

## **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: prof. dr hab. Marek Tomalak

Głównym celem prowadzonych badań było poszukiwanie i testowanie nowych rozwiązań zwiększających skuteczność, szybkość i wiarygodność metod wykrywania, monitorowania i zwalczania węgorka sosnowca (*B. xylophilus*) oraz jego wektorów.

Realizacja zadań 2023 roku objęła badania terenowe i laboratoryjne. Przeanalizowano 142 próby drewna z różnych rejonów kraju – głównie sosny opanowanej przez żerdziankę sosnowką i inne saproksylofagi oraz chrząszczy tych owadów odłowionych do pułapek feromonowych. Najczęściej wykrywano nieszkodliwy gatunek nicienia *B. mucronatus*, który jest najbardziej zbliżony do kwarantannowego *B. xylophilus*. Materiał ten stanowi uzupełnienie dotychczasowych informacji o zmienności genetycznej populacji *B. mucronatus* w Polsce. Drugim, mogącym sporadycznie występować w sośnie był *B. fraudulentus*. Izolowano również gatunki *Bursaphelenchus* z innych grup typologicznych, m.in. *B. piniperdae* i *B. pinophilus*. W żadnej z badanych prób drewna i chrząszczy żerdzianki nie wykryto obecności kwarantannowego, patogenicznego dla sosny węgorka sosnowca (*B. xylophilus*).

W ramach prac nad zwiększeniem precyzji identyfikacji *B. xylophilus* oraz rodzimego *B. mucronatus* kontynuowano badania nad wiarygodnością metody morfologicznej, szeroko wykorzystywanej przez służby fitosanitarne na świecie. Dzięki włączeniu do badań szczepu *B. xylophilus* Roll, zawierającego markerową mutację *Bxy-rol(tom3)* (Tomalak i Filipiak, 2019) oraz innych populacji tego gatunku (US10 i Nanjing), które podobnie jak *B. mucronatus* posiadają mukron na końcu ogona samic, przeprowadzono serię krzyżowań diallelicznych i ocenę fenotypów powstających w potomstwie. Badania te jednoznacznie wykazały genetyczny charakter uwarunkowania tej ważnej taksonomicznie cechy morfologicznej i wyjaśniły mechanizm jej dziedziczenia. Raz wprowadzona do populacji *B. xylophilus* cecha „nietypowej” obecności mukrona pozostaje w niej, stopniowo rozprzestrzeniając się na prawie wszystkie osobniki. Wykryta obecnie zależność wyklucza możliwość wiarygodnego odróżnienia tych gatunków na podstawie morfologii.

W ramach kontynuacji badań nad spontanicznym procesem hybrydyzacji międzygatunkowej pomiędzy *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus* wyprowadzono 3 rekombinacyjne linie wsojne hybryd (RIL), różniące się potencjałem reprodukcyjnym, żywotnością oraz patogenicznością w stosunku do siewek sosny. Krzyżówki *B. xylophilus* z *B. mucronatus* Olsztyn-01 i *B. xylophilus* z *B. mucronatus* Lwówek-01 zachowują wysoką płodność i persystencję w następnych pokoleniach, lecz patogeniczność w stosunku do sosny była obserwowana tylko w krzyżówkach z *B. mucronatus* Lwówek-01. Kolejne pokolenia linii hybryd RIL-03

(*B. xylophilus* x *B. mucronatus* Kampinos-01) wykazywały zaś niską stabilność populacji, spowodowaną słabą reprodukcją i całkowity brak patogeniczności w stosunku do sosny. Przeprowadzone badania wykazały, że krzyżowanie pomiędzy *B. xylophilus* i *B. mucronatus* jest możliwe, jednakże jego skuteczność i konsekwencje mogą być uzależnione od genotypu lokalnego partnera (*B. mucronatus*). Spośród 3 badanych genotypów wykrytych na obszarze Polski, genotyp pośredni (europejski + wschodnioazjatycki) może być najbardziej niebezpieczny.

Przez cały okres sprawozdawczy kontynuowano prace nad metodami wykrywania i identyfikacji hybryd międzygatunkowych powstających pomiędzy *B. xylophilus* i rodzimym *B. mucronatus*, które w naturalnych warunkach mogą równocześnie zasiedlać sosnę. Obecność powstających in vitro hybryd potwierdzano na podstawie pojedynczych osobników dorosłych nicieni przy pomocy molekularnych testów PCR ze specyficznymi starterami (Filipiak i wsp. 2017). Po raz pierwszy wykazano równoczesną obecność elementów materiału genetycznego pochodzącego zarówno z *B. xylophilus*, jak i *B. mucronatus* nawet w pokoleniu F16 hybryd tych gatunków.

W celu wyjaśnienia zróżnicowania intensywności prążków DNA specyficznych dla gatunków rodzicielskich w populacjach hybryd międzygatunkowych *B. xylophilus* x *B. mucronatus*, w bieżącym roku wyselekcjonowano serię populacji, dla których w trakcie elektroforezy DNA otrzymywano intensywniejsze prążki specyficzne dla *B. xylophilus* oraz serię z intensywniejszymi prążkami dla *B. mucronatus*. DNA wybranych osobników zostało poddane sekwencjonowaniu. Badania te wykazały, że poszczególne osobniki hybryd charakteryzują się relatywnie różną zawartością materiału genetycznego przodków (*B. xylophilus* i *B. mucronatus*). Skorelowana z wyższą intensywnością prążków wyższa wartość sekwencjonowania („percent identity”) wykazywała większe podobieństwo do sekwencji jednego z gatunków rodzicielskich znajdujących się w bazie GenBank.

W tegorocznych badaniach do identyfikowania *B. xylophilus* i *B. mucronatus* włączono technikę PCR, opracowaną przez Matsunaga i wsp. (2019). Umożliwia ona również różnicowanie populacji gatunku *B. mucronatus* pod względem genotypowym w znacznie prostszy sposób niż czasochłonna PCR-RFLP. Przeprowadzone badania potwierdziły te założenia, lecz wykazały, że metoda ta nie umożliwia wykrywania genotypu pośredniego, do którego należy większość polskich populacji *B. mucronatus*.

Badania chrząszczy żerdzianki sosnowki przeprowadzane przy pomocy techniki real-time PCR wykazały występowanie w ich ciele jedynie rodzimego gatunku *B. mucronatus*. Wykrywa ona nie tylko całe nicienie, lecz również ich pozostałości po wyjściu żywych. Fizycznie nicienie w chrząszczach wykrywane były do połowy września, natomiast technika real-time PCR wykrywała ich śladowe resztki aż do ostatniego odłowu owadów do pułapek feromonowych (połowa października). Opracowana przez nas wcześniej technika real-time PCR została włączona w tym roku przez EPPO do protokołu diagnostycznego: „EPPO. 2023. PM 7/4 (4)

*Bursaphelenchus xylophilus*. EPPO Bulletin, 53, 156–183” jako jeden ze standardów diagnostycznych obowiązujących we wszystkich krajach Europy.

Badania terenowe nad dynamiką lotu żerdzianki sosnówki wykazały wyjątkowość roku 2023 w tym zakresie. W wyniku wysokich temperatur obserwowano intensywny lot chrząszczy nie tylko w czerwcu i lipcu, lecz również we wrześniu. Wydłużenie tego okresu może mieć istotne znaczenie dla skuteczności transmisji nicieni.

Tegoroczne badania w Nadleśnictwie Wronki potwierdziły stałą obecność i pełnienie funkcji wektora *B. mucronatus* (oraz potencjalnie *B. xylophilus*) przez tycza mniejszego (*Acanthocinus griseus*). Nicienie wykrywano zarówno w drewnie opanowanym wyłącznie przez tego owada, jak i w chrząszczach – pod pokrywami i w tchawkach. Jednakże poziom zasiedlenia chrząszczy przez nicienie był znacząco niższy (kilka lub kilkanaście osobników) w porównaniu do transmisji z udziałem żerdzianki sosnówki, gdy w pojedynczym owadzie znajdowano od kilkuset do ponad 1000 nicieni. *A. griseus* był wcześniej wykazywany jako potencjalny wektor *B. xylophilus* w Japonii.