wektora kwarantannowego nicienia *B. xylophilus* i rodzimego dla Europy *B. mucronatus*. W związku z obserwowanym wcześniej stopniowym zmniejszaniem się częstotliwości występowania nicieni w chrząszczach żerdzianki w czasie okresu ich lotu, badania te prowadzone były przez cały sezon, od czerwca do października. Największą liczbę chrząszczy z nicieniami oraz liczbę nicieni w ich tchawkach stwierdzano na początku sezonu (czerwiec/lipiec). Natomiast, pod koniec sezonu (wrzesień/październik) chrząszcze z nicieniami spotykane były rzadko, lub sporadycznie – najczęściej odławiano chrząszcze bez nicieni. Przeprowadzone badania molekularne przy pomocy reakcji real-time PCR potwierdziły występowanie w chrząszczach jedynie rodzimego gatunku nicienia *B. mucronatus*. Zastosowana, molekularna technika real-time PCR zawsze potwierdzała obecność gatunku *B. mucronatus* w przypadku fizycznej obecności larw nicieni w ciele sekcjonowanych chrząszczy (tchawki). Jednakże, brak nicieni w sekcjonowanych chrząszczach na początku sezonu zawsze dawał negatywny wynik reakcji, gdy zaś pod koniec sezonu real-time PCR materiału ekstrahowanego chrząszczy pozbawionych nicieni generował wynik negatywny, lub pozytywny. Otrzymany tutaj pozytywny wynik reakcji może świadczyć o wcześniejszej obecności nicieni w badanych owadach, które w trakcie żeru dojrzewającego i/lub składania jaj przez wektora opuściły jego ciało, a pozostawione śladowe resztki ich kutikuli, lub innych fragmentów generowały pozytywny wynik. Obserwacje te potwierdzają bardzo wysoką czułość techniki real-time PCR i jej potencjalnie istotną przydatność do wykrywania rzeczywistej obecności żerdzianki sosnówki w drzewostanie.

W bieżącym sezonie przeprowadzono również serię doświadczeń terenowych mających na celu wyjaśnienie sygnalizowanego w ubiegłym roku zjawiska występowania nicienia *B. mucronatus* w drzewach osłabionych sosen, bez żerowisk żerdzianki sosnówki. Przeprowadzone prace wykazały, że w tych drzewach obecność *B. mucronatus* zawsze związana była z występowaniem żerowisk tycza mniejszego (*Acanthocinus grisseus*). Analiza sekcyjna odłowionych do pułapek feromonowych chrząszczy tego gatunku potwierdziła obecność (stosunkowo nielicznych) larw dyspersyjnych *B. mucronatus* w tchawkach i pod pokrywami tego owada. *A. grisseus* był wcześniej wykazywany, jako potencjalny wektor *B. xylophilus* w Japonii. Wyniki naszych obecnych badań są pierwszymi w Europie

wykazującymi związek *B. mucronatus* z *A. griseus*, a w połączeniu z wcześniejszymi doniesieniami z Japonii mogą sugerować potencjalny udział drugiego (po żerdziance sosnowce) wektora w rozprzestrzenianiu patogenicznego *B. xylophilus* w Europie.