

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

Kierownik: prof. dr hab. Marek Tomalak

Głównym celem badań przeprowadzonych w 2024 r., w ramach zadania było poszukiwanie i testowanie nowych rozwiązań zwiększających skuteczność, szybkość i wiarygodność metod wykrywania, monitorowania i zwalczania węgorka sosnowca (*B. xylophilus*) oraz jego wektorów. W uzupełnieniu niezbędne było przeprowadzenie szeregu wyjaśniających badań podstawowych z zakresu genetyki, morfologii i bionomii tego nicienia oraz jego wektora – żerdzianki sosnówki.

Przeanalizowano ponad 160 próbek drewna sosny zasiedlonej przez żerdziankę sosnówkę oraz chrząszczy tych owadów odłowionych do pułapek feromonowych. Spośród nicieni z rodzaju *Bursaphelenchus* najczęściej wykrywano nieszkodliwy, rodzimy gatunek *B. mucronatus*. Wykazano również częste występowanie *B. piniperdae* i sporadyczne *B. pinophilus* oraz *B. fraudulentus*.

W 2024 r. przeprowadzono szczegółowe badania nad izolowaną w Nadleśnictwie Turek, morfologicznie nietypową populacją *B. mucronatus*. Alarmującą dla Nadleśnictwa było grupowe zamieranie drzew sosny, w których występował ten nicień. Nasze badania molekularne i bionomiczne wykazały, że zamieranie drzew spowodowane zostało nadmiernym przesuszeniem gleby oraz wtórnym zasiedleniem osłabionych drzew przez tycza mniejszego (*Acanthocinus griseus*).

Badania nad charakterystykami nowego izolatu *B. xylophilus* (Jining-01), wykrytego w 2024 r. przez służby graniczne PIORiN wykazały jego podobieństwo morfologiczne do innego szczepu chińskiego (Nanjing). W hodowli in vivo, nicień ten tworzy mukron na ogonie samic. W hodowli in vitro wykazał on jednak znacznie wyższą zdolność reprodukcji niż szczep Nanjing. Badania patogeniczności w stosunku do 4-letnich siewek sosny potwierdziły również wysoką zdolność rozmnażania się w drzewkach sosny oraz ich szybkiego zabijania w temperaturze 20–22°C.

W ramach prac nad zwiększeniem precyzji identyfikacji *B. xylophilus* oraz rodzimego *B. mucronatus* kontynuowano badania nad wiarygodnością metody morfologicznej, nadal szeroko wykorzystywanej przez służby fitosanitarne na świecie. Wykorzystanie w pracach hybrydizacyjnych „typowych” szczepów z szeroko zaokrąglonym zakończeniem ogona samic (Pt67OL, Roller-01) oraz szczepów tworzących mukron wyłącznie w hodowli in vivo (Nanjing, Jining-01), lub tworzących mukron zarówno w warunkach hodowli in vivo, jak i in vitro (US10) pozwoliło prześledzić drogę dziedziczenia zdolności tworzenia mukrona. Następnie, w wariantach porównawczych oceniano charakter i segregację fenotypów hybryd

rozwijających się w kulturach *in vitro*, na podłożu *Botrytis cinerea*/PDA oraz *in vivo* w 4-letnich siewkach sosny zwyczajnej.

Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazały na genetyczny charakter uwarunkowań obecności/braku mukrona na ogonie samic węgorka sosnowca, umożliwiając łatwy transfer obu wariantów tej cechy w obrębie gatunku *B. xylophilus*. Prace te w znacznym stopniu wyjaśniły również mechanizmy dziedziczenia omawianych cech, które istotnie różnią się pomiędzy hybrydami z udziałem szczepów chińskich (Nanjing, Jining-01) i szczepu amerykańskiego (US10). Istotne dla praktyki są dotychczasowe wyniki badań rozprzestrzeniania się omawianych cech w populacjach hybryd na drodze spontanicznego krzyżowania się osobników różnych szczepów *B. xylophilus*. Zależności wykryte w naszych obecnych pracach wykluczają możliwość wiarygodnego odróżnienia *B. xylophilus* od *B. mucronatus* na podstawie morfologii. Opinię tę wspierają również wyniki naszych równoległych badań nad zmiennością genetyczną i morfologiczną w obrębie rodzimych populacji *B. mucronatus*, gdzie wielkość i kształt mukrona prezentują znaczną zmienność, częściowo nakładającą się na zmienność obserwowaną u *B. xylophilus* (Tomalak i Filipiak, 2024).

W ramach badań molekularnych przeprowadzono ocenę skuteczności metod identyfikacji pozwalającą odróżnić żywe osobniki węgorka sosnowca od martwych. Identyfikacja taka jest szczególnie ważna podczas rutynowej, granicznej kontroli fitosanitarnej opakowań drewnianych, wwożonych na teren Unii Europejskiej. Dobrze przeprowadzony zabieg termiczny takich opakowań drewnianych (zgodnie z obowiązującymi ISPM nr 15; FAO 2009) pozwala na skuteczne zabicie wszelkich obecnych w nich organizmów żywych (w tym nicieni). Jednakże, przypadki nieskutecznego wykonania zabiegu termicznego lub wręcz fałszowania oznakowania wymagają szczególnej uwagi. Nawet w przypadku skutecznego zabiegu termicznego pozostawienie w drewnie martwych nicieni może dać fałszywe wyniki pozytywne przy zastosowaniu analiz DNA (DNA nicieni jest obecne zarówno w osobnikach żywych, jak i martwych). W takiej sytuacji, lepszym rozwiązaniem jest analiza RNA, który pozostaje w osobnikach żywych, lecz ulega szybkiej degradacji w organizmach martwych, stając się niewykrywalnym w martwych nicieniach już po kilku dniach od zabiegu termicznego.

Tegoroczne badania przeprowadzono na podstawie techniki molekularnej PCR z wykorzystaniem RNA (Leal i in., 2013). RNA węgorka sosnowca izolowano z prób zawierających różną liczbę (od 1 do 100) jego martwych lub żywych osobników. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały obecność RNA węgorka sosnowca zarówno w żywych, jak i przez kilkudniowy okres po zabiegu, w osobnikach martwych. Podczas tej samej reakcji PCR, otrzymywano również produkty dla DNA *B. xylophilus* o innej długości, co w łatwy sposób umożliwiło odróżnienie RNA od DNA tego gatunku nicienia.

Określano również szybkość zanikania RNA w martwych nicieniach, wykazując możliwość wykrywania RNA w martwych nicieniach do 5 dni po zabiegu termicznym. Wszystkie próby analizowane po 10 dniach wykazały całkowity brak RNA. Przeprowadzono również badania

nad wykrywaniem żywych i martwych nicieni węgorka sosnowca (w liczbie 100 i 500 osobników) ekstrahowanych z drewna, które poddano zabiegowi obróbki cieplnej (56°C w rdzeniu materiału przez 30 min). Przeprowadzona następnie analiza molekularna nicieni wyekstrahowanych z krążków traktowanego termicznie drewna potwierdziła prawidłowość przeprowadzonego zabiegu, gdyż w żadnym przypadku nie wykrywano nicieni. Badania te jednoznacznie wykazały, że analiza nicieni uzyskanych z DMO na podstawie RNA nicieni jest bardziej wiarygodną metodą niż analiza ich DNA.

Przeprowadzono również potwierdzającą analizę molekularną nicieni wykrytych w bieżącym roku przez inspektorów PIORiN, w przesyłce zawierającej drewniane materiały opakowaniowe z Chin. Analiza molekularna (reakcja PCR-RFLP oraz sekwencjonowanie) potwierdziła identyfikację tych nicieni, jako kwarantannowego gatunku *B. xylophilus*.

W minionym okresie sprawozdawczym kontynuowano prace nad metodami wykrywania i identyfikacji hybryd międzygatunkowych powstających pomiędzy *B. xylophilus* i rodzimym, niepatogenicznym *B. mucronatus*, które w naturalnych warunkach mogą równocześnie zasiedlać sosnę. Populacje wybranych wsobnych linii rekombinacyjnych (RIL-01 i RIL-02) pochodzących z indywidualnego krzyżowania *B. xylophilus* × *B. mucronatus*, inokulowano do sosny, a następnie, po ekstrakcji z rośliny, sprawdzano ich status hybryd międzygatunkowych przy wykorzystaniu technik molekularnych. Obecność rozwijających się *in vitro* hybryd potwierdzano na podstawie analizy serii pojedynczych osobników dorosłych nicieni przy pomocy molekularnych testów PCR ze specyficznymi starterami (Filipiak i wsp. 2017). Przeprowadzone badania wykazały, że w pokoleniach F12/13 większość osobników obu serii wybranych linii wsobnych (RIL-01 i RIL-02) nadal prezentowało status hybryd międzygatunkowych, zawierających materiał genetyczny zarówno *B. xylophilus*, jak i *B. mucronatus*. Do tegorocznych badań nad hybrydyzacją międzygatunkową włączono również nową populację *B. xylophilus* (Jining-01). Nasze dotychczasowe wyniki badań molekularnych hybryd powstałych w wyniku krzyżowania tego izolatu z polskimi populacjami *B. mucronatus* wykazały, że część osobników potomnych pokolenia F2/F3 prezentowała status hybryd międzygatunkowych, zawierających materiał genetyczny zarówno *B. xylophilus*, jak i *B. mucronatus*.

Badania terenowe nad dynamiką lotu chrząszczy żerdzianki sosnówki, prowadzone od czerwca do końca października w Nadleśnictwie Wronki wykazały, że liczebność chrząszczy odławianych na powierzchniach praktycznie bez świeżego materiału lęgowego była porównywalna, lub tylko nieznacznie (tj. 10–30%) niższa od tej notowanej na powierzchni po ubiegłorocznej trzebieży. Sugeruje to, że nawet w drzewostanach pozbawionych potencjalnego materiału lęgowego chrząszcze nalatujące z sąsiednich powierzchni odbywają normalne loty monitorujące i choć nie składają jaj, są powszechne i skutecznie odławiają się do pułapek feromonowych. Pozwala to na prowadzenie wiarygodnych odłowów żerdzianki w każdym, 30–60-letnim drzewostanie sosnowym.