

Diagnostyka¹
Diagnostic

Gibberella circinata

Zakres stosowania

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla *Gibberella circinata*².

Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony we wrześniu, 2009 roku.

Wprowadzenie

Gibberella circinata jest czynnikiem sprawczym zamierania sosny. Grzyb prawie wyłącznie poraża gatunki z rodzaju *Pinus*, ale również został opisany u daglezi zielonej (*Pseudotsuga menziesii*). Z powodu ogromnej śmiertelności drzew, redukcji ich wzrostu i jakości drewna choroba stanowi poważne zagrożenie dla lasów sosnowych (szczególnie na plantacjach *Pinus radiata*). Wielokrotna infekcja pędów może powodować poważne zamieranie korony i ostatecznie prowadzić do śmierci drzewa. Ten agresywny gatunek grzyba może również infekować nasiona sosny w sposób ukryty i może być przyczyną zgorzeli siewek. Nasiona iglastych mogą być kolonizowane przez *G. circinata* w sposób wewnętrzny (gdzie grzyb pozostaje w stanie nieaktywnym do czasu kiełkowania nasion) oraz zewnętrzny (Storer *et al.*, 1998).

Fusarium circinatum, anamorfa *G. circinata*, jest głównie patogenem ran i wnika do roślin żywicielskich drzew poprzez mechaniczne uszkodzenia lub otwory wejściowe powodowane przez owady drążące chodniki w drewnie. Grzyb może zostać przenoszony z

¹ Użyte w standardach EPPO nazwy odczynników lub wyposażenia nie znaczą wykluczenia innych odczynników czy wyposażenia, które również mogą być przydatne.

² Użycie w niniejszym protokole nazw odczynników lub wyposażenia nie oznacza wykluczenia innych odczynników czy wyposażenia, które mogą być również odpowiednie.

drzewa na drzewo z konidiami roznoszonymi z prądami powietrza lub przez owady żerujące, które są wektorami patogena (Gordon i wsp., 2001, Schweigkofler i wsp., 2004). Jednakże, daleki zasięg rozprzestrzeniania patogena z obszarów porażonych na wolne od choroby może być również powodowany w wyniku przemieszczania porażonych nasion oraz porażonego materiału roślinnego (Storer i wsp., 1998).

Oficjalnie patogen został stwierdzony w USA, Meksyku, na Haiti, w RPA, Japonii, Chile (EPPO, 2005). Ostatnio donoszono o wystąpieniu patogena w regionie EPPO: Hiszpania (Landeras i wsp., 2005, w trakcie wyniszczenia), Włochy (Carlucci i wsp., 2007 wyniszczony), Francja (EPPO, 2008 w trakcie wyniszczenia). W większości przypadków wprowadzenia patogena na nowe obszary, grzyb po raz pierwszy był stwierdzany w szkółkach.

Grzyb przeszedł wielokrotne zmiany nazwy stadium anamorfy, ale z tą samą teleomorfa *Gibberella fujikuroi*. Oryginalnie opisany, jako *F. lateritium* f. sp. *pini* (Snyder i wsp., 1949), następnie zmieniony na *F. moniliforme* f. sp. *subglutinans* (Kuhlman *et al.*, 1978), *F. subglutinans* f. sp. *pini*, populacja kojarzeniowa "H" (Correll *et al.*, 1991; 1992) i w końcu zaszeregowany do gatunku *F. circinatum*, z nową uznaną teleomorfa: *G. circinata* (Nirenberg & O'Donnell, 1998). Gatunek *Gibberella fujikuroi* stanowi kompleks gatunków skupiający, co najmniej 36 gatunków *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 1998), z których nowy gatunek *G. circinata* jest obecnie wyłączony. Liczne gatunki *Fusarium* należące do tego kompleksu są już w pełni opisane lub nadal słabo udokumentowane, podobne do siebie morfologicznie, a ich identyfikacja może wymagać zastosowania kilku technik. W szczególności, Steenkamp i współautorzy (1999) donoszą, że niektóre rozróżniające cechy morfologiczne mogą być nieadekwatne lub niewystarczające do podjęcia ostatecznej identyfikacji *F. circinatum* (Nirenberg & O'Donnell, 1998). Mimo, że oficjalna metoda ISTA została opublikowana w roku 2002 do wykrywania *F. moniliforme* f. sp. *subglutinans* w nasionach *Pinus taeda* i *P. elliotii* (ISTA, 2002), to nie jest ona zalecana, bowiem cechy morfologiczne określone jako typowe dla *F. moniliforme* f. sp. *subglutinans* w tej metodzie oparte są na substracie nie wykazującym charakterystycznych sterylnych strzępek tego patogena i tym samym są one niewystarczające do zapewnienia rzetelnej identyfikacji *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorfa: *Gibberella circinata*).

Tożsamość

Nazwa: *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell

Anamorfa: *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell

Synonimy: *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* Hepting; *Fusarium moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* Wollenweber *Fusarium lateritium* f. sp. *pini* Hepting; *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson *et al.* f.sp. *pini* Correll *et al.*

Stanowisko taksonomiczne: *Fungi: Ascomycota: Hypocreales: Nectriaceae*

Uwagi do taksonomii i nazewnictwa: przez wiele lat patogen ten był znany tylko w stadium anamorfy (forma lub patotyp *Fusarium subglutinans*; Correll i wsp., 1991). Ponieważ jego teleomorfa została stwierdzona w warunkach testu kojarzeniowego *in vitro*, jest znana jako *G. circinata* (Nirenberg & O'Donnell, 1998). Jednakże, ze względu na to, że tylko anamorficzną formę *G. circinata* obserwuje się w czystej kulturze po izolacji, to w opisach morfologicznych niniejszego protokołu będzie używana nazwa *F. circinatum*.

Kod EPPO: GIBBCI

Kategoria fitosanitarna: EPPO, lista A1, nr 306.

Wykrywanie

Objawy

Grzyb powoduje u gatunków *Pinus* raki, które otaczają gałęzie, korzenie powietrzne, a nawet strzały. Często infekcja związana jest z wyraźnym i czasami widowiskowym wydzielaniem żywicy (Ryc. 1 A, B). *G. circinata* może również być patogenem doglebowym i infekować w ukryty sposób nasiona sosny (Storer *et al.*, 1998). Grzyb również powoduje zgniliznę korzenia (Coutinho *et al.*, 1997). Objawy chorobowe można obserwować o każdej porze roku.

Porażone siewki zwykle wykazują objawy zgorzeli, ale nie charakterystyczne dla infekcji przez *G. circinata*: igły przebarwiają się na kolor czerwony, brązowy lub chlorotyczny i zamierają od podstawy ku górze lub zamierają całe siewki (Ryc. 2).

Infekcja korzenia jest obserwowana najczęściej na siewkach w szkółkach, ale może również występować na zewnętrznych korzeniach większych drzew w nasadzeniach terenów zielonych. Objawy chorobowe na korzeniach to brązowe przebarwienia i dezintegracja kory, ale symptomy te są podobne do tych, powodowanych przez inne patogeny powodujące zgniliznę korzenia. Objawy chorobowe w części nadziemnej generalnie nie są widoczne do czasu, kiedy patogen porazi koronę i otoczy strzałę powodując żółknięcie igieł. Następnie można obserwować po usunięciu kory na niższej części strzały nasączone żywicą tkanki.

Infekcja części nadziemnych obejmuje żółknięcie igieł, które następnie przebarwiają się na kolor czerwony i w końcu opadają oraz zamieranie gałęzi. Z powodu powtarzających się infekcji dochodzi do zamierania wierzchołków gałęzi, co może prowadzić do znaczącego zamierania korony. Szyszki żeńskie na porażonych gałęziach mogą również stawać się porażone i ulegają aborcji zanim osiągną pełny rozmiar. Następnie raki mogą pojawić się na gałązkach (Ryc. 3), na głównych gałęziach, a nawet na strzale i są związane z typowym wydzielaniem żywicy (Ryc. 1a, b). Jednakże, objawy chorobowe na starszych drzewach mogą być mylone z tymi powodowanymi przez *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyco & Sutton (*Diplodia pinea*), dlatego też diagnoza powinna zostać postawiona na podstawie przeprowadzonych badań. Czasami, te wycieki żywicy mogą okrywać całą strzałę oraz niższe gałęzie położone kilka metrów poniżej miejsca infekcji. Raki na strzale są płaskie lub lekko zapadnięte i mogą czasami atakować duże powierzchnie tkanki korowej i podkorowej. Usunięcie kory pokazuje podkorowe nekrozy z brązową i wysyconą żywicą tkanką.

Procedura próbkobrania

Niezależnie od faktu, że rośliny *Pinus* mogą wykazywać różny poziom podatności na infekcję przez *G. circinata*, to wszystkie gatunki *Pinus* razem z daglezią zieloną (*Pseudotsuga menziesii*), mogą być potencjalnie porażane przez grzyba. W zależności od rodzaju materiału do pobrania (tkanka roślinna/nasiona) stosuje się dwie metody próbkobrania:

Tkanka roślinna (za wyjątkiem nasion)

Ze strzały lub gałęzi z rakami wycina się wielokrotnie skalpelem wewnętrzną korę na powierzchni bezpośrednio otaczającej widoczne nekrozy do momentu, kiedy stanie się widoczna

granica raka. Fragmenty tkanki, włączając w to floem i ksylem usuwa się próbując zebrać fragmenty z pogranicza raka, gdzie grzyb jest najbardziej aktywny. Fragmenty tkanki są pakowane w chłonący wodę ręcznik papierowy lub gazetę i umieszczane w zamykanej plastikowej torbie.

Części pędów, gałązek lub korzeni powietrznych pobiera się w trakcie wizualnej inspekcji na podstawie obserwacji objawów chorobowych wskazujących na wyżej opisane objawy. Próbki powinny zawierać pogranicze tkanki chorej i kilka centymetrów zdrowo wyglądającej tkanki powyżej nekrozy. Fragmenty tkanki owija się w ręcznik papierowy chłonący wodę lub gazetę i umieszcza w zamykanej plastikowej torbie.

Wszystkie próbki materiału roślinnego należy przesłać do laboratorium tak szybko, jak to jest możliwe lub przechowywać w chłodziarce do czasu wysyłki. Próbki w laboratorium powinny być przechowywane w chłodziarce do czasu analizy. Próbki należy poddać badaniom w ciągu 8 dni.

Nasiona

W zależności od wybranej metody identyfikacji liczba badanych nasion w partii może być różna. Całkowita liczba nasion przeznaczona do badania w celu wykrycia patogena na różnym poziomie infekcji w partii nasion została określona statystycznie (pomocny przewodnik jest podany w tabeli 1 i 2 procedury ISPM nr 31 Metodologia do próbkobrania przesyłek (*Methodologies for sampling of consignments*, IPPC, 2008). Poziom infekcji nasion może być bardzo niski (AM Pérez-Sierra, informacja ustna). Wielkości próbki zalecana przez ISTA wynosi 400 nasiona dla metody hodowlanej (ISTA, 2009). Jednakże, większe próbki (np. 1000 nasion) można poddać procesowi biologicznego wzbogacania przed analizą DNA (Ioos i wsp., 2009). W przypadku, kiedy nie obserwuje się objawów chorobowych próbka z partii powinna być pobrana w sposób losowy. Ponieważ liczenie nasion może być pracochłonne w niektórych przypadkach pobrane nasiona można ważyć zamiast liczyć. Można pobrać 1000 nasion zgodnie z Tabelą 1, która daje przykłady średniej wagi 1000 nasion ważniejszych gatunków *Pinus* lub *Pseudotsuga*. Następnie nasiona bada się bez ich uprzedniej powierzchniowej dezynfekcji, bowiem *G. circinata* może być obecny zarówno na łupinie nasiennej, jak i wewnątrz nasion.

Izolacja na podłoże półselektywne

Tkanka roślinna za wyjątkiem nasion

Izolacje z drzew iglastych lub siewek wykazujących objawy chorobowe przeprowadza się na podłoże Komada, DCPA lub na pożywkę PDAS (patrz Załącznik 1). Materiał roślinny powinno się powierzchniowo dezynfekować do 1 min w 1,5 % roztworze podchlorynu sodu i płucze w wodzie destylowanej sterylnej w celu usunięcia organizmów saprofitycznych z materiału roślinnego, które w przeciwnym razie przerosną gatunki z rodzaju *Fusarium*. Z siewek izolację patogena przeprowadza się z dolnej części pędu i korzeni. Z dorosłych drzew, izolację przeprowadza się z raków. Raki obmywa się dokładnie w wodzie, a izolację przeprowadza z wiórów drzewnych pobranych z pogranicza nekrozy stwierdzonej pod porażoną korą (Ryc. 4). Podczas inkubacji szalki kontroluje się okresowo i wszystkie kolonie *Fusarium* spp. przeszczepia się na PDA i SNA (Załącznik 1) do identyfikacji morfologicznej. Metoda ta jest bardzo skuteczna i niezawodna do izolacji różnych gatunków *Fusarium* z porażonej tkanki i nie wymaga drogiego sprzętu. Jednakże, prawidłowa identyfikacja morfologiczna *F. circinatum* w czystej kulturze wymaga doświadczenia i w przypadku wątpliwości należy przeprowadzić potwierdzenie metodą molekularną.

Nasiona

Nasiona wykłada się bezpośrednio na podłoże półselektywne dla *Fusarium* (np. Komada, DCPA; patrz Załącznik 1) bez uprzedniej powierzchniowej dezynfekcji. Płytki Petriego inkubuje się w temperaturze pokojowej ($22 \pm 6^{\circ}\text{C}$). Podczas inkubacji płytki kontroluje się okresowo i wszystkie kolonie *Fusarium* spp. przeszczepia się na pożywkę PDA i SNA (Załącznik 1) do identyfikacji morfologicznej. Metoda ta jest bardzo skuteczna i niezawodna do izolacji różnych gatunków *Fusarium* z porażonej tkanki i nie wymaga drogiego sprzętu, chociaż jest czasochłonna i wymaga przestrzeni w przypadku prowadzenia badań seryjnych. Jednakże, prawidłowa identyfikacja morfologiczna *F. circinatum* w czystej kulturze wymaga doświadczenia, a w przypadku wątpliwości należy przeprowadzić potwierdzenie metodą molekularną. Ponadto, Storer i wsp. (1998) udowodnili, że metoda hodowlana w przypadku nasion sosny może nie wykryć uśpionych (nieaktywnych) struktur *F. circinatum*, w ten sposób prowadząc do nieznanego ryzyka spowodowanego wydaniem wyniku fałszywie negatywnego.

Bezpośrednie wykrywanie *F. circinatum* w roślinach z zastosowaniem technik molekularnych (tkanka roślinna, włączając nasiona)

Zobacz opis w sekcji Identyfikacja. Metody te są szybkie, skuteczne i niezawodne szczególnie do wykrywania *G. circinata*, bez wcześniejszej hodowli na pożywkach, w ten sposób oszczędza się dużo przestrzeni i czasu, ale wymagają one warunków i wyposażenia dla biologii molekularnej. Dodatkowo, ponieważ celem tych technik jest DNA grzyba, aktywna i nieaktywna forma patogena powinna zostać wykryta w równym stopniu. Jednakże, pozytywny konwencjonalny PCR wymaga potwierdzenia, bowiem reakcje krzyżowe z filogenetycznie blisko spokrewnionymi gatunkami może wystąpić i prowadzić do fałszywie pozytywnych wyników.

Identyfikacja

Procedury do identyfikacji *G. circinata* na *Pinus* spp. i *Pseudotsuga menziesii* składają się z (i) izolacji grzyba z tkanki roślinnej na podłoża półselektywne i następującej morfologicznej, a w przypadku wątpliwości molekularnej identyfikacji, lub (ii) bezpośredniego wykrywania grzyba w roślinach z użyciem konwencjonalnego PCR, SyBr green real-time PCR lub real-time PCR z podwójnie znakowaną sondą. Na Ryc. 5 przedstawiono schemat decyzyjny wskazujący różne kombinacje metod.

Charakterystyka morfologiczna w czystych kulturach

Do identyfikacji morfologicznej, izolaty rosną na PDA w celu badania morfologii koloni i pigmentacji, a na SNA (Załącznik 1) w celu zbadania tworzenia i typu mikrokonidiów i komórek konidiotwórczych. Płytki z SNA i PDA inkubuje się w temperaturze pokojowej. Wszystkie izolaty są badane po 10 dniach i potwierdzane, jako *F. circinatum* na podstawie cech morfologicznych opisanych przez Nirenberg i O'Donnell (1998) oraz Britz i wsp. (2002). Na pożywce PDA *F. circinatum* rośnie względnie szybko (średnio 4,7 mm na dzień w 20°C; Nirenberg & O'Donnell, 1998). Po 10 dniach kolonia powinna mieć cały brzeg, białą watowatą lub brudnobiałą grzybnie powietrzną z łososiowym zabarwieniem w centrum lub purpurowym lub ciemnofioletowym pigmentem w agarze (Ryc. 6). Na SNA, mikrokonidia są skupione w fałszywych główkach (Ryc. 7a, b), z rozgałęzionymi konidioforami, mono i polifialidami (Ryc. 8a, b), odwrotnie jajowatymi mikrokonidiami w grzybni powietrznej, w większości

niepodzielnymi lub czasami z 1 przegrodą. Chlamydospory nie występują. Strzępki sterylne (skręcone lub niewyraźnie skręcone) są charakterystyczne dla *F. circinatum*, które można wyraźnie obserwować w tym podłożu (Ryc. 9 a, b). Określenie „*circinatum*” odnosi się do typowych, skręconych strzępek.

Metody molekularne

Obecnie dostępnych jest kilka metod molekularnych do potwierdzania tożsamości stadium anamorfnego *G. circinata* wyizolowanych w czystych kulturach lub to wykrywania i identyfikacji *G. circinata* bezpośrednio w roślinach.

- W Załączniku 2 przedstawiono metodę PCR-RFLP (połączenie metody PCR z RFLP (Polimorfizm Długości Fragmentów Restrykcyjnych, najpierw przeprowadzamy reakcję PCR a następnie produkt tej reakcji trawimy enzymem restrykcyjnym), ze starterami i wzorem prążków RFLP opracowaną przez Steenkamp i wsp. (1999), która jest odpowiednia do identyfikacji stadium anamorfnego *G. circinata* tylko w czystych kulturach, bowiem kontaminanty lub materiał roślinny mogą wpływać, na jakość i liczbę amplikonów PCR.
- reakcja PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem SyBr green (barwnik interkalujący łączący się z dwuniciowym DNA) lub konwencjonalny PCR ze starterami zaprojektowanymi przez Schweigkofler i wsp. (2004) może być użyteczna zarówno do identyfikacji grzyba w czystej kulturze, jak i wykrywania bezpośrednio w nasionach (Załącznik 4). Jednakże, kiedy jest przeprowadzana na próbkach DNA z materiału roślinnego, weryfikacja amplikonu z PCR powinna być przeprowadzona przez sekwencjonowanie dla konwencjonalnego PCR lub w wyniku analizy krzywej topnienia w reakcji PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem barwnika SyBr green (Załącznik 5). Istotnie, w kompleksie *Gibberella fujikuroi* występuje ukryta specjacja (Steenkamp et al., 2002) i reakcje krzyżowe w PCR mogą wystąpić z filogenetycznie bliskimi gatunkami *Fusarium*.
- Metoda real-time PCR ze starterami i podwójnie znakowaną sondą opracowana przez Ioos i wsp. (2009) może być pomocna zarówno do identyfikacji grzyba w czystej kulturze, jak i do bezpośredniego wykrywania patogena w tkankach roślin, włączając w to nasiona (Załącznik 6). Udowodniono, że jest to metoda bardziej czuła niż konwencjonalny PCR (czułość diagnostyczna

79,1% i odpowiednio 58,6%; Ioos i wsp., 2009) opisany w Załączniku 4 i jej specyficzność jest wzmocniona dzięki kombinacji specyficznych starterów i sond.

Inny konwencjonalny PCR został opracowany przez Ramsfield i wsp., (2008) ale brakuje doświadczenia z tą metodą w regionie EPPO, dlatego nie została ona opisana w tym protokole.

Ekstrakcja DNA z czystej kultury

Grzybowe DNA powinno być ekstrahowane z użyciem odpowiedniej standardowej metody ekstrakcji DNA z grzybów np. komercyjnymi zestawami do ekstrakcji DNA z roślin (lub innymi metodami zrewidowanymi przez Irlinger i wsp., 2008) i badane jedną z metod przedstawioną w Załączniku 2, 4 lub 6.

Ekstrakcja DNA z tkanek roślinnych (za wyjątkiem nasion)

Całkowite DNA z potencjalnie porażonej tkanki roślinnej powinno być ekstrahowane jak opisano z Załączniku 3 i badane jedną z metod przedstawioną w Załączniku 4 lub 6.

Ekstrakcja DNA z nasion

Całkowite DNA z potencjalnie zainfekowanych nasion powinno być ekstrahowane jak opisano w Załączniku 3 i badane jedną metod przedstawioną w Załączniku 4 lub 6.

Materiał odniesienia

Szczep typu *G. circinata* (CBS 405.97) i inne szczepy (CBS 117843, Hiszpania; CBS 119864, Afryka Południowa; CBS 100197, USA) dostępne są w CBS, Utrecht (NL).

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji przedstawiono w standardzie EPPO PM 7/77 (1) *Sprawozdawczość i dokumentowanie wyników badań*.

Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje dotyczące tego organizmu można uzyskać od:

Dr R Ioos, Laboratoire National de la Protection des Végétaux (LNPV), Station de Mycologie, Domaine de Pixérécourt, BP 90059, F54220 Malzéville, France, Tel: +33 (0) 383338662, Fax: +33 (0) 383338652, e-mail: renaud.ioos@agriculture.gouv.fr

Dr AM Pérez-Sierra, Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain), Tel: (+34) 963879254, Fax: (+34) 963879269, e-mail: aperesi@eaf.upv.es

Podziękowania

Protokół ten został w wersji oryginalnej przygotowany przez:

R. Ioos, Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Mycologie, Malzéville (Francja) i A. M. Pérez-Sierra, Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Valencia (Hiszpania).

Materiały źródłowe (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

Andrews S, & Pitt J (1986) Selection medium for *Fusarium* species and dematiaceous Hyphomycetes from cereals. *Applied and Environmental Microbiology* 5, 1235-1238.

ISTA (2002) International rules for testing. 7-009: Detection of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. & Reinke on *Pinus taeda* and *P. elliotii* (Pine). International Seed Testing Association (ISTA), Basseldorf, Switzerland. <http://seedtest.org/upload/cms/user/7009.pdf> [last accessed 2008-04-30]

Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, and Marasas WFO (2002) Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* 54, 9–22.

Carlucci A, Colatruglio L & Frisullo S (2007) First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease* 91, 1683.

Correll JC, Gordon TR, & McCain AH (1992) Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*. *Phytopathology* 82, 415-420.

Correll JC, Gordon TR, McCain AH, Fox JW, Koehler CS, Wood DL & Schultz ME (1991) Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* **75**, 676-682.

Coutinho TA, Wingfield MJ, Viljoen A, Britz H & Marasas WFO (1997) Pitch canker of pines: a Southern African perspective, in Prochazkova, Z. Sutherland, J. R. (Ed.), 1997, *Proceedings of the ISTA Tree Seed Pathology Meeting*, Opcno, Czech Republic, 9-11 October 1996. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland: 1997. 29-35.

EPPO (2005) *Gibberella circinata*. Data sheets on Quarantine pests. *EPPO Bulletin* **35**, 383-386.

EPPO (2008) *Gibberella circinata* eradicated in France. *EPPO Reporting Service* 2008-05 no. 106 http://www.eppo.org/PUBLICATIONS/reporting/reporting_service.htm . [last accessed 2009-04-25]

Gerlach W and Nirenberg H (1982) The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **209**. 406 pp.

Gordon TR, Storer AJ & Wood DL (2001) The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease* **85**, 1128-1139.

Ioos R, Belhadj A & Menez M (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum, and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* **158**, 351-362.

Ioos R, Fourrier C, Iancu G & Gordon T.R. (2009) Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a Real-Time PCR using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* **99**, 582-590.

IPPC (2008) ISPM no. 31 *Methodologies for sampling of consignments*. <https://www.ippc.int/servlet/CDSServlet?status=ND0xMzM5OSY2PWVuJjMzPSomMzc9a29z> [last accessed 2009-04-25]

Irlinger F, Berthet N, Vallaëys T, Vasseur V, Ioos R, Buée M & Mounier J. (2008) Ch XI, Nucleic acids preparation of fungal samples isolated from clinical, food and environmental specimens for direct molecular applications. In : Dongyou Liou ed. Handbook of nucleic acid purification. CRC Press. ISBN 978-1-4200-7096-568 pp.

Komada H (1975) Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research* **8**, 114-125.

Kuhlman EG, Dwinnell LD, Nelson PE & Booth C (1978) Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia* **70**, 1131-1143.

Landeras E, Garcia P, Fernandez Y, Brana M, Fernando-Alonso O, Mendez-Lodos S, Perez-Sierra A, Leon M, Abad-Campos P, Berbegal M, Beltran R, Garcia-Jimenez J and Armengol J (2005) Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. *Plant Disease* **89**, 1015.

Nirenberg HI & O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations with the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**, 434-458.

O'Donnell K, Cigelnik E & Nirenberg HI (1998) Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**, 465-493.

Pérez-Sierra A., Landeras E., Leon M., Berbegal M., Garcia-Jiménez J. and Armengol J., 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in Northern Spain. *Mycological Research* **111**, 832-839.

Ramsfield TD, Dobbie K, Dick MA & Ball RD (2008) Polymerase chain reaction-based detection of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker disease. *Molecular Ecology Resources* **8**, 1270-1273

Schweigkofler W, O'Donnell K & Garbelotto M (2004) Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a Real-Time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3512-3520.

Snyder WC, Toole ER and Hepting GH (1949) *Fusaria* associated with mimosa wilt, and pine pitch canker. *Journal of Agricultural Research* **78**, 365-382.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ & Marasas WFO (1999) Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3401-3406.

Steenkamp, ET, Wingfield BD, Desjardin AE, Marasas WFO & Wingfield M.J (2002) Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* **94**, 1032-1043.

Storer AJ, Gordon TR & Clarck SL (1998) Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* with Monterey pine seeds, and seedlings in California. *Plant Pathology* **47**, 649-656.

White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ eds. *PCR protocols: a guide to method and applications*. Academic Press, New York. 315-322.

Tabela 1. Średnia waga tysiąca nasion dla większości gatunków z rodzaju *Pinus* oraz *Pseudotsuga menziesii* (źródło: Francuskie Biuro Leśnictwa)

Gatunek	Orientacyjna waga tysiąca nasion (g)	Gatunek	Orientacyjna waga tysiąca nasion (g)
<i>Pinus aristata</i>	22	<i>Pinus mugo</i> subsp <i>pumilio</i>	6
<i>Pinus armandi</i>	245	<i>Pinus nigra</i> subsp <i>koekelare</i>	21
<i>Pinus banksiana</i>	4	<i>Pinus nigra</i> var. <i>austriaca</i>	20
<i>Pinus bungeana</i>	130	<i>Pinus nigra</i> var. <i>calabrica</i>	18
<i>Pinus brutia</i>	53	<i>Pinus nigra</i> var. <i>corsicana</i>	15
<i>Pinus canariensis</i>	120	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>salzmannii</i>	16
<i>Pinus cembra</i>	350	<i>Pinus palustris</i>	75
<i>Pinus contorta</i> var <i>latifolia</i>	5	<i>Pinus parviflora</i>	125
<i>Pinus coulteri</i>	330	<i>Pinus pinaster</i>	55
<i>Pinus eldarica</i>	62	<i>Pinus pinea</i>	895
<i>Pinus densiflora</i>	18	<i>Pinus ponderosa</i>	42
<i>Pinus gerardiana</i>	295	<i>Pinus pumila</i>	105
<i>Pinus griffithi</i>	58	<i>Pinus radiata</i>	29
<i>Pinus halepensis</i>	18	<i>Pinus rigida</i>	7
<i>Pinus jeffreyi</i>	110	<i>Pinus strobus</i>	14
<i>Pinus koraiensis</i>	460	<i>Pinus sylvestris</i>	7
<i>Pinus lambertiana</i>	300	<i>Pinus tabuliformis</i>	32
<i>Pinus leucodermis</i>	25	<i>Pinus taeda</i>	27
<i>Pinus montana uncinata</i>	9	<i>Pinus thunbergii</i>	14
<i>Pinus uncinata</i>	19	<i>Pinus wallichiana</i>	50
<i>Pinus mugo</i> subsp <i>mugo</i>	7	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	13

Tabela 2. Sekwencja i cel starterów PCR oraz kombinacja sond

Starter	Sekwencja (5'-3')	Wielkość (pz)	Cel	Literatura
H3-1a	ACT AAG CAG ACC GCC CGC AGG	ca 520	Histone	Steenkamp <i>et al.</i>
H3-1b	GCG GGC GAG CTG GAT GTC CTT		H3 gene	(1999)
CIRC1A	CTT GGC TCG AGA AGG G	360	IGS	Schweigkofler <i>et</i>
CIRC4A	ACC TAC CCT ACA CCT CTC ACT		rDNA	<i>al.</i> (2004)
			region	
FCIR-F	TCG ATG TGT CGT CTC TGG AC	146	IGS	Ioos <i>et al.</i> (2009)
FCIR-R	CGA TCC TCA AAT CGA CCA AGA		rDNA	
FCIR-P	FAM-CGA GTC TGG CGG GAC TTT GTG C- BHQ1		region	
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	ca 580	ITS	White <i>et al.</i> (1990)
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		rDNA	
			region	
18S uni-F	GCA AGG CTG AAA CTT AAA GGA A	150	18S	Ioos <i>et al.</i> (2009)
			rDNA	
18S uni-R	CCA CCA CCC ATA GAA TCA AGA			
18S uni-P	JOE-ACG GAA GGG CAC CAC CAG GAG T- BHQ1			

Załącznik 1. Skład podłoży hodowlanych

Podłoże Komada (Komada, 1975):

Podłoże to jest odpowiednie do izolacji *Fusarium circinatum* z tkanki roślinnej, włączając nasiona, ale nie do identyfikacji. Podstawowe podłoże składa się z:

- K_2HPO_4 1,0 g
- KCl 0,5 g
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,5 g
- Fe-Na-EDTA 10 mg
- L-Asparagine 2,0 g
- D-Galactose 20,0 g

- Agar techniczny 15,0 g
- Woda destylowana do 1,0 L

Doprowadzić pH do $3,8 \pm 0,2$ z użyciem 10% kwasu fosforowego. Podłoże podstawowe autoklawuje się i lekko ochładza przed dodaniem następujących, sterylnych (przygotowanych z użyciem filtra) roztworów z suplementami:

- Pentachloronitrobenzene (PNCB, 75% w/w) 1,0 g
- Oxgall 0,5 g
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{xH}_2\text{O}$ 1,0 g
- Streptomycyna 6 ml/L roztworu macierzystego (5 g streptomycyny w 100 ml wody destylowanej)

PDAS

Agar glukozowo-ziemniaczany z dodatkiem 0,5 mg na ml soli siarczanu streptomycyny (775 jednostek/mg).

Dichloran Peptone Chloramphenicol Agar (DCPA)

(nieznacznie zmodyfikowany przez Ioos i wsp., 2004, a oryginalnie opisany przez Andrews & Pitt, 1986)

Podłoże to jest odpowiednie do izolacji *Fusarium circinatum* z tkanki roślinnej, włączając nasiona, ale nie do identyfikacji. Podłoże składa się z:

- | | |
|--|----------|
| Pepton bakteriologiczny | 15,0 g |
| • KH_2PO_4 | 1,0 g |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{xH}_2\text{O}$ | 0,5 g |
| • Chloramphenicol | 0,2 g |
| • 2,6-dichloro-4-nitroanilin (dichloran) (0,2% w/v w etanolu, 1,0 ml); | 2,0 mg |
| • Fiolet krystaliczny (0,05 % w/v w wodzie, 1,0 ml) | 0,0005 g |
| • Agar techniczny | 20,0 g |

- Woda destylowana do 1,0 l

Spezieller-Nährstoffarmer Agar (SNA) (Gerlach & Nirenberg, 1982)

Podłoże to powinno być obowiązkowo stosowane do identyfikacji cech morfologicznych *F. circinatum*. Podłoże składa się z:

- KH_2PO_4 1,0 g
- KNO_3 1,0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- KCl 0,5 g
- Glukoza 0,2 g
- Sacharoza 0,2 g
- Agar techniczny 20,0 g
- Woda destylowana do 1,0 l

Opcjonalnie, dwa fragmenty 1 cm² sterylnej bibuły można umieścić na powierzchni agaru, bowiem sporodochia *Fusarium* czasami częściej tworzą się na brzegach bibuły.

Załącznik 2. Identyfikacja do gatunku techniką PCR-RFLP (Steenkamp i wsp., 1999)

1. Informacje ogólne

Steenkamp i wsp. (1999) opisali technikę opartą na PCR-RFLP przeprowadzaną na histonie H3 w celu identyfikacji anamorficznego stadium *G. circinata* w czystej kulturze. Całkowite DNA wyekstrahowane z czystej kultury *Fusarium circinatum* (stadium anamorficzne *G. circinata*) jest źródłem kwasu nukleinowego.

Celem reakcji PCR jest histon H3, który produkuje amplikon o wielkości 515 pb dla *G. circinata* (częściową sekwencję genu H3 *G. circinata* można znaleźć w Banku Genów, akcesja od AF150847 do AF150853). Histon H3 został pierwszy zamplifikowany, u *Gibberella* spp. z użyciem pary starterów H3-1a (forward) i H3-1b (reverse) (Tabela 2).

2. Metody

Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego

Grzybowe DNA powinno być ekstrahowane z użyciem odpowiedniej standardowej metody do ekstrakcji grzybowego DNA (Irlinger i wsp., 2008). Oczyszczone DNA powinno być zamrożone do czasu przeprowadzenia badania.

Reakcja PCR

Mieszanina reakcyjna PCR zawiera:

- 1x bufor PCR (dostarczony razem z polimerazą DNA),
- 0,25 mM każdego dNTP,
- 2,5 mM MgCl₂,
- 0,2 μM startera H3-1a i startera H3-1b,
- 0,05 U/μl polimerazy DNA
- 25-50 ng badanego DNA,
- Woda molekularna jest dodawana w celu uzyskania objętości końcowej mieszaniny reakcyjnej (20 μl).

Reakcja PCR przeprowadza się w termocyklerze wyposażonym w podgrzewaną pokrywę. Warunki amplifikacji są następujące: początkowa denaturacja przez 1 min. w temp. 92°C, następnie 30 cykli denaturacji w 92°C przez 1 min, przyłączenie w 63°C przez 1 min. i wydłużanie w 72°C przez 1 min. Końcowy step wydłużania przeprowadza się w 72°C przez 5 min. Produkt reakcji PCR przechowuje się w 5°C lub niższej, do czasu analizy restrykcyjnej.

Trawienie enzymatyczne

Produkt uzyskany z PCR histon H3 jest następnie trawiony odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi *CfoI* i *DdeI*. Nieprzerwane enzymatyczne trawienie jest przeprowadzane po dodaniu 5 U *CfoI* do 15 μl nieoczyszczonego produktu PCR i następującej inkubacji przez 3 godz. w temp. 37°C. Następnie stężenie chlorku sodu jest doprowadzane do 100 mM i 5 U *DdeI* jest dodawane do mieszaniny reakcyjnej. Następnie przeprowadza się dalszą 5 godz. inkubację w 37°C. Jednakże, Perez-Sierra i wsp. (2007) wykazali, że jest możliwe dodanie obu enzymów

jednocześnie bez dostosowania stężenia chlorku sodu i po prostu inkubacja mieszaniny przez 5 godz. w temp. 37°C.

Strawiony amplikon jest rozdzielany elektroforetycznie na 2-3% żelu agarozowym, a następnie barwiony w bromku etydyny.

Wzorzec PCR-RFLP dla *G. circinata* (odnoszący się do anamorfy *F. subglutinans* f. sp. *pini*, populacja kojarzeniowa "H", podany przez Steenkamp i wsp. (1999) składa się z prążków o wielkości: 250 pz, 232 pz i 33 pz (ten ostatni nie widoczny na żelu).

3. Istotne informacje proceduralne

Całkowite DNA uzyskane ze szczepu referencyjnego *G. circinata* powinno być poddane równolegle badaniu z próbkami DNA w celu (i) posiadania wzorca kontroli referencyjnej na żelu po końcowej elektroforezie oraz (ii) w celu zapewnienia, że procesy PCR i enzymatyczny zostały poprawnie przeprowadzone.

Załącznik 3. Ekstrakcja DNA z roślin w celu wykrycia *G. circinata*

1. Tkanka roślinna (za wyjątkiem nasion)

Rozcieranie

Potencjalnie porażone tkanki roślinne pobiera się z próbki używając sterylnej ostrza skalpela, bez etapu uprzedniej powierzchniowej dezynfekcji. Najpierw powinny zostać pobrane drobne fragmenty, ok. 0,5-1 cm², a następnie pocięte na mniejsze (< 2 - 3 mm) i umieszczone w sterylnych plastikowych płytkach Petriego.

Próbka jest następnie przenoszona do 2 ml probówki mikrowirówkowej, dodaje się ok. 200 µl i rozciera przez 2 min przy częstotliwości 30Hz razem z dwoma metalowymi kulkami lub z węgla wolframu kulkami o średnicy 3 mm w aparacie typu TissueLyser® (Qiagen lub podobnym), a następnie dodaje 400 µl buforu lizującego dostarczonego razem z zestawem do ekstrakcji DNA. Próbkę mogą być również roztarte w moździerzu w ciekłym azocie lub przy użyciu innych skutecznych technik rozcierających.

Ekstrakcja DNA i oczyszczanie

Całkowite DNA powinno być ekstrahowane najlepiej zgodnie z protokołem ekstrakcyjnym opisanym przez Ioos i wsp. (2009) z użyciem komercyjnego zestawu do ekstrakcji DNA Nucleospin Plant II® miniprep (Macherey-Nagel, Hoerdt, France), który udowodnił, że jest skuteczny. Jednakże, inne protokoły do ekstrakcji DNA mogą zostać użyte, o ile całkowita ilość DNA będzie równoważna i podobna w ilości, jak i jakości.

Całkowite DNA jest ekstrahowane zgodnie z instrukcją producenta z niewielkimi zmianami. Po pierwsze, etap inkubacji z chemiczną lizą jest rozszerzony do 20 min, używając buforu lizującego PL1. Po tym etapie próbka, zgodnie z instrukcją producenta, jest odwirowywana 5 min przy przyspieszeniu 11000 g w celu zagęszczenia resztek, ponieważ tylko supernatant jest odzyskiwany do dalszych badań. W końcu całkowite DNA jest wymywane 100 µl buforu eluacyjnego dostarczonego przez producenta i przechowywane zamrożone do czasu analizy. Całkowite DNA jest bezpośrednio użyte do konwencjonalnego PCR lub real-time PCR (Załączniki 4, 6).

2. Nasiona

Biologiczne wzbogacenie

Procedura ta została wstępnie opisana przez Ioos i wsp. (2009) i powinna być stosowana w przypadku, kiedy obecność *G. circinata* będzie badana bezpośrednio w ekstrakcie DNA z nasion z użyciem konwencjonalnego PCR lub real-time PCR (Załącznik 4 i 6). Celem tego etapu wstępnego biologicznego wzbogacenia jest zwiększenie biomasy żywych struktur *G. circinata* przez ekstrakcją DNA i badaniem molekularnym.

Jak zaleca ISTA do metody hodowlanej (ISTA, 2002) co najmniej 400 nasion z partii inkubuje się w temp. $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ przez 72 godz. w kolbach do hodowli komórek z bulionem glukozowo-ziemniaczanym (PDB, Difco, Beckton, Dickinson i Co, Sparks, MD, USA). Jednakże większa ilość nasion (np. 1000 nasion, Ioos i wsp., 2009) może zostać zbadana tą metodą i może wzrosnąć szansa wykrycia grzyba, kiedy poziom infekcji jest niski. Rozmiar kolb powinien być tak dobrany, aby cała próbka nasion mogła być rozłożona mniej lub więcej widoczną grubą

warstwą „pojedynczych nasion”. W zależności od gatunku *Pinus*, średnia wielkość nasion może być znacząco różna i ilość PDB na kolbę powinna być ręcznie dostosowana w ten sposób, aby warstwa nasion była prawie kompletnie pokryta przez płynne podłoże.

Homogenizacja (rozcieranie)

Po inkubacji, cała zawartość kolby (nasiona i bullion PDB) przenosi się w warunkach aseptycznych do miski miksera w odpowiedniej objętości i następnie rozciera mikserem do czasu uzyskania jednorodnego roztworu. Woda sterylna lub sterylny bulion PDB można dodać podczas tego etapu w przypadku, kiedy rozcierana próbka pozostaje za gęsta. Pobiera się dwie podróbki, każda ok. 500 µl i przenosi w warunkach aseptycznych do oddzielnych 2 ml probówek mikrowirówkowych w celu ekstrakcji DNA.

Ekstrakcja DNA i oczyszczanie

Całkowite DNA powinno być ekstrahowane najlepiej zgodnie z protokołem ekstrakcyjnym opisanym przez Ioos i wsp. (2009) z użyciem komercyjnego zestawu do ekstrakcji DNA Nucleospin Plant II® miniprep (Macherey-Nagel, Hoerd, France), który wykazał, że jest skuteczny, ale inne protokoły do ekstrakcji DNA mogą być również użyte, o ile równoważna ilość i jakość DNA zostanie uzyskana.

Całkowite DNA jest ekstrahowane oddzielnie z dwóch 500 µl podpróbek zgodnie z instrukcjami producenta z niewielkimi zmianami. Postępować jak opisano powyżej dla tkanki roślinnej.

Załącznik 4. Identyfikacja do gatunku z użyciem konwencjonalnego PCR lub SyBr green real-time PCR (Schweigkofler i wsp., 2004)

1. Informacje ogólne

Schweigkofler i wsp.. (2004) opisali technikę opartą o konwencjonalny PCR lub a SyBr green real-time PCR zaprojektowany dla regionu rDNA IGS (Inter Genic Spacer) w celu identyfikacji stadium anamorficznego *G. circinata* w czystej kulturze lub pozyskanych w pułapkę zarodników rozprzestrzenianych drogą powietrzną lub może być zaadoptowana do analizy nasion

następującej po etapie biologicznego wzbogacenia (Zobacz sekcja Identyfikacja, Ioos R., ustna informacja).

Celem testu PCR jest region IGS , który daje amplikon, o wielkości 360 pz dla *G. circinata* (sekwencje regionu IGS dla *G. circinata* można wyszukać w Banku Genów, akcesja od AFAY249397 do AY249403). Specyficzny region IGS jest namnażany z DNA *G. circinata* z zastosowaniem pary starterów: CIRC1A (forward) i CIRC4A (reverse) (Tabela 2).

2. Metody

Ekstrakcja kwasu nukleinowego i oczyszczanie.

Zobacz Załącznik 3.

Konwencjonalny PCR

Część IGS specyficzna dla *G. circinata* jest amplifikowana w reakcji PCR następująco:

Mieszanina reakcyjna PCR zawiera:

- 1x bufor PCR dostarczony razem z polimerazą DNA,
- 0,25 mM każdego dNTP,
- 2 mM MgCl₂,
- 0,5 μM każdego startera CIRC1A i CIRC4A,
- 0,05 U/μl polimerazy DNA,
- 25-50 ng DNA,
- Wodę molekularną dodaje się w celu uzyskania końcowej objętości mieszaniny (25 μl).

Każdy ekstrakt DNA powinien być badany, w co najmniej dwóch powtórzeniach.

Reakcja PCR powinna zostać przeprowadzona w termocyklerze wyposażonym w podgrzewaną pokrywę i w następujących warunkach: początkowa denaturacja w 94°C przez 3 min, następnie 45 cykli denaturacji w 94°C przez 35 sek., przyłączanie w 66°C przez 55 sek. i

wydłużanie w 72°C przez 50 sek. Etap końcowego wydłużania przeprowadza się w 72°C przez 12 min.

Produkt PCR rozdziela się elektroforetycznie na 1% żelu agarozowym, a następnie barwi w bromku etydyny. DNA *G. circinata*, po reakcji PCR ze starterami CIRC1A/CIRC4A daje prążek o wielkości 360 pz.

Reakcja SyBr green real-time PCR

Część IGS specyficzna dla *G. circinata* jest amplifikowana w reakcji PCR następująco:

Mieszanina reakcyjna PCR zawiera:

- 1x bufor PCR dostarczony razem z polimerazą DNA,
- 0,25 mM każdego dNTP,
- 5 mM MgCl₂,
- 0,5 μM każdego startera CIRC1A i CIRC4A,
- barwnik SyBr green (stężenie przygotować zgodnie z instrukcją producenta)
- 0,05 U/μl polimerazy DNA,
- 25-50 ng DNA,
- Wodę molekularną dodaje się w celu uzyskania końcowej objętości mieszaniny (25 μl)..

Każdy ekstrakt DNA powinien być badany w co najmniej dwóch powtórzeniach.

Reakcje real-time PCR przeprowadza się w odpowiednich urządzeniach PCR wyposażonych w system zdolny do monitorowania fluorescencji.

Warunki reakcji PCR włączają początkową denaturację w 95°C przez 3-10 min. (zgodnie z typem polimerazy DNA), następnie 45 cykli denaturacji w 94°C przez 35 sek., przyłączania w 66°C przez 55 sek. i wydłużania w 72°C przez 50 sek. Fluorescencja barwnika reportera jest monitorowana na koniec każdego etapu wydłużania.

Akumulacja ampliconu *G. circinata* jest monitorowana w czasie rzeczywistym (z ang. real-time) poprzez pomiary specyficznej fluorescencji barwnika SYBR Green

wprowadzonego do produktu PCR. Wzorzec DNA zawierający amplifikowane DNA *G. circinata* daje wartość progową cyklu (z ang. cycle threshold (Ct)). Wartość Ct określa cykl, po którym jest możliwa detekcja sygnału, a więc intensywność fluorescencji przekraczająca wartość tła.

Natura amplikonu powinna zostać sprawdzona poprzez wartości krzywych topnienia na koniec procesu amplifikacji i porównana z wartością krzywych topnienia z pozytywną kontrolą PCR.

3. Istotne informacje proceduralne

Do każdej serii ekstrakcji DNA powinno się włączyć **negatywną kontrolę ekstrakcji DNA** (próbka ślepa) w celu zapewnienia, że podczas tego etapu badania nie doszło do kontaminacji.

Kontrola negatywna PCR nie zawierająca badanego DNA powinna zostać włączona do każdego badania w celu zapewnienia, że kontaminacja nie nastąpiła podczas reakcji PCR.

Kontrola pozytywna PCR powinna zostać użyta (genomowe DNA ze szczepu referencyjnego *G. circinata* lub produkt PCR *G. circinata* CIRC1A/CIRC4A PCR). Kiedy bada się próbki roślin i nasion kontrola pozytywna powinna odpowiadać granicy wykrywalności w danym badaniu (z ang. LOD). Tego rodzaju kontrola pozytywna LOD³ powinna zostać włączona do badań w celu zapewnienia, że negatywne wyniki są spowodowane raczej brakiem lub bardzo niskim poziomem produktu PCR w próbce DNA, aniżeli powstały w wyniku niewystarczającej skuteczności reakcji PCR.

Jakość ekstraktu DNA powinna zostać oceniona z użyciem odpowiednich metod np. spektrofotometrycznie, przez użycie *ad hoc* **wewnętrznej kontroli amplifikacji** lub przez badanie ekstraktu PCR z użyciem uniwersalnych starterów ITS1 i ITS4 (White i wsp., 1990). W tym ostatnim przypadku reakcja PCR przebiega w warunkach opisanych powyżej, zastępuje się po prostu startery FCIRC1A/CIRC4A starterami ITS1 i ITS4 (Tabela 2) i obniża temperaturę

³ Kontrolę pozytywną LOD sporządza się z rozcieńczonego genomowego DNA uzyskanego ze szczepu referencyjnego *G. circinata* lub przez rozcieńczenie namnożonego produktu PCR *G. circinata* CIRC1A/CIRC4A. Może być ona zdefiniowana jako najmniejsza ilość badana dająca wynik pozytywny w co najmniej w 95% przypadkach, zapewniając tym samym $\leq 5\%$ wyników fałszywie ujemnych.

hybrydyzacji do 50°C. Pozytywny wynik (ok. 600 pz.) tego badania wskazuje, że ekstrakt DNA został zamplifikowany: DNA zostało wyekstrahowane, a poziom wyekstrahowanych inhibitorów był wystarczająco niski.

Interpretacja wyników:

- Próbkę uważa się za pozytywną, jeśli produkuje ona amplikon o wielkości 360 pz., a kontrole kontaminacji są negatywne
- Próbkę uważa się za negatywną, jeśli (i) ta nie produkuje prążka o wielkości 360 pz.; (ii) udowodni się, że ekstrakt DNA próbki został namnożony i nie wystąpiła znacząca inhibicja; (iii) jeśli LOD kontroli pozytywnej badanej w reakcji PCR dał amplikon o wielkości 360 pz.
- Próbki roślin, z których ekstrakt DNA daje wartość Ct niższą lub równą Ct_{LOD} powinna być uznane za porażone przez *G. circinata*, o ile negatywne kontrole (PCR i ekstrakcji DNA) nie dają wartości Ct.
- Próbki roślin, z których ekstrakt DNA nie przekroczył wartości Ct powinny zostać uznane za wolne od *G. circinata* lub porażone poniżej progu wykrywalności dla techniki, o ile udowodni się, że próbka ekstraktu DNA została amplifikowana i nie wystąpiła znacząca inhibicja.
- Badania należy powtórzyć, jeśli uzyska się sprzeczne lub niejasne wyniki.

Załącznik 5: Potwierdzenie *G. circinata* poprzez sekwencjonowanie

Ponieważ startery CIRC1A/CIRC4A z konwencjonalnego testu PCR mogą reagować krzyżowo z gatunkami bliskimi filogenetycznie (włączając w nie opisane lub słabo opisane gatunki kompleksu *G. fujikuroi*), amplikon CIRC1A/CIRC4A można zweryfikować za pomocą sekwencjonowania. Do analizy wysyła się produkt reakcji PCR z odpowiednimi starterami CIRC1A/CIRC4A.. Zgodna sekwencja, od której wcześniej odcięto sekwencje starterów jest porównywana przez BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) z licznymi i bliskimi filogenetycznie gatunkami *Fusarium* zdeponowanymi w Banku Genów (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sekwencja leżąca pomiędzy CIRC1A i CIRC4A w regionie IGS jest wystarczającym wyznacznikiem do identyfikacji *G. circinata*.

Załącznik 6: Identyfikacja do gatunku z zastosowaniem techniki real-time PCR z podwójnie znakowanymi sondami (Ioos i wsp., 2009)

1. Informacje ogólne

Ioos i wsp. (2009) opisali technikę opartą na PCR w czasie rzeczywistym, na amplifikacji sekwencji IGS (z ang. intergenic region) w sekwencji rDNA w celu identyfikacji stadium anamorficznego *G. circinata* (*F. circinatum*) w czystej kulturze lub bezpośrednio z próbek roślin.

Przedmiotem testu PCR jest sekwencja IGS, która produkuje ampikon o wielkości 149 pz. dla *G. circinata* (sekwencję IGS dla *G. circinata* można uzyskać z Banku Genów, depozyty od numeru AFAY249397 do AY249403. Specyficzna sekwencja IGS została po raz pierwszy zamplifikowana z DNA *G. circinata* przy użyciu pary starterów FCIR-F (forward) i FCIR-R (reverse) i wykryta przy pomocy sondy fluorescencyjnej FCIR-P (Tabela 2).

2. Metody

Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego

Patrz Załącznik 3.

Reakcja real-time PCR

Specyficzny region IGS *G. circinata* jest amplifikowany reakcją real-time PCR jak następuje:

Mieszanina reakcyjna real-time PCR zawiera:

- 1x bufor PCR dostarczony z polimerazą DNA
- 0,20 mM każdego dNTP,
- 5 mM MgCl₂,
- 0,2 μM każdego ze starterów: FCIR-F i FCIR-R,
- 0,1 μM sonda FCIR-P,
- 0,025 U/μL Hotstart DNA polimeraza,
- 25-50 ng DNA,

- Wodę molekularną dodaje się w celu uzyskania końcowej objętości mieszaniny (20 µl).

Każdy ekstrakt DNA powinien być badany, w co najmniej dwóch powtórzeniach.

Reakcje real-time PCR przeprowadza się w odpowiednim urządzeniu PCR wyposażonym w system zdolny do monitorowania fluorescencji.

Warunki reakcji PCR: początkowa denaturacja w 95°C przez 10 min, następnie 40 cykli denaturacji w 95°C przez 15 sek, hybrydyzacja/elongacja w 70°C przez 55 sek. Fluorescencja barwnika jest monitorowana na końcu każdego etapu hybrydyzacji/elongacji.

Akumulację amplikonów *G. circinata* monitoruje się w czasie rzeczywistym poprzez pomiar specyficznej fluorescencji barwnika emitowanego z sondy FCIR-P. DNA zawierające amplifikowalne DNA *G. circinata*, które daje wartość progową cyklu (Ct). Wartość Ct reprezentuje oszacowaną liczbę cyklu, od którego poziom fluorescencji staje się znacznie przekraczający tło poziomu fluorescencji.

3. Istotne informacje proceduralne

Do każdej serii ekstrakcji DNA należy włączyć **negatywną kontrolę ekstrakcji DNA** w celu zapewnienia braku kontaminacji podczas tego etapu badania (ślepa próbka zawierająca sterylną wodę molekularną lub 500 µl bulionu do próbek nasiona).

Negatywna kontrola PCR (bez wzorca DNA, zawierająca np. sterylną wodę molekularną) powinna zostać włączona do badań w celu sprawdzenia nieobecności kontaminacji podczas PCR.

Pozytywna kontrola PCR limitu detekcji (LOD)⁴ powinna być użyta w celu oceny przebiegu reakcji PCR i zapewnienia, że negatywne wyniki są spowodowane przez nieobecność lub bardzo niski poziom DNA, aniżeli niewystarczająca skutecznością PCR.

Jakość ekstraktu DNA powinna zostać oceniona z użyciem odpowiednich metod np. spektrofotometrycznie, przez badanie ekstraktów konwencjonalnym PCR z użyciem uniwersalnych grzybowych starterów ITS1 i ITS4 (patrz Załącznik 4) lub techniką real-time PCR, z innymi uniwersalnymi dla roślin i grzybów starterami i sondą jak: 18S uni-F/-R/-P (Ioos i wsp., 2009) lub innymi uniwersalnymi badaniami opisanymi w literaturze naukowej. Sygnał pozytywny (średnio 600 pz) uzyskuje się po reakcji PCR ze starterami ITS1/ITS4 lub wartość Ct uzyskana z 18S uni-F/-R/-P real-time PCR oznacza, że ekstrakt DNA został amplifikowany. DNA został z sukcesem wyekstrahowany i poziom wyekstrahowanych składników – inhibitorów był wystarczająco niski.

Interpretacja wyników:

- Próbkę roślinną, których ekstrakt DNA daje wartość Ct niższą lub równą Ct_{LOD} należy uznać za porażone przez *G. circinata*, o ile kontrole negatywne (PCR i ekstrakcji DNA) nie wykazały wartości Ct.
- Próbkę roślinną, których ekstrakt DNA nie dały wartości Ct niższej lub równej Ct_{LOD} powinny być uznane za nieporażone przez *G. circinata* lub porażone poniżej progu wykrywalności techniki, o ile ekstrakt próbki DNA został amplifikowany i nie wystąpiła znacząca inhibicja.
- Badanie należy powtórzyć, jeśli uzyska się sprzeczne lub niejasne wyniki. Wyniki wątpliwe lub na granicy należy przeanalizować ponownie z użyciem tej samej lub innej techniki (np. sekwencjonowanie).

⁴ Kontrolę pozytywną LOD sporządza się z rozcieńczonego genomowego DNA uzyskanego ze szczepu referencyjnego *G. circinata*, lub przez rozcieńczenie namnożonego produktu PCR *G. circinata* CIRC1A/CIRC4A. Może być ona zdefiniowana jako najmniejsza ilość badana dająca wynik pozytywny w co najmniej w 95% przypadkach, zapewniając tym samym $\leq 5\%$ wyników fałszywie ujemnych.

Protokół diagnostyczny *Gibberella circinata*

Ryc. 1. (A, B) Obfity wysięk żywicy ze zrakowaceń spowodowany przez *G. circinata* (dzięki uprzejmości J. Armengol i R. Ioos).



Ryc.2. Zgorzel siewek w szkółce powodowane przez *G. circinata* (dzięki uprzejmości E. Landeras).



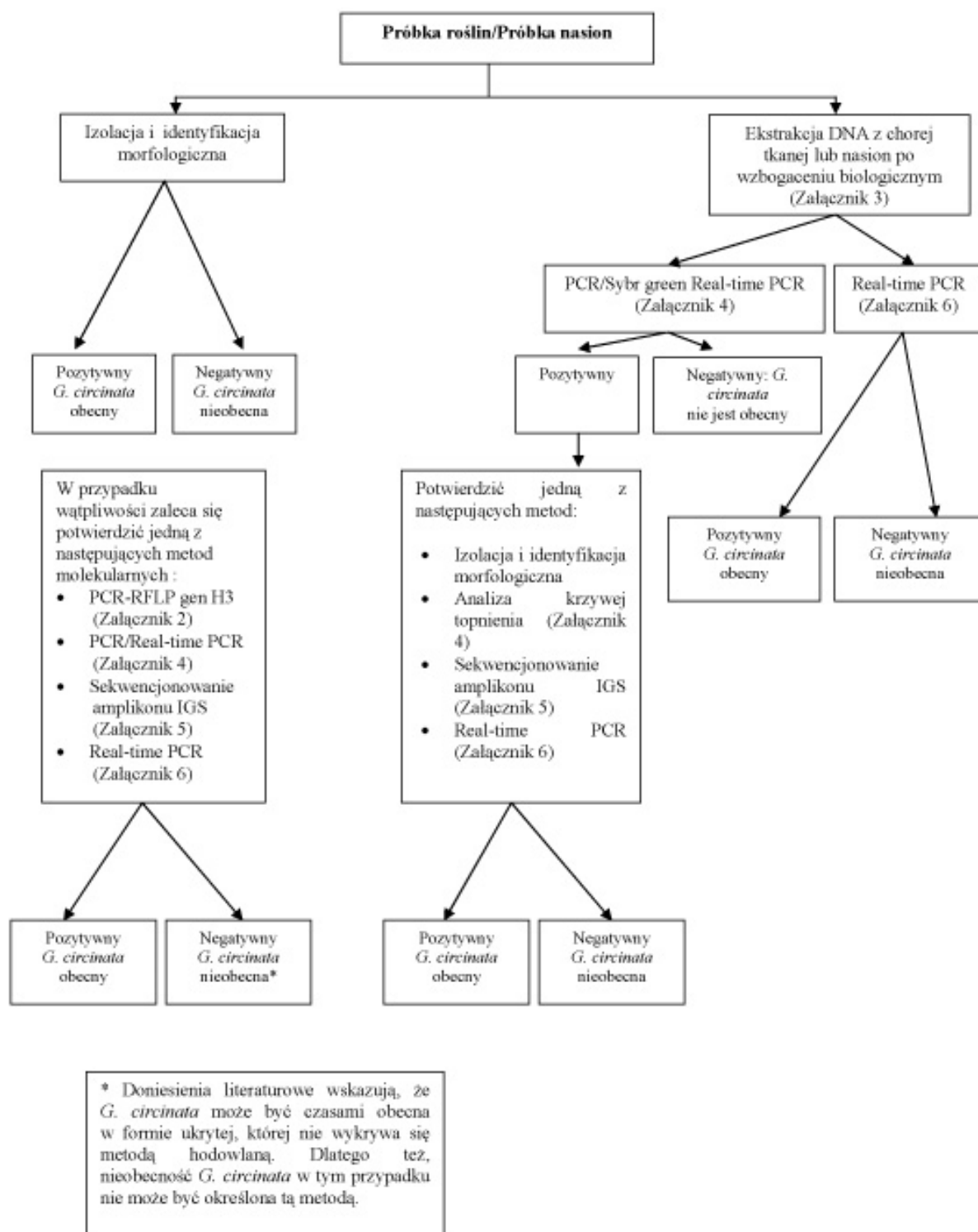
Ryc.3. Raki gałęzi powodowane przez *G. circinata* (dzięki uprzejmości J. Armengol).



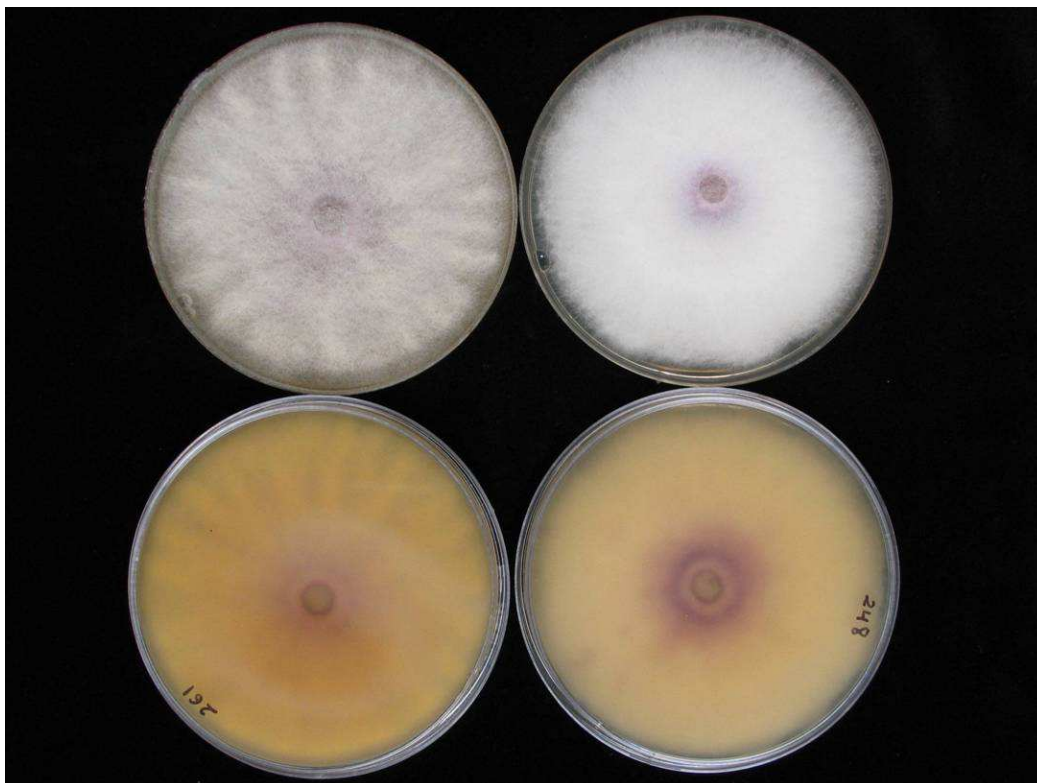
Ryc. 4. Nekroza podkorowa strzały obserwowana pod rakiem spowodowana przez *G. circinata* (dzięki uprzejmości E. Landeras).



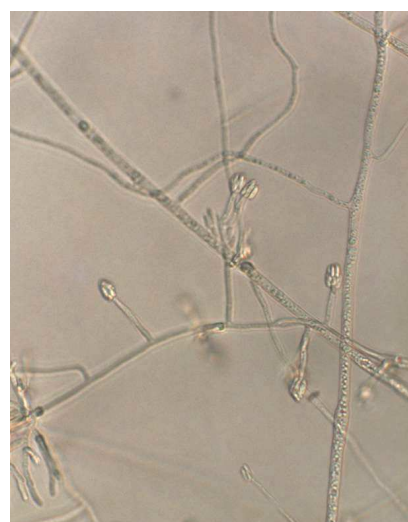
Ryc.5. Schemat decyzyjny do identyfikacji *G. circinata* w materiale roślinnym i nasionach.



Ryc. 6. Aspekt wzrostu kultur stadium anamorficznego *G. circinata* (*F. circinatum*) na podłożu PDA (po lewej: *F. circinatum* MAT-1; po prawej: *F. circinatum* MAT-2). MAT-1 typ kojarzeniowy produkuje typowe skręcone sterylne strzępki na SNA podczas gdy typ kojarzeniowy MAT-2 nie produkuje wyraźnie skręconych strzępek lub nawet nieskręcone sterylne strzępki (dzięki uprzejmości A. Pérez-Sierra) (patrz również Ryc. 9a i b)



Ryc.7. Wyprostowane konidiofory z mikrokonidiami w fałszywych główkach *F. circinatum*, bezpośrednio obserwowane na podłożu SNA (a) (dzięki uprzejmości R. Ioos) i w preparacie mikroskopowym (b) (dzięki uprzejmości A. Pérez-Sierra)



Ryc.8. : Konidiofory z mono i polifialidami *F. circinatum* obserwowane na podłożu SNA (dzięki uprzejmości J. Armengol)



Ryc. 9a: Skręcone i niewyraźnie skręcone sterylne strzępki na podłożu SNA przez typ kojarzeniowy MAT-1 (po lewej) i typ MAT-2 (po prawej) izolatów *F. circinatum*(dzięki uprzejmości A. Pérez-Sierra)



Ryc. 9b: Grupa skręconych strzępek sterylnych i konidioforów z polifialidami na SNA (dzięki uprzejmości R. Ioos)

