

Diagnostyka¹ Diagnostic

Gremmeniella abietina

Zakres stosowania

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla grzyba *Gremmeniella abietina*.

Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony do stosowania we wrześniu, 2009 roku.

Wprowadzenie

Gremmeniella abietina (zamieranie pędów sosny) jest patogenem występującym na wielu gatunkach sosen (*Pinus* spp.) oraz na kilku innych roślinach iglastych (*Picea* spp., *Abies sachalinensis*, *Abies balsamea*, *Larix* spp., *Pseudotsuga menziesii*). Grzyb atakuje pączki i młode pędy, powoduje porażenie igliwia i prowadzi do zamierania gałęzi oraz konarów. Całe rośliny mogą zamierać po wielokrotnych infekcjach. Na starszych częściach kory mogą rozwijać się nekrozy.

G. abietina występuje praktycznie na wszystkich kontynentach (Ameryka Północna, Europa, Azja). Patogen występuje powszechnie w Europie i powoduje zamieranie pędów sosny czarnej (*Pinus nigra*), sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*), limby (*Pinus cembra*), kosodrzewiny (*Pinus mugo*), ale również świerka pospolitego (*Picea abies*). Geograficznie, gatunek ten rozprzestrzeniony jest od strefy subarktycznej do śródziemnomorskiej.

Uważa się, że patogen pochodzi częściowo z Europy, a częściowo z Ameryki Północnej. Rasa grzyba, która ma europejskie pochodzenie została rozprzestrzeniona w Ameryce Północnej i Japonii, gdzie spowodowała poważne straty na plantacjach sosny. Opisano różne odmiany, rasy i biotypy grzyba (patrz Załącznik 1). Wyniki badań molekularnych przeprowadzonych przez Hamelin i Rail (1997) oraz Dusabenyagasani i wsp. (2002) wykazały, że taksonomia *Gremmeniella* będzie podlegała w przyszłości większym zmianom, gdyż odmiany patogena będą traktowane na poziomie gatunku. Ponieważ zmiany w taksonomii trwają nadal, to niniejszy protokół odnosi się do aktualnie obowiązującego statusu gatunku ze zmianami, które są oczekiwane w przyszłości.

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

Tożsamość

Nazwa: *Gremmeniella abietina* (Lagerberg) Morelet

Synonimy: *Ascocalyx abietina* (Lagerberg) Schlapfer

Crumenula abietina Lagerberg

Lagerbergia abietina (Lagerberg) J.Reid

Scleroderris abietina (Lagerberg) Gremmen

Scleroderris lagerbergii Gremmen

Anamorf: *Brunchorstia pinea* (P. Karsten) Hohnel

Synonimy: *Brunchorstia destruens* Eriksson

Brunchorstia pini Allescher

Excipulina pinea P. Karsten

Septoria pinea P. Karsten

Stanowisko taksonomiczne Fungi: Ascomycetes: Helotiales

Uwagi dotyczące taksonomii i nazewnictwa: (patrz: wprowadzenie)

Kod EPPO: GREMAB

Kategoria fitosanitarna: UE, Załącznik: II/B

Wykrywanie

Objawy chorobowe

Poniższy opis odnosi się do całego gatunku, w przeciwnym przypadku jest to zaznaczone.

Początkowa infekcja powodowana przez *G. abietina* ma miejsce wiosną na rozwijających się pędach. Pączki nie rozwijają się, a na korze tegorocznych przyrostów pojawiają się kropelki żywicy. Jednakże symptomy choroby mogą być niezauważalne aż do zimy, kiedy wycieki żywicy stają się wyraźnie widoczne. Pączki zamierają, a nekrozy rozszerzają się w kierunku pędów. Pędy jednoroczne lub starsze mogą zamierać, a na starszych częściach tworzyć miejscowe raki. W konsekwencji, zeszłoroczne igły przebarwiają się u podstawy na kolor

czerwony do brązowego (rys.1.)

Porażone igły łatwo zdjąć z pędów. Całkowicie brązowe igły wkrótce opadają. Kora pędów obkurcza się i zasycha. Z częściowo zamierających pączków tworzą się słabo rozwinięte i zdeformowane pędy, które następnie mogą zamierać. Nekrozy mogą tworzyć pierścien wokół podstawy strzały.



Rys. 1 Wczesne symptomy infekcji *Pinus cembra* przez *G. abietina*: zamierające pączki otoczone czerwono-brązowo przebarwionymi igłami

Raki, które nie obejmują pierścieniem drzewa są pomarszczone i mniej lub bardziej pokryte kalusem. W wyniku zamierania pędów powstają anomalie, które przypominają czarcie miotły. W miejscach zrakowaceń wewnętrzne warstwy kory wykazują żółtawe przebarwienie (nie obserwuje się ich w przypadku rasy azjatyckiej *G. abietina* var. *abietina*).

W rzeczywistości, każde zamieranie pędów sosen lub świerków może być wynikiem infekcji *G. abietina*, ale może być również wynikiem porażenia przez dużą liczbę innych grzybów patogenicznych dla roślin. Dlatego też pączki, kora pędów i gałązek powinna być

starannie badana na obecność struktur owocujących *Brunchorstia pinea* lub teleomorfy (Rys. 2 i 3).



Rys. 2

Rys. 2 Askostroma *G. abietina* (fot. R. Engesser, WSL).



Rys. 3

Rys. 3 Konidioma *B. pinea* widoczna na pączku szczytowym świerka pospolitego (*Picea abies*).

W przypadku sosen typowym objawem choroby są igły otaczające martwe pączki. Większość z nich jest całkowicie zabarwiona na czerwono do brązowo-czerwonego, ale czasami niektóre z nich mają tylko częściowo zabarwioną podstawę (patrz powyżej), a górna pozostaje zielona. Pospolitym grzybem powodującym zamieranie kilku gatunków sosen jest *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton. Objawy zamierania mogą być podobne do tych powodowanych przez *Gremmeniella*, za wyjątkiem braku widocznego zamierania podstawy igieł z częściowym zabarwieniem zamarych pączków.

W przypadku porażenia przez *G. abietina* częściej występują piknidia niż apotecja. Tworzą się one na igłach (często blisko ich podstawy) i na gałązkach wokół zamarych pączków. Piknidia, o wymiarach 1 mm, występują pojedynczo, czasami są ułożone blisko siebie w grupach. Na *Pinus sylvestris*, *P. resinosa* i *P. banksiana* piknidia tworzą się pod korą, które można jedynie stwierdzić po usunięciu z gałązek zewnętrznej warstwy kory.

Apotecja na korze i u podstawy igieł mogą być widoczne na ich powierzchni. W warunkach wzmożonej wilgotności hymenium jest charakterystycznie wybarwione na kolor kremowy do jasnozielonego. Apotecja są rozrzucone na martwych pędach lub na tkance igieł (Rys. 2).

Ciała owocujące są czasami trudne do stwierdzenia lub są nieobecne. Jest to powszechny fenomen u *Pinus cembra*, kiedy są one obserwowane tylko podczas krótkiego okresu wiosny, często rozwijają się pod okrywą śnieżną. W tym przypadku patogen może być izolowany z porażonych tkanek. Izolacja jest czasochłonna i w okresie letnim może nie być zakończona sukcesem (Skilling & Kienzler, 1983). Z tego powodu zaleca się poszukiwanie ciał owocujących.

Podobne objawy chorobowe powodowane przez inne czynniki

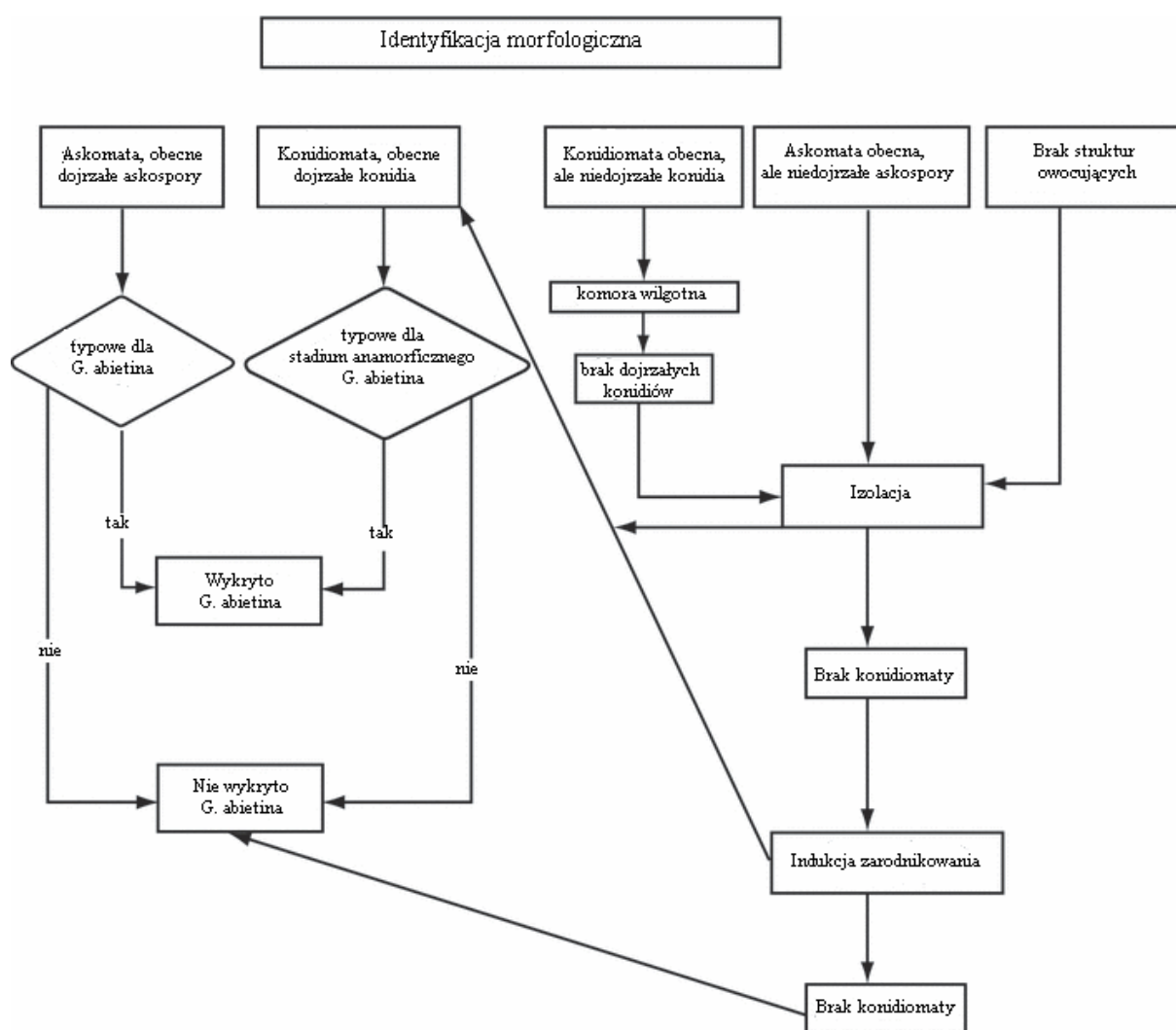
Inny grzyb *Cenangium ferruginosum* Fr. (zwykle gatunek saprofityczny) może być stwierdzany na martwych gałązkach wielu roślin iglastych. Drzewa osłabione przez różne czynniki stresogenne mogą wykazywać objawy zamierania, w których bierze udział również

C. ferruginosum. Patogen ten na gałązkach, konarach i pędach produkuje dużą liczbę czarnych apotecjów z żółtawo wybarwionymi dyskami.

Zrakowacenia różnych rozmiarów są również typowe dla *Crumenulopsis sororia* (P. Karsten) Groves, który również poraża sosny europejskie. Często obserwuje się niebieskawe zabarwienie drewna pędów. *G. abietina* (Ettlinger) Schlapfer-Bernhard na modrzewiach powoduje podobne objawy chorobowe. Należy podkreślić, że takie symptomy mogą być powodowane przez czynniki abiotyczne.

Identyfikacja

W niniejszym protokole opisano procedurę wykrywania i identyfikacji patogena, a postępowanie przedstawiono na schemacie decyzyjnym (Rys. 4).



Rys. 4. Schemat decyzyjny do wykrywania i identyfikacji *G. abietina*.

Z łatwością można zidentyfikować *G. abietina in vivo* kiedy obecne są dojrzałe ciała owocujące. W przypadku ich braku próbki z objawami chorobowymi należy inkubować w komorze wilgotnej w celu indukcji zarodnikowania. Inkubacja kończy się sukcesem tylko wówczas, kiedy obecna jest niedojrzała konidioma. Najbardziej odróżniającą cechą jest obecność piknostromy i piknospor stadium anamorficznego, jak również askostromy i askospor stadium teleomorficznego. W przypadku uzyskania zarodnikującej kultury grzyba można zastosować klasyczne badanie morfologiczne.

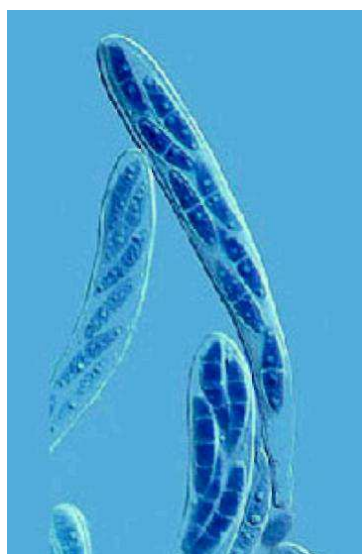
Charakterystyka morfologiczna *in vivo*

Anamorfa

Piknidia są ciemnobrązowe do czarnych, stromatyczne, z jedną lub kilkoma komorami częściowo oddzielonymi od siebie, bez ostioli, wrzecionowatego kształtu, poduszkowate, okrągłe lub nieregularne. Piknidia mogą być głęboko osadzone w korze, ale częściej wyłaniają się przez szpary kory i są widoczne na jej powierzchni (rys.3). Ściany i podstawa piknidium są grube, zbudowane z grubej ściany zewnętrznej bezbarwnej lub ciemnobrązowej, o kątowej teksturze oraz wewnętrznych, cieńszych ścianach wyłożonych komórkami pseudoparenchymatycznymi o wymiarach 200-600 x 800-1400 (2000) μm . Kiedy przecina się je skalpelem, to są one miękkie, zawartość jest biała, a czasami może być różowawa (lupa ręczna). Często powierzchnię kory pokrywa biała lub różowawa lepka masa zarodników, która wydostaje się z piknidiów.



Ryc. 5. Konidia *G. abietina*.



Ryc. 6. Worki i askospory *G. abietina*
(fot. R. Engesser, WSL).

Konidia są hialinowe (rys.5) 25 -40 x 3-3.5 μm , 0 - 8 komórkowe (najczęściej 3-7) zakrzywione, wrzecionowate, gładkie, cienkościenne i bez kropelek tłuszczu, powstające z nieregularnie rozgałęzionych cylindrycznych struktur konidiogenicznych (Sutton, 1980; Heiniger, 1988).

W przypadku braku powierzchniowych ciał owocujących na gałązkach *Pinus* spp. do wykrywania *G. abietina* stosuje się metodę diagnostyczną opisaną przez Cauchon & Lachance (1980). Grzyb może zostać wykryty we wczesnym stadium, tylko wówczas kiedy w kambium obecne są nekrozy lub pierwsze igły przebarwiają się na kolor czerwony. Można

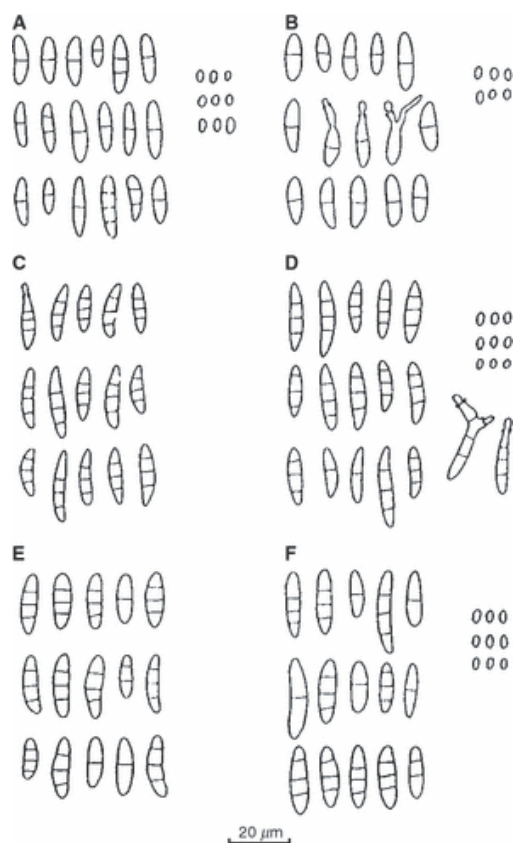
obserwować piknidia, które wyglądają jak drobne wgłębienia lub kieszonki o rozmiarach od 200 µm do 2 mm. Są one całkowicie ukryte w korze gałązek oraz pędów i przypominają kieszenie żywiczne, gdyż dają światło, jak skryształizowana żywica lub wosk. Wgłębienia to konidiomaty stadium anamorficznego *G. abietina* zawierające charakterystyczne konidia. Masa konidiów jest biała do biało-różowej. W odróżnieniu od typowych ciał owocujących piknidia nie są osłonięte ciemno wybarwioną warstwą ścian. Nie ma charakterystycznego sposobu uwalniania się zarodników (brak typowych pęknięć lub szczelin) chociaż w przypadku drobnych gałązek lub pędów konidia wydają się być wydalane poprzez mikroskopijne pęknięcia perydermy. Zwykle struktury te są większe i zawierają większą ilość zarodników aniżeli typowa konidioma *G. abietina* i można je obserwować z użyciem mikroskopu stereoskopowego. Piknidia mogą być rozmieszczone przypadkowo wzdłuż pędów lub gałązek, ale są one często usytuowane blisko blizny po igle. W przypadku sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) są one ułożone w charakterystyczne okręgi wokół blizny po igle i nie są one tak głęboko zanurzone, jak w przypadku *Pinus resinosa* i *P. banksiana*. Na większych gałęziach lub konarach, które są porażone od dłuższego czasu piknidia można znaleźć okazjonalnie na rakach i częściowo zgniłej korze, ale ich ilość jest zróżnicowana. Piknidia mogą one występować zmieszane z typowymi konidiomami lub askostromatami. Nawet wówczas, jeśli większość komórek jest pusta, to pozostaje w nich pewna liczba konidiów, które pozwalają na postawienie diagnozy. Generalnie konidia wykazują dużą żywotność: izolacja grzyba z takich konidiów jest prosta, jak w przypadku form typowych a aseptyczne usunięcie konidiów z użyciem ostrej igły lub skalpela natychmiast po usunięciu kory jest łatwiejsze aniżeli z części powierzchniowej (Cauchon & Lachance, 1980).

Porównanie konidiów z gatunkami podobnymi

Powszechnym gatunkiem grzyba powodującym zamieranie kilku gatunków sosen jest *Sphaeropsis sapinea*, jednakże konidia tego patogena są bardzo duże (30-45 x 10-16 µm, Sutton, 1980) i wybarwione na ciemnobrązowo. Anamorfa grzyba *Crumenulopsis sororia* (P. Karsten) Groves (*Digitosporium piniphilum* Gremmen) charakteryzuje się palczastymi konidiami. Czarna askostromata jest otoczona przez wyraźne ciemno wybarwione peryfery. Z kolei konidia *Brunchorstia laricina* Ettl. przypominają *Brunchorstia pinea*, ale są one krótsze (15 - 23 x 3 - 4 µm) i 1-3 komórkowe.

Teleomorfa

Askostroma jest brązowa do czarno-brązowej, ma kształt dysku, kiedy jest sucha to pokarbowana, na krótkim trzonku (pseudotecjum askolokularne), złożone z grubościennych komórek pseudoparenchymatycznych, o wymiarach 400-1200 x 120-250 µm. Worki są maczugowate do cylindrycznych, dwuścienne, 8 zarodnikowe, hialinowe, bez wieczka, z zaokrąglonym szczytem (nie amyloidnym), o wymiarach 100-120 x 6,5 – 10,5 µm. Askospory są wrzecionowate, 3 przegrodowe, hialinowe, typowe z 4 kropelkami tłuszczu, 15-22 x 3-5 µm. Parafizy są hialinowe, nitkowate i podzielone.



Ryc. 7. Askospory i konidia *Gremmeniella* spp. (Petrini i wsp., 1989). (A, B) Askospory i pierwotne mikrokonidia *G. laricina*. (C,D) Askospory i pierwotne mikrokonidia *G. abietina* var. *balsamea*. (E,F) Askospory i pierwotne mikrokonidia *G. abietina* var. *abietina*



Ryc. 8. Kultura *G. abietina* (podłoże wg. Benhamou i wsp., 1984; wyizolowany z *Pinus cembra*, Austria, Carinthia, 2007).

Porównanie askospor z gatunkami podobnymi

Na martwych gałązkach wielu sosen można znaleźć innego patogena *Cenangium ferruginosum* Fr., jednakże jego askospory są niepodzielone i owalne. Z kolei askospory *Gremmeniella laricina* są jednokomórkowe, ale rozmiary konidiów są takie same, jak u *G. abietina* (ryc. 7).

Identyfikacja morfologiczna *in vitro*

Izolacja

W przypadku braku dojrzałych ciał owocujących niezbędna jest izolacja patogena na podłoża hodowlane. Identyfikacja *G. abietina* z kultur może trwać od 2 tygodni do miesiąca. Podłoża hodowlane zostały opisane w Załączniku 2.

Techniki izolacji

- Izolacja z igieł (Barklund & Rowe, 1981):

Z pędów pobiera się igły, obmywa w wodzie wodociągowej z małą kroplą detergentu. Następnie sterylizuje się przez 30 sek. w podchlorynie sodu (8-12% aktywnego chloru), trzykrotnie obmywa w wodzie sterylnej, suszy w sterylnej bibule i tnie na drobne fragmenty, które umieszcza się na szalkach Petriego (Skilling & Kienzler, 1983).

- Izolacja z pędów, gałązek i strzały

Rekomendowane są dwie metody:

Barklund & Rowe, 1981:

Przekroje pędów, konarów lub strzały obmywa w wodzie wodociągowej z małą kroplą detergentu. Następnie powierzchnie próbek sterylizuje się przez 30 sek. w podchlorynie sodu (8-12% aktywnego chloru). Próbki obmywa się trzykrotnie w wodzie sterylnej i suszy w sterylnej bibule. W sterylnych warunkach usuwa się zewnętrzną warstwę kory, fragmenty tkanki tnie i wyklada na pożywkę agarową.

Skilling & Kienzler, 1983:

Do izolacji wybiera się gałązki z charakterystycznym żółtawym przebarwieniem. Wycina się drobne fragmenty drewna, sterylizuje przez 1 min. w 10% roztworze podchlorynu sodu i umieszcza się na pożywce V8.

Inkubacja

Zainokulowane szalki Petriego inkubuje się przez trzy tygodnie w ciemności, w temp. od 5 do 10°C (Barklund & Rowe, 1981). Czystą kulturę, uzyskaną z pierwotnej inokulacji inkubuje się w celu optymalnego wzrostu w temp. 15-17°C (Skilling & Kienzler, 1983).

Stymulacja zarodnikowania (stadium anamorficznego)

W obrębie ras *G. abietina* istnieje duże zróżnicowanie w zakresie rozwoju struktur owocowania (konidiomaty) w kulturze. Podczas, gdy wiele izolatów w trakcie kilku tygodni tworzy liczne konidiomaty, to inne ich nie tworzą lub miesiącami pozostają sterylne. W celu optymalnego tworzenia zarodników kultury powinny być inkubowane przy sztucznym świetle przez co najmniej 16 godzin na dobę (Marosy i wsp., 1989). W przypadku braku tworzenia konidiomaty kultury inkubować przez jeden tydzień w świetle bliskim UV, w temp. 20°C (Barklund & Rowe, 1981) lub przez 2-3 miesiące w temperaturze pokojowej (Dorworth & Krywienczyk, 1975). Alternatywnie, w celu tworzenia różowej masy zarodników kultury przenieść na substrat pszenicy (patrz Załącznik 2), utrzymywać przez 2-3 miesiące w temp. 15°C (Bazzigher i wsp., 1986). Dalsze informacje dotyczące podłoża do zarodnikowania *G. abietina* podaje Hudler i wsp. (1984).

Charakterystyka kultur

Opis charakterystyki kultur został przeprowadzony na pożywce wielowarzywnej V8 (Dorworth, 1971). *G. abietina* jest gatunkiem wolno rosnącym i na szalkach Petriego tworzy białą, zielonkawą lub zielonkavo-zieloną, a czasami żółtą grzybnię powietrzną (ryc. 8). Doświadczenia prowadzone z innymi bogatymi podłożami hodowlanymi (np. agarom maltozowym i innymi agarami opartymi na sokach warzywnych) wykazały podobne cechy kultur (Cech, inf. ustna, 2009). Minimalna temp. wzrostu dla tego patogena wynosi 5°C, maksymalna 30°C a optimum mieści się w zakresie od 13 do 20°C (Donaubauer & Stephan, 1988). Po upływie jednego miesiąca na 2% agarze maltozowym w temp. 18°C (Schlaepfer-Bernhard, 1968) lub dwóch tygodniach na podłożach stymulujących zarodnikowanie

(Hudler i wsp., 1984) różowe krople zawierające zarodniki (Schlaepfer-Bernhard, 1968; Skilling, 1968) tworzą się zwykle w koncentrycznie ułożonych pierścieniach (Dorworth & Krywienczyk, 1975). Przegląd morfologii kultur *G. abietina* został przedstawiony przez Dorworth & Krywienczyk (1975).

Metody molekularne

W celu identyfikacji grzyba *G. abietina* w porażonym materiale roślinnym lub czystych kulturach opracowano kilka testów molekularnych (Hellgren & Hogberg, 1995; Hamelin i wsp., 1996, 2000; Hantula & Miffler, 1997; Zeng i wsp., 2005; Borja i wsp., 2006). Niektóre z nich pozwalają na różnicowanie biotypów w ramach europejskiej rasy *G. abietina* var. *abietina*. Jednakże, żaden z nich nie pozwala na identyfikację wszystkich ras i biotypów patogena. Jeśli wziąć pod uwagę wątpliwości związane ze stanowiskiem taksonomicznym odmian *G. abietina*, żadna z tych metod nie jest rekomendowana.

Różnicowanie odmian i ras

Testy różnicujące rasy zostały opisane w literaturze oraz w Załączniku 1, jednakże do celów kwarantannowych przeprowadzanie takich badań nie jest wymagane.

Materiał odniesienia

Okazy i izolaty *G. abietina* dostępne są w licznych herbariach i kolekcjach kultur. Porażony materiał i czyste kultury można uzyskać w następujących centrach badawczych:

- The Finnish Forest Research Institute, Unioninkatu 40 A, FESf-00170 Helsinki (FI)
- Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Mycology and Pathology Box 7026, S-750 07 Uppsala (SE)
- Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre, P.O. Box 3800, 1055 du PEPS, Sainte-Foy, Quebec G1 V 4C7 (CA)
- Federal Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscape, Seckendorff-Gudent-Weg 8 A-1131 Vienna (AT).

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:
- Cech T., Austrian Federal Office and Research Centre for Forests, Seckendorff-Gudent-Weg 8, A-1131 Vienna (Austria)
- Karjalainen R., University of Kuopio, 31600 Jokiainen, Finland.

Podziękowania

Protokół ten w wersji oryginalnej został przygotowany przez: dr. Thomas Cech z Federal Forest Office and Federal Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscape, Vienna (AT).

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

- Barklund P & Rowe J (1981) *Gremmeniella abietina* (*Scleroderris kigerbergii*), a primary parasite in a Norway spruce die-back. *European Journal of Forest Pathology* 11, 97-108.
- Bazzigher G., Kanzler E. & Lawrenz P (1986) Pnfektionsversuche mit *Ascocalyx abietina* und *Ascocalyx laricina*. *European Journal of Forest Pathology* 16, 433-439.
- Benhamou N, Ouellette GB, Asselin A & Maicas E (1984) The use of polyacrylamide gel electrophoresis for rapid differentiation of *Gremmeniella abietina* isolates. In: *Scleroderris Canker of Conifers* (Ed. Manion PD), pp.68-81, Martinus Nijhoff/Dr.WJunk Publishers, The Hague.
- Bernier L, Hamelin RC & Ouellette GB (1994) Comparison of ribosomal DNA length and restriction site polymorphisms in *Gremmeniella* and *Ascocalyx* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4), 1279-1286.
- Borja I, Solheim H, Hietala AM & Fossdal CG (2006) Etiology and real-time polymerase chain reaction based detection of *Gremmeniella* and *Phomopsis* associated disease in Norway spruce seedlings. *Phytopathology* 96, 1305-1314.
- Cauchon R & Lachance D (1980) Recherche de cryptopycnides, pour un diagnostic precoce de *Gremmeniella abietina*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2, 232-234.
- Donaubauer E & Stephan R Ed., (1988) Recent research on *Scleroderris* Canker of Conifers, IUFRO working Party S 2.06.02, Mitteilungen der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien Nr. 162.
- Dorworth CE (1971) Diseases of conifers incited by *Scleroderris lagerbergii* Gremmen: a review and analysis. *Canadian Forestry Service*, 42 pp. Publication 1289.
- Dorworth CE & Krywienczyk J (1975) Comparisons among isolates of *Gremmeniella abietina* by means of growth rate, conidia measurements, and immunogenic reaction. *Canadian Journal of Botany* 53, 2506-2525.
- Dusabenyagasani M, Lafiamme G & Hamelin RC (2002) Nucleotide polymorphisms in three genes support host and geographic speciation in tree pathogens belonging to *Gremmeniella* spp. *Canadian Journal of Botany* 80, 1151-1159.
- Hamelin RC, Lecours N, Hansson P, Hellgren M & Lafiamme G (1996) Genetic differentiation within the European race of *Gremmeniella abietina*. *Mycological Research* 100, 49-56.
- Hamelin RC & Rail J (1997) Phylogeny of *Gremmeniella* spp. based on sequences of the 5.8S rDNA and internal transcribed spacer region. *Canadian Journal of Botany* 75, 693-698.
- Hamelin RC, Bourassa M, Rail J, Dusabenyagasani M, Jacobi V & Lafiamme G (2000) PCR detection of *Gremmeniella abietina*, the causal agent of *Scleroderris* canker of pine. *Mycological Research* 104(5), 527-532.
- Hantula J & Müller M (1997) Variation within *Gremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *Mycological Research* 101, 169-175.
- Heiniger U (1988) shoot dieback in subalpine reforestations in Switzerland, recent research on *Scleroderris* canker of conifers, IUFRO working Party S 2.06.02, Mitteilungen der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien Nr 162, 67-71.
- Hellgren M & Hogberg N (1995) Ecotypic variation of *Gremmeniella abietina* in Northern Europe: disease patterns reflected by DNA variation. *Canadian Journal of Botany* 73, 1531-1539.
- Hudler GW, Knudsen GR & Beale MAR (1984) Production and maintenance of conidia of *Gremmeniella abietina*. *Plant disease*, 68, 1065-1066.
- Lecours N, Toti L, Sieber TN & Petrini O (1994) Pectic enzyme patterns as a taxonomic tool

- for the characterization of *Gremmeniella* spp. isolates. Canadian Journal of Botany 72, 891-896.
- Marosy M, Patton RF & Upper CD (1989) Spore production and artificial techniques for *Gremmeniella abietina*. Phytopathology 79, 1290-1293.
- OEPP/EPPO (2006) EPPO Standards PM 7/77 Diagnostics. Documentation and reporting on a diagnosis. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 459- 460.
- Petaisto R-L, Rissanen TE, Harvima RJ & Kajander EO (1994) Analysis of the protein pattern of *Gremmeniella abietina* with special reference to protease activity. Mycologia 86, 242-249.
- Petaisto R-L, Uotila A, Hellgren M, Kaitera J & Tuomainen J (1996) Two types of the European race of *Gremmeniella abietina* can be identified with immunoblotting. Mycologia 88(4), 619-625.
- Petrini O, Petrini LE, Lafiamme G & Ouellette GB (1989) Taxonomic position of *Gremmeniella abietina* and related species: a reappraisal. Canadian Journal of Botany 67, 2805-2814.
- Santamaria O, Alves-Santos FN & Diez JJ (2005) Genetic characterization of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* isolates from Spain. Plant Pathology 54,331-338.
- Schlaepfer-Bernhard E (1968) Beitrag zur Kenntnis der Discomy cetengattungen *Godronia*, *Ascocalyx*, *Neogodronia* und *Encoeliopsis*. Sydowia 22, 44-48.
- Skilling DD, (1968) The Biology of *Scleroderris* Canker in the Lake States. Thesis. University Minneapolis, St Paul, Minnesota (US).
- Skilling DD & Kienzler M (1983) A Serological Procedure for Identifying Strains of *Gremmeniella abietina*. USDA Forest Service, St Paul, Minnesota (US), General Technical Report NC-87, 16 pp.
- Sutton BC, (1980) The *Coelomycetes*. CAB, Kew (GB). 617-618.
- Tuomivirta TT, Uotila A & Hantula J (2002) Two independent double-stranded RNA patterns occur in the Finish *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. Forest Pathology 32, 197-205.
- Uotila A, Kurkela T, Tuomivirta T, Hantula J & Kaitera J (2006) *Gremmeniella abietina* types cannot be distinguished using ascospore morphology. Forest Pathology 36, 395-405.
- Zeng Q-Y, Hansson P & Wang X-R (2005) Specific and sensitive detection of the conifer pathogen *Gremmeniella abietina* by nested PCR. BMC Microbiology 5, 65.

ZAŁĄCZNIK 1

Różnicowanie odmian i ras grzyba

Do celów kwarantannowych nie wymaga się różnicowania odmian i ras patogena.

Obecnie, wyróżnia się kilka odmian, ras i biotypów *G. abietina*, jednakże do celów kwarantannowych wystarczająca jest identyfikacja na poziomie gatunku. Należy zaznaczyć, że pomiędzy odmianami i rasami, jak również w obrębie ras wyróżnia się dodatkowe typy odpowiadające różnej agresywności i rodzajom chorób.

Do odmian grzyba należą:

- *abietina* (typowa), która jest najbardziej liczna i występuje w Europie, Ameryce Północnej i Azji na *Pinus* spp. i *Picea* spp.
- *balsamea*, która występuje na ograniczonym obszarze Ameryki północno-wschodniej,

głównie na *Abies balsamea* i *Picea* spp.
var. abietina jest dalej różnicowana na rasę północnoamerykańską, występuje na *Pinus banksiana* i *P. contorta*, rasę europejską (na *Pinus* spp., *Larix* spp. i *Picea* spp.) i rasę azjatycką (na *Abies sacchalinsensis*, Japonia).

W obrębie rasy europejskiej *G. abietina* zidentyfikowano cztery biotypy:

- A lub biotyp europejski (typ występujący na dużych drzewach głównie *Pinus sylvestris* i *Picea abies*, porażający duże drzewa, ale również sadzonki). Biotyp A został zawleczony do Ameryki Północnej i powoduje powiększające się uszkodzenia drzew iglastych.
- B lub biotyp fińsko-skandynawski (typ występujący na małych drzewach związany z *Pinus sylvestris* i *P. contorta*, porażający sadzonki oraz pędy długo przykryte okrywą śnieżną podczas zimy).
- Trzeci biotyp znany jako alpejski został opisany, jako *G. abietina* var. *cembrae*.
- W Hiszpanii, izolaty *G. abietina*, które zostały opisane w 2005 roku wyraźnie różnią się od dwóch biotypów: północnego i alpejskiego, co wskazuje na istnienie czwartego typu wewnątrz rasy europejskiej (Santamaria i wsp., 2005).

Biotypy A i B są zdolne do hybrydyzacji, ale ich potomstwo wykazuje niski stopień dopasowania.

Zgodnie z doniesieniami Tuomivirta i wsp., (2002) kilka izolatów biotypu A z rasy europejskiej *G. abietina* var. *abietina* zawierają dwuniciowy RNA (dsRNA), które może mieć pochodzenie wirusowe. Jednakże, testy patogeniczności nie wykazały żadnych różnic w agresywności pomiędzy izolatami z i bez dsRNA.

Dane molekularne podane przez Hamelin & Rail (1997) oraz Dusabenyagasani i wsp. (2002) wykazały, że taksonomia *Gremmeniella* w bliskiej przyszłości będzie podlegała większym zmianom i w efekcie odmiany będą opisane na poziomie gatunku.

Ze względu na powyższe można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Rasa azjatycka *G. abietina* var. *abietina* jest blisko spokrewniona z var. *Balsamea*
2. *Gremmeniella abietina* var. *balsamea* jest bardziej spokrewniona z *G. laricina* aniżeli z var. *abietina*.
3. Dywergencja pomiędzy *G. abietina* var. *abietina* i *G. laricina* są takie same, jak pomiędzy *G. abietina* var. *abietina* i var. *balsamea*.

Dlatego też oczekuje się, że te dwie odmiany *G. abietina* staną się nowymi odrębnymi gatunkami, a rasa azjatycka będzie należała do *balsamea*. Ponieważ oczekiwane zmiany w taksonomii gatunku są ciągle w toku obecna wersja protokołu odnosi się do aktualnego statusu taksonomicznego *G. abietina* ze zmianami oczekiwanymi w przyszłości.

Różnicowanie odmian

Morfologia

G. abietina var. *balsamea* różni się morfologicznie od var. *abietina* następującymi cechami: askospory są trochę większe (12,7-34 x 2,8-5,7 µm). Ponadto, mają długie zastrzone końce, ale cecha ta nie może być rozważana jako różnicująca, bowiem występuje również u *G. abietina* var. *abietina* (Uotila i wsp., 2006). Konidia są również większe u odmiany *balsamea* (21,7-53,7 x 1,8-4,2 µm) (Petrini i wsp., 1989).

Izozymy

G. abietina var. *balsamea* różni się od var. *abietina* zymogramem enzymów pektolitycznych (prążki poligalakturonazy, Lecours i wsp., 1994) oraz polimorfizmem małych podjednostek rybosomalnego DNA (Bernier i wsp., 1994).

Zróżnicowanie w obrębie ras *Gremmeniella abietina* var. *abietina*

Izozymy

Rasa północnoamerykańska *G. abietina* var. *abietina* wykazuje charakterystyczny stały prążek poligalakturonazy w zymogramie enzymów pektolitycznych w przeciwieństwie do ras europejskiej i azjatyckiej (Lecours i wsp., 1994). Rasa ta może być również odróżniona od innych ras na podstawie wzoru białek rozpuszczalnych w wodzie, wykazujących charakterystyczny prążek (6 prążek opisany w pracy Petrini i wsp., 1989).

Rasę azjatycką można odróżnić przy pomocy elektroforezy białek rozpuszczalnych w wodzie i przez immunoelektroforezę, ale nie na podstawie zymogramu enzymów pektolitycznych (Dorworth & Krywienczyk, 1975; Benhamou i wsp., 1984; Petrini i wsp., 1989; Lecours i wsp., 1994). Nie można jej odróżnić od innych na podstawie cech morfologicznych (Dorworth & Krywienczyk, 1975).

Elektroforeza białek rozpuszczalnych w żelu poliakryloamidowym

Benhamou i wsp., (1984) opracowali metodę do identyfikacji izolatów *G. abietina*. Z kolei metoda opracowana przez Petaisto i wsp. (1996) pozwala na zróżnicowanie pomiędzy europejską i amerykańską rasą *G. abietina* var. *abietina* (tzw. metoda SDS-PAGE), jak również pomiędzy biotypami rasy europejskiej (tzw. western blot).

Proteinogram SDS-PAGE

Petaisto i wsp. (1994) opisał metodę SDS-PAGE. W proteinogramach trzech ras obserwuje się niewielkie różnice. Rasa amerykańska może być odróżniona od europejskiej na podstawie obecności prążka białka o wielkości 2,5 kD, jednakże w obrębie rasy europejskiej nie obserwowano takiego zróżnicowania (Petaisto i wsp., (1996).

Immunoblotting (metoda służąca do identyfikacji antygenów)

Technika została opisana przez Petaisto i wsp. (1994). Powinowactwo oczyszczonych przeciwciał daje wyraźny podwójny prążek z typem B (lub z typem małych drzew) izolatów badanych metodą western blot. Nie obserwuje się podwójnych prążków u izolatów typu A lub izolatów rasy północnoamerykańskiej (Petaisto i wsp., 1996).

Inne immunologiczne metody wykrywania

Dorworth i Krywienczyk (1975) opracowali metodę identyfikacji różnych szczepów *G. abietina*. Metoda ta została zaadaptowana i zmodyfikowana przez Skilling & Kienzler (1983), którzy przedstawili ją w szczegółowej procedurze.

Załącznik 2

Podłoża agarowe stosowane do izolacji *G. abietina*

Testowano liczne podłoża agarowe do izolacji *G. abietina*. Najczęściej używane, to:

Pożywka *Gremmeniella*:

25 ml soku V8 (firmy Campbell's Soup), 15 g bacto-agaru, 7,5 g ekstraktu maltozowego i 475 ml wody destylowanej, rozlać do szalek Petriego w ilości 25 ml (Benhamou i wsp., 1984).

Doświadczenia przeprowadzone z innymi bogatymi podłożami agarowymi (np. agarem maltozowym i innymi podłożami opartymi o soki warzywne) wykazały podobne cechy wzrostu kultur (Cech, inf. ustna., 2009).

Pożywka V-8 wg Skilling i Kienzler (1983):

45 g agaru maltozowego, 200 ml niefiltrowanego soku V8 (Campbell's Soup) i 800 ml wody destylowanej.

Podłoże, szczególnie stosowane do pomiarów tempa wzrostu izolatów:

Dorworth & Krywienczyk, 1975:

200 ml przefiltrowanego soku V8 (Campbell's Soup), 20 g agaru Difco, 800 ml wody destylowanej, rozlać w ilości 25 ml na szalkę Petriego.

Podłoże stosowane do stymulacji zarodnikowania konidiów:

Z substratem z pszenicy:

10 g pszenicy i 25 ml wody destylowanej wymieszać w 100 ml kolbie Erlenmeyera

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Grażyna Szkuta (GIORiN CL)	Anna Wiśniewska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
29.10.2012	29.10.2012	