

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

Głównym celem badań przeprowadzonych w roku 2025, w ramach zadania 1.2. było poszukiwanie i testowanie nowych rozwiązań zwiększających skuteczność, szybkość i wiarygodność metod wykrywania, monitorowania i zwalczania węgorka sosnowca (*Bursaphelenchus xylophilus*) oraz jego wektorów.

W ramach stałego pozyskiwania w drzewostanach i identyfikacji taksonomicznej występujących w Polsce nicieni z rodzaju *Bursaphelenchus* kontynuowano prace nad potencjalnie nowym gatunkiem, który zasiedla wiąź i brzozę na kilku stanowiskach w Polsce. Szczegółowe analizy morfologiczne, molekularne oraz bionomiczne wykazały, że są to dwa odrębne, nowe dla nauki gatunki, które zostały przez nas opisane jako *Bursaphelenchus betulae* występujący na brzozie i przenoszony na nowe drzewa przez kornika ogłodka brzożowego (*Scolytus ratzeburgi*) oraz zasiedlający wiąź *Bursaphelenchus ophiostomae*, którego wektorem jest kornik ogłodek wiązowiec (*Scolytus scolytus*). Opisy taksonomiczne obu gatunków zostały opublikowane w bieżącym roku, w Nematology (IF). Odkrycie to zwiększa liczbę wykazanych z Polski gatunków rodzaju *Bursaphelenchus* do 27, w tym 10 opisanych przez nas gatunków nowych dla nauki.

Hybrydyzacja międzygatunkowa pomiędzy kwarantannowym, patogenicznym dla sosny gatunkiem *B. xylophilus* i rodzimym, niepatogenicznym *B. mucronatus* wykazała znaczne zróżnicowanie skuteczności tego procesu oraz żywotności uzyskanego potomstwa u różnych par izolatów rodzicielskich. Analiza molekularna (PCR ze specyficznymi starterami) wykazała typowe DNA hybryd międzygatunkowych z różną intensywnością prążków reprezentujących genotyp *B. xylophilus* i *B. mucronatus*. W celu zwiększenia homozygotyczności uzyskanych hybryd, ułatwiającej ekspresję genów recesywnych hybrydy podjęto próbę wyprowadzenia serii linii rekombinacyjnych wsobnych (RIL). Najbardziej interesującą spośród uzyskanych RILs okazała się linia RIL-01B, która powstała w wyniku serii siostrzanych krzyżowań wsobnych hybryd *B. xylophilus* Rol x *B. mucronatus* Lwówek-01. Przez cały proces hodowli wykazywała ona wysoką zdolność reprodukcji oraz żywotność osobników. Około 1,9–3,1% osobników subpopulacji tej linii, przechowywanej w wodzie, w temperaturze 2–4°C przeżyło okres około 3 lat (10.04.2022–18.04.2025) bez odżywiania się, gdy u innych szczepów trwa to maksymalnie kilka miesięcy do około roku. Wszystkie żywe

nicienie były w stadium larwy dyspersyjnej DJIII. Po przeniesieniu na podłoże *in vitro* (*B. cinerea*/PDA) w ciągu 3–5 dni podejmowały one dalszy rozwój i masowe rozmnażanie się. Cykl rozwojowy (2 pokolenia) kończył się po 2 tygodniach wyjątkowo wysokim (80–86%) udziałem larw dyspersyjnych DJIII w potomstwie (zwykle jest to 16–35%), w warunkach *in vitro*. Dalsze krzyżowanie osobników RIL-01B z osobnikami dwóch innych szczepów *B. xylophilus* chińskiego „Nanjing” i portugalskiego Pt67OL pozwoliło zachować bardzo wysoki (około 80%) udział larw dyspersyjnych DJIII w potomstwie. Ponadto, pozostawienie tych nicieni w podłożu *in vitro* w temperaturze około 24°C lub po ekstrakcji wodnej i przechowywaniu w temperaturze 2–4°C, w ciągu 7–14 dni w populacji można wykryć 8–12% larw dyspersyjnych DJIV. Wstępne obserwacje sugerują, że udział ten stopniowo rósł. Po około 40 dniach udział ten wynosił ponad 17%. Jest to zjawisko wyjątkowe, zachodzące całkowicie spontanicznie.

Larwy dyspersyjne DJIII i DJIV są jedynymi stadiami rozwojowymi węgorka sosnowca, które mogą wnikać do tchawek owada-wektora i wraz z nim zasiedlać kolejne drzewa i obszary leśne. Znajomość warunków inicjowania ich rozwoju ma potencjalnie duże znaczenie praktyczne. Dlatego badania nad specyfiką tych stadiów prowadzone są na całym świecie. Dotychczasowe wyniki wskazują, że larwy DJIII tworzone są w odpowiedzi nicienia na pogarszające się warunki środowiskowe (niska wilgotność drewna, zmniejszona dostępność pokarmu), a tworzenie larwy DJIV jest odpowiedzią na dostępność owada wektora i ściśle uzależnione od uwalnianych przez niego specyficznych związków chemicznych. Zgodnie z istniejącą opinią, stadium to nie powstaje w hodowli *in vitro*. Jednakże, prowadzone przez nas w bieżącym roku badania z wykorzystaniem rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) wykazały, że część populacji niektórych hybryd międzygatunkowych *B. xylophilus* x *B. mucronatus* może tworzyć dyspersyjne larwy DJIV całkowicie bez udziału owadów-wektorów, w hodowli na grzybach saprobiotycznych. Zjawisko to tworzy nowy wariant cyklu rozwojowego węgorka sosnowca, w którym powstawanie zarówno larw dyspersyjnych DJIII, jak i DJIV jest całkowicie niezależne od obecności owada-wektora. W bieżącym roku podjęte zostały również szczegółowe badania uwarunkowań genetycznych oraz konsekwencji tego zjawiska dla pozostałej części cyklu rozwojowego nicienia (tj. zasiedlania owada-wektora, tzw. „loading” przez tak uzyskane larwy dyspersyjne DJIV, inicjowanie nowych pokoleń pasożytniczych w drewnie i patogeniczność tych nicieni w stosunku do sosny). Dotychczasowe badania wykazały znaczne, do ponad jednego miesiąca, opóźnienie inicjowania dalszego rozwoju przez larwy DJIV w normalnie odpowiednich warunkach hodowli *in vitro*. Jednak, duża część (około 30 do 80%) żywych larw DJIV tych populacji w ciągu miesiąca nie podjęła dalszego rozwoju.

W bieżącym okresie sprawozdawczym kontynuowano badania dotyczące metody identyfikacji pozwalającej odróżnić żywe osobniki węgorka sosnowca od martwych. Jest ona szczególnie ważna podczas rutynowej, granicznej kontroli fitosanitarnej drewna i opakowań drewnianych wwożonych na teren Unii Europejskiej. W przypadku obecności w drewnie martwych osobników nicienia, pozostałych po przeprowadzeniu skutecznego zabiegu termicznego, analiza molekularna przeprowadzona na podstawie DNA tych nicieni może dać fałszywe wyniki pozytywne. Lepszym rozwiązaniem jest jej wykonanie na podstawie obecności RNA nicieni, ponieważ ulega ono szybkiemu rozkładowi po ich śmierci. Brak sygnału reakcji jednoznacznie określa brak lub wcześniejszą śmierć (np. w wyniku prawidłowo przeprowadzonego zabiegu termicznego) nicieni w badanym drewnie. W tegorocznych badaniach opracowano nową technikę molekularną RT-qPCR do różnicowania żywych i martwych osobników węgorka sosnowca. Do badań diagnostycznych włączono również powszechnie występującego na terenie Polski nicienia *B. mucronatus*. W trakcie badań opracowano uniwersalne startery forward i reverse oraz specyficzne sondy TagMan dla *B. xylophilus* i *B. mucronatus*.

Przeprowadzenie reakcji RT-qPCR z wykorzystaniem uniwersalnych starterów i specyficznych sond dla *B. xylophilus* i *B. mucronatus* umożliwiło precyzyjne zidentyfikowanie i odróżnienie tych gatunków nicieni od siebie. Sonda zaprojektowana dla *B. xylophilus* amplifikowała tylko RNA badanych populacji tego gatunku. Podobnie wyniki zaobserwowano dla sondy zaprojektowanej dla *B. mucronatus*. Żadna z zaprojektowanych specyficznych sond nie wykrywała DNA tych gatunków nicieni (tj. drewno bez zabiegu lub zabieg przeprowadzony nieskutecznie). Ponadto, sondy te nie wykrywały DNA i RNA innych gatunków nicieni z grupy *xylophilus* – *B. fraudulentus* oraz *B. populi*, blisko spokrewnionych z kwarantannowym węgorkiem sosnowcem. Analizy te przeprowadzane były z RNA wyizolowanym z populacji nicieni, jak i z pojedynczych osobników (bez względu na stadium rozwojowe).

Przeprowadzone badania wykazały, że opracowana nowa technika molekularna RT-qPCR jest wiarygodną metodą umożliwiającą różnicowanie żywych i martwych osobników węgorka sosnowca oraz niepatogenicznego nicienia *B. mucronatus*.

W bieżącym okresie sprawozdawczym przeprowadzono potwierdzającą analizę molekularną nicieni wykrytych przez inspektorów PIORiN na przejściu granicznym w Gdyni, w przesyłce zawierającej drewniane materiały opakowaniowe (DMO), pochodzące z Chin. Analiza molekularna (reakcja PCR-RFLP oraz sekwencjonowanie) potwierdziła identyfikację tych nicieni jako kwarantannowego gatunku *B. xylophilus*. Izolat ten (nazwany przez nas China-3) badany był również pod względem jego cech morfologicznych. Zarówno wielkością ciała, jak i większością cech morfologicznych nie odbiega on od pozostałych

izolatów chińskich. W hodowli *in vitro* ogon samicy jest szeroko zaokrąglony. Jednakże, w hodowli *in vivo* ponad połowa osobników posiada wyraźnie wąsko stożkowate zakończenie ogona, gdy zaś inne izolaty/szczepy mają mniej lub bardziej widoczny mukron.

Tegoroczne badania nad dynamiką lotu chrząszczy żerdzianki sosnówki oraz transmisją rodzimego, niepatogenicznego nicienia *B. mucronatus* prowadzone były od czerwca do końca października w Nadleśnictwie Wronki (Leśnictwo Mokrz). Celem tegorocznych badań było określenie wpływu czasu przechowywania atraktantów feromonowych (Galloprotect Pack) na ich zdolności zwabiania chrząszczy żerdzianki. Wszystkie feromony przechowywano w temperaturze 4°C. Pułapki feromonowe (IBL-3 + Galloprotect Pack) rozwieszono na dwóch powierzchniach doświadczalnych oddalonych od siebie o około 2 km. Na każdej z tych powierzchni zawieszono po dwie pułapki rozmieszczone w odległości około 100 m od siebie, przy czym w jednej został użyty feromon przechowywany od 2022 roku, a w drugiej od 2024 roku. W tegorocznych badaniach odłowiono łącznie 1675 chrząszczy żerdzianki, z czego do pułapek z feromonem zakupionym w 2024 roku – 976, a do pułapek z 2022 roku – 699 chrząszczy. Pułapki wykorzystujące starsze feromony wykazały tylko około 28% mniejszą skuteczność w odławianiu owadów. Ze względu na stosunkowo wysoką cenę feromonu jest to ważna informacja dla praktyków. Wyniki te wskazują na możliwość skutecznego wykorzystania nieużytych feromonów w kolejnych latach.

Dotychczasowe wyniki przeprowadzonych badań patogeniczności wybranych hybryd międzygatunkowych *B. xylophilus* x *B. mucronatus* w stosunku do 4-letnich drzewek sosny zwyczajnej wykazały znaczne zróżnicowanie populacji rodzicielskich i wybranych linii RIL w zakresie patogeniczności ocenianej szybkością zamierania drzewek oraz liczebnością i zakresem dyspersji nicieni. Najbardziej patogeniczną populacją rodzicielską okazał się izolat *B. xylophilus* Jining (izolowany na granicy przez PIORiN w 2024 roku). Izolat ten zabijał drzewka już w ciągu 3–5 tygodni. Nicienie występowały na całej długości strzałki. Zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* wykazywał on bardzo wysoką płodność, która w standardowej kolbie hodowlanej prowadziła do powstawania wielomilionowych populacji potomstwa. W przypadku pozostałych izolatów proces prowadzący do obumarcia poszczególnych drzewek trwał od 5 do 9 tygodni.

Z trzech badanych linii wsobnych najwyższą patogeniczność i potencjał reprodukcyjny wykazywały linie RIL-01, pochodzące z krzyżówki *B. xylophilus* Roll i *B. mucronatus* Lwówek-01, powodujące śmierć drzewek już w ciągu 4 do 9 tygodni. W przypadku zastosowania linii RIL-03 (z krzyżówki *B. xylophilus* Roll x *B. mucronatus* Kampinos), 2 z 4 drzewek zamierały w ciągu, odpowiednio 9 i 25 tygodni wykazując obecność zaledwie kilkudziesięciu nicieni, a 2 pozostałe

przeżyty eksperyment nie wykazując obecności żadnych nicieni. Wyjaśnienie bezpośrednich przyczyn tego zróżnicowania wymaga dalszych studiów.

Pomimo prawdopodobnego obecnie niewystępowania węgorka sosnowca na terenie Ukrainy, sprzyjające warunki klimatyczne, powszechna dostępność wrażliwych gatunków sosny oraz obecność potwierdzonego owada-wektora, w kontekście trwających na tym obszarze działań wojennych, stwarzają poważne zagrożenie związane z możliwością niekontrolowanego przedostawania się tego szkodnika, jego zdomowienia oraz dalszego rozprzestrzeniania się na kraje sąsiadujące. W wyniku przeprowadzonego przeglądu literatury naukowej, oficjalnych informacji rządowych oraz raportów międzynarodowych i lokalnych organizacji środowiskowych i branżowych z zakresu leśnictwa oraz przemysłu drzewnego zidentyfikowano serię potencjalnych źródeł tych zagrożeń. Należą do nich: (i) istotne, ogólne osłabienie drzewostanów sosnowych będące wynikiem bezpośrednich działań wojennych na obszarach leśnych (liczne mechaniczne uszkodzenia strzał i koron drzew, wywroty, złamania), (ii) ogromny wzrost liczby i powierzchni pożarów na obszarach leśnych, które stają się bardzo atrakcyjne dla chrząszczy żerdzianki i zwabiają je masowo nawet z odległości kilku kilometrów, (iii) pozostawione w drzewostanach miny i niewybuchy ograniczające dostępność obszarów leśnych redukują skuteczność lub całkowicie uniemożliwiają monitorowanie występowania szkodników w drzewostanach, (iv) ze względu na inne priorytety, działania wojenne ograniczają lub całkowicie eliminują inspekcje fitosanitarne wprowadzanych na obszar kraju transportów drewna i drewnianych materiałów opakowaniowych, (v) wprowadzanie na pole walki znacznych ilości różnego pochodzenia drewna i drewnianych materiałów opakowaniowych, zabezpieczających broń i amunicję w czasie transportu zwiększających możliwości zawleczenia węgorka sosnowca z obszarów porażenia (np. Chiny, Korea Pn/Pd, USA, Portugalia). Nieoficjalne źródła informują, że materiały wojskowe nie są poddawane urzędowym kontrolom fitosanitarnym na granicy.

Ukraina jest znaczącym producentem i eksporterem drewna oraz produktów drewnianych. Istotnymi zagrożeniami w zakresie prawidłowej i skutecznej realizacji nadzoru fitosanitarnego nad sprowadzonym i eksportowanym drewnem mogą być również często przytaczane zjawiska o charakterze korupcyjnym i kryminalnym, jak masowa, nielegalna wycinka drzew oraz niejednoznaczna procedura ewidencjonowania zakładów produkujących palety i skrzynie z uprawnieniami do znakowania ich symbolem IPPC/ISPM15 (oficjalnie ewidencjonowanych jest: 14 lub 21–57 zakładów). Wobec wysokiego ryzyka, transporty drewna z (i na) Ukrainę (w tym również wojskowe) powinny być ściśle monitorowane pod kątem obecności węgorka sosnowca.