

## Diagnostyka Diagnostic

### *Melampsora medusae*

#### Zakres stosowania

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Melampsora medusae*.<sup>1</sup>

#### Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony we wrześniu, 2009 roku.

#### Wprowadzenie

Grzyb *Melampsora medusae* Thümen jest jednym ze sprawców rdzy topoli. Głównymi gatunkami w Europie powodującymi rdzę w uprawach topoli są *Melampsora larici-populina* i *Melampsora allii-populina*. Wszystkie trzy gatunki obficie wytwarzają na liściach urediniospory, co może prowadzić do przedwczesnych defoliacji i ograniczenia wzrostu. Po kilku latach silnych infekcji i powtarzających się defoliacji, patogen może stać się przyczyną większej podatności drzew na zamieranie, a nawet powodować śmierć drzew młodszych. Rdza powodowana przez grzyby z rodzaju *Melampsora* jest bardzo powszechną chorobą topoli, której skutkiem mogą być poważne straty ekonomiczne w uprawach komercyjnych, z powodu powstawania i rozprzestrzeniania się nowych patotypów *M. larici-populina*,

*M. medusae* pochodzi z Ameryki Północnej, skąd rozprzestrzenił się na inne kontynenty. W XX wieku poza USA, Kanadą i Meksykiem patogen rozprzestrzenił się w Europie (patrz poniżej), Ameryce Południowej (Boliwia, Brazylia, Chile), Południowej Afryce (Republice Południowej Afryki, Zimbabwe), Azji (Japonia), Oceanii (Australia, Nowa Zelandia). W regionie EPPO pojawienie się *M. medusae* odnotowano na ograniczonym obszarze w Belgii, Francji i Portugalii (EPPO, 1997).

Gospodarzami pierwszorzędowymi, na których wytwarzane jest stadium *telium* grzyba są drzewa należące do rodzaju *Populus* oraz ich mieszańce. Gospodarzami drugorzędowymi, na których grzyb wytwarza stadium *ecjum* są drzewa iglaste z rodzaju *Larix* (modrzew), *Pseudotsuga* (daglezja) i *Pinus* (sosna). Jednakże, w regionie EPPO grzyb nigdy nie został stwierdzony na żadnym z gospodarzy drugorzędowych (Pinon, 1986; EPPO/CABI, 1997).

---

<sup>1</sup>Użyte w standardach EPPO nazwy odczynników lub wyposażenia nie znaczą wykluczenia innych, które również mogą być stosowane.

Dotychczas w Europie opisano osiem gatunków z rodzaju *Melampsora* porażających topole (Pinon, 1973; Cellerino, 1999). Jakkolwiek tylko trzy z nich: *M. larici-populina*, *M. allii-populina*, *M. medusae* są patogeniczne dla topoli należących do sekcji *Aigeiros* i *Tacamahaca*, tj. *Populus nigra*, *P. deltoides*, *P. trichocarpa* ich międzygatunkowych mieszańców (Frey i wsp., 2005). W Europie większość uprawianych topoli stanowią mieszańce *P. x euramericana* (*P. deltoides* x *P. nigra*) i *P. x interamericana* (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*). Ponadto, Shain (1988) udowodnił istnienie dwóch form specjalnych w obrębie gatunku *M. medusae* i nazwał je *M. medusae* f. sp. *deltoidae* i *M. medusae* f. sp. *tremuloidae*, ze względu na ich pierwotnego gospodarza, odpowiednio *P. deltoidae* i *P. tremuloidae*. Ani dyrektywa Unii Europejskiej ani EPPO nie rozróżnia tych dwóch form specjalnych, tylko odnosi się do *M. medusae*. Niemniej jednak, od czasu gdy *M. medusae* został odnotowany w Europie tylko na topolach należących do sekcji *Aigeiros* i *Tacamahaca* i mając na uwadze specjalizację związaną z rośliną żywicielską, można stwierdzić, że do tej pory odnotowano w Europie tylko obecność *M. medusae* f. sp. *deltoidae* (Pinon, 1991; Pinon & Frey, 2005).

Pięć innych gatunków, *M. larici-tremulae*, *M. magnusiana*, *M. pinitorqua*, *M. rostrupii* i *M. pulcherrima*, są tylko patogeniczne w stosunku do gatunków z sekcji *Populus* dawniej *Leuce*) także nazywanych „osiką”: *P. alba*, *P. tremula* oraz ich mieszańców (Frey i wsp., 2005). W literaturze naukowej cztery pierwsze taksony są czasem połączone w jeden kompleks *M. populnea* (Pers.) P. Karst, ale aktualnie w oparciu o filogenezę wielogenową, kompleks ten może być wyraźnie podzielony na różne grupy (Feau i wsp., 2009). Od czasu jak „osikowe” gatunki nie są powszechnie uprawiane w celach komercyjnych i rosną w Europie głównie jako dzikie lub ozdobne drzewa, obecność tych pięciu gatunków *Melampsora* na *P. alba*, *P. tremula* i ich mieszańcach ma znacznie mniejsze znaczenie ekonomiczne (Frey i wsp., 2005) niż mogłoby mieć wprowadzenie do Europy *M. medusae* f. sp. *tremuloidae*.

Ponadto, warto odnotować, że *M. medusae* f. sp. *deltoidae* tworzy mieszańce międzygatunkowe z innymi gatunkami z rodzaju *Melampsora*. Pierwszy *M. medusae* – *populina* został odkryty w 1991 w Nowej Zelandii (Spiers & Hopcroft, 1994) międzygatunkowy mieszaniec *M. medusae* i *M. larici-populina* a następnie znaleziony w Afryce Południowej (Frey i wsp., 2005). Drugi, *M. x columbiana*, międzygatunkowy mieszaniec *M. medusae* i *M. occidentalis*, został odkryty w 1995 na północno – zachodnim Pacyfiku Stanów Zjednoczonych (Newcombe i wsp., 2000). Chociaż żaden z tych mieszańców nie został do tej pory odnotowany w regionie EPPO, szczególną uwagę należy zwrócić w rejonach, gdzie występuje *M. medusae* i *M. larici-populina*.

## Tożsamość

**Nazwa:** *Melampsora medusae* Thümen

Nazwy makrocyklicznych stadiów rozwojowych: *Caeoma faulliana* Hunter (stadium ecjo), *Uredo medusae* Thümen (stadium uredio).

**Synonim:** *Melampsora albertensis* J.C. Arthur

**Stanowisko taksonomiczne:** *Fungi: Basidiomycota: Uredinales*

**Nazwa zwyczajowa:** Rdza topoli

Informacje dotyczące taksonomii i nazewnictwa: patrz sekcja wprowadzenie

**Komputerowy kod EPPO:** MELMME

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO A2/74 UE I/AI

## Wykrywanie

### Objawy

Objawy chorobowe na roślinie żywicielskiej (stadium telium) wywołane przez grzyby, sprawców rdzy topoli, pochodzących z Europy (*M. allii-populina*, *M. larici-populina*) są trudne do odróżnienia od objawów spowodowanych przez *M. medusae* i nie są wystarczające dla postawienia prawidłowej diagnozy.

*Objawy chorobowe na roślinie żywicielskiej, na której wytwarzane jest stadium telium (topola).*

Wczesnym objawem infekcji wywołanej przez grzyby z rodzaju *Melampsora*, sprawców rdzy, bez względu na gatunek, są żółtawe plamy (uredinia wypełnione masą urediniospor, fot. nr 1) na spodniej stronie liścia wzdłuż nerwu (fot. nr 2). Uredinia mogą być rozproszone na powierzchni liści lub w skupiskach, tak że cała powierzchnia wygląda jak posypana żółto-pomarańczowym pudrem (fot. nr 3). W sprzyjających warunkach klimatycznych, podczas całego sezonu wegetacyjnego tworzą się liczne bezpłciowe stadia z urediniami i urediniosporami. Po pierwotnym zakażeniu, w warunkach dużej wilgotności urediniospory są łatwo przenoszone przez wiatr w obrębie całej korony drzewa i w pobliże podatnych drzew. Przy silnej infekcji uredinia mogą obejmować całą powierzchnię liścia, nadając mu złoty wygląd i powodować częściową lub całkowitą defoliację. Późnym latem do połowy jesieni po obu stronach liści pojawiają się telia (skupienia zarodników), małe, brązowe do czarnych wyglądem przypominające krosty. Telia zawierają ogromną liczbę grubościennych zarodników spoczynkowych (teliospor), które zimują na opadłych liściach i kiełkują następną wiosną w podstawkę, na której tworzą się bazidiospory. Położenie telium jest zróżnicowane i zależne od gatunku. *M. medusae* i *M. allii-populina* tworzy telia głównie pod epidermą, podczas gdy u *M. larici-populina* obserwuje się je między kutikulą a komórkami epidermy.



**Fot. nr 1** Uredinia grzyba z rodzaju *Melampsora* na spodniej powierzchni liścia topoli (dzięki uprzejmości P. Frey, INRA Nancy, Fr).



**Fot. nr 2** Typowe objawy rdzy na liściu topoli (uredinia) spowodowane przez grzyb z rodzaju *Melampsora* (dzięki uprzejmości P. Frey, INRA Nancy, Fr).



**Fot. nr 3** Młoda topola silnie zainfekowana przez grzyb z rodzaju *Melampsora* - sprawcę rdzy (dzięki uprzejmości P. Frey, INRA Nancy, Fr).

Ponieważ *M. medusae* jest gatunkiem heteroecjalnym, jak *M. larici-populina* i *M. allii-populina*, potrzebuje gospodarza drugorzędowego, na którym wytwarza stadium ecjum do zimowania w stadium seksualnym. Nie ma dowodów, że w klimacie umiarkowanym *M. medusae* przeżywa w stadium uredinium. Jednakże, uważa się, że *M. medusae* zimuje w



Australii w stadium bezpłciowym dzięki tzw. „zielonemu mostowi” który tworzą zimozielone topole (Wilkinson & Spiers, 1976). W krajach EPPO grzyb *M. medusae* jest odnotowany tylko na topoli i do tej pory nie był nigdy obserwowany na potencjalnych gospodarzach drugorzędowych.

*Objawy chorobowe na roślinie żywicielskiej, na której wytwarzane jest stadium ecjum (drzewa z rodzaju Larix, Pseudotsuga, Pinus).*

Bazidiospory infekują wiosną gospodarzy drugorzędowych zakażając igły i produkując jasnożółte plamy (spermogonia) na górnej powierzchni. W ciągu kilku dni, po plazmogamii pojawiają się na dolnej stronie liści jasno żółte uwypuklenia (ecja). Struktury te najlepiej rozwijają się na tegorocznych igłach, ale można je obserwować, chociaż rzadko na szyszkach drzew iglastych lub na młodych pędach. Ecja produkują dużą liczbę żółtych ecjospor, ułożonych w łańcuchy. Wiosną przenoszone przez wiatr ecjospory infekują podatne rośliny z rodzaju *Populus*, następnie grzyb tworzy urediniospory i w ten sposób zamka swój cykl życiowy.

### Procedura pobierania próbek

Ponieważ stadium ecjum grzyba *M. medusae* nigdy nie zostało odnotowane na drzewach iglastych w regionie EPPO, procedura pobierania próbek ogranicza się do drzew topoli, gdzie prawdopodobieństwo wykrycia grzyba będzie najwyższe. Ponieważ, wymiary, kształt i inne morfologiczne cechy teliospor *M. medusae* nie wykluczają innych rodzimych gatunków *Melampsora* na topoli, powinny być zbierane tylko liście topoli, na których znajdują się urediniospory. Inspekcje najlepiej przeprowadzić wczesnym latem, kiedy symptomy choroby są najbardziej widoczne i ilość urediniospor na najwyższym poziomie. W celu analizy, zainfekowane liście mogą być bezpośrednio przesyłane do laboratorium. Do badań molekularnych zaleca się zeszkrobać skalpelem lub szpatułką urediniospory z liści i przenieść do sterylnych probówek (fot. nr 4).



**Fot. nr 4** Pobieranie urediniospor przy pomocy skalpela (dzięki uprzejmości P. Loevenbruck, LNPV Malzéville, FR).

**Tabela nr 1** Morfologiczna charakterystyka urediniospor i parafiz dla *Melampsora* spp. występującego na topoli.

Gatunki infekujące topole, należące do sekcji <i>Aigeiros</i> i <i>Tacamahaca</i>				<i>Melampsora</i> spp. z sekcji <i>Populus</i> *** infekujące topole
<i>Melampsora medusae</i>	<i>Melampsora larici-populina</i>	<i>Melampsora allii-populina</i>		
<b>Urediniospory</b>				
Kształt	głównie elipsoidalny do jajowatego	głównie gruszkowaty	głównie elipsoidalny do jajowatego	-
Rozmiar (µm)	26-35 x 15-19* 22-36 x 13-21**	30-44 x 14-19* 30-42 x 13-20**	24-38 x 12-19**	-
Część szczytowa	kolczasta	gładka	gładka	kolczasta
Część ekwatorialna	częściowo gładka lub gładka	kolczasta	kolczasta	kolczasta
Ściana	pogrubiona w części ekwatorialnej	pogrubiona w części ekwatorialnej	równomiernie gruba	-
<b>Parafizy</b>				
Kształt	główkowaty maczugowaty	maczugowaty	główkowaty	-
Rozmiar	≤70* 32-58**	65-75* 40-70**	50-60**	-
Rozmiar wierzchołka główki(µm)	14-17* 9-15**	14-21* 14-18**	14-22**	-
Ściana	równomiernie gruba	pogrubiona na szczycie	równomiernie gruba	-

\*Według opisu CMI grzybów patogenicznych i bakterii dla *M. medusae*, *M. larici-populina* i *M. allii-populina*, odpowiednio.

\*\* Według Pinon, 1973. \*\*\* Dla rodzaju *Melampsora* infekującego osiki (np. *P. tremula*, *P. alba*) w Europie (*M. larici-tremulae*, *M. magnusiana*, *M. pinitorqua*, *M. pulcherrima* i *M. rostrupii*), określenie wymiarów i kształtów nie jest konieczne, ponieważ gatunki te są równomiernie pokryte kolcami.

## Identyfikacja

pozytywna identyfikacja grzyba powinna być jednoznacznie określona przez jedną z następujących czynności:

- morfologiczną identyfikację: obecność urediniospor pokrytych kolcami z typową gładką częścią środkową, z ekwatorialnymi zgrubieniami ściany i obecność parafiz o kształcie główkowatym lub maczugowatym o ścianie bez zgrubień. Wymiary urediniospor i parafiz powinny odpowiadać wymiarom podanym w tabeli nr 1,
- konwencjonalny PCR, spełniający kryteria wymienione w załącznikach 1 i 2.

## Charakterystyka morfologiczna

Pojedyncze urediniospory pobiera się z zainfekowanych liści za pomocą sterylnej jałowej igły, zawieszają w kwasie mlekowym, laktofenolu i laktoglicerolu (zastosowanie wody nie jest rekomendowane, ponieważ może wpływać na kształt i rozmiar urediniospor) i przegląda pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu od 400 do 1000x. Przegląda się co najmniej 10 urediniospor i parafiz na uredinium i mierzy w dwóch wymiarach. Należy uważnie przyjrzeć się ich kształtowi i rozmieszczeniu kolców. Jako, że kilka gatunków równocześnie może być obecne na pojedynczym liściu, ważne jest aby zbadać każde zebrane uredinium osobno. Stosując tę metodę nie można odróżnić dwóch form specjalnych grzyba *M. medusae*, gdyż mają identyczne, trudne do odróżnienia cechy morfologiczne i mogą być rozróżnione tylko na podstawie ich odpowiedniego zakresu żywicielskiego (Shain, 1988).

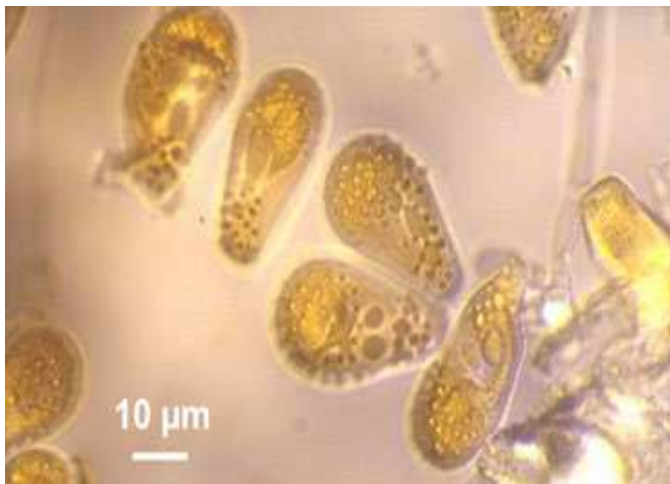
Urediniospory grzyba *M. medusae* są jajowate do owalnych lub niekiedy gruszkowate, o zaokrąglonym szczycie, zwężone u nasady z żółto-żółtą zawartością. Wymiary urediniospor to (23) 26-35 (37) x 15-19 (21)  $\mu\text{m}$ . Ściana bezbarwna o grubości 1-1,5  $\mu\text{m}$ , powyżej 2  $\mu\text{m}$  u nasady i często w części ekwatorialnej grubsza [3-5 (5,5)]. Powierzchnia ściany pokryta kolcami za wyjątkiem charakterystycznej gładkiej części środkowej, zwykle obejmującej połowę do trzech czwartych zarodnika (fot. nr 5).

Parafizy główkowate, o długości do 70  $\mu\text{m}$  i średnicy główki 4-6  $\mu\text{m}$ . Szczyt główki prawie kulisty, o średnicy 14-17 (19)  $\mu\text{m}$  lub owalny do rzadziej maczugowaty 18-22 x 12-16  $\mu\text{m}$ . Ściany są równomiernie grube (1,5-3  $\mu\text{m}$ ) lub sporadycznie nieco grubsze na szczycie (4  $\mu\text{m}$ ). (CMI, 1975).

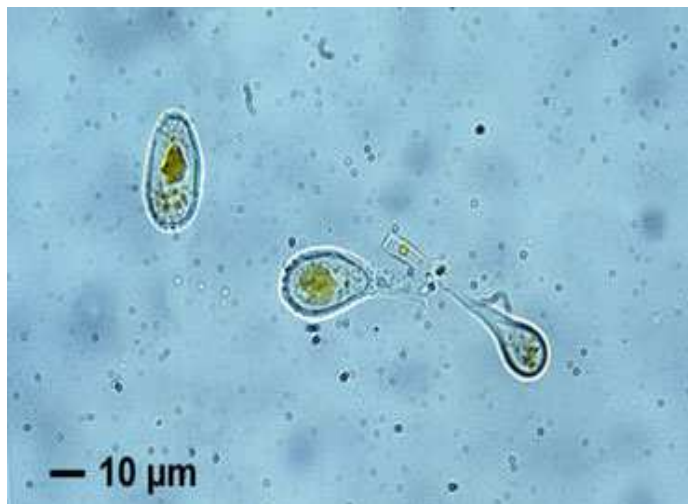
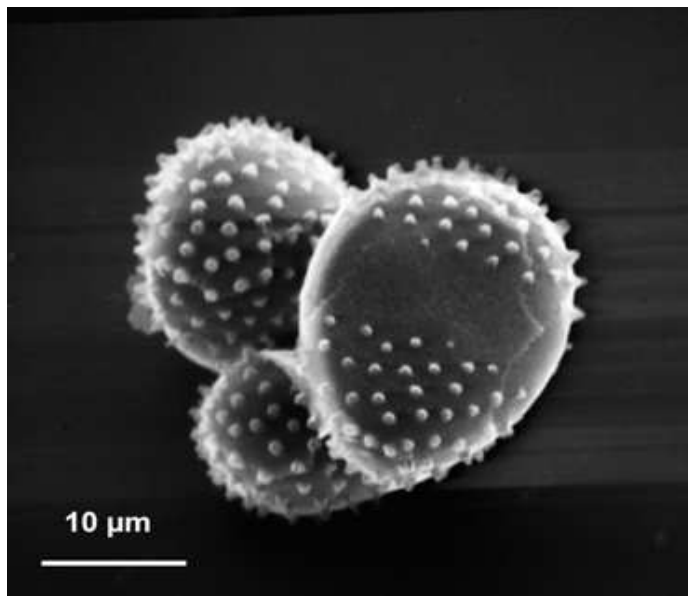
Połączenie cech urediniospor, kształtu, rozmieszczenia kolców i grubości ściany jest charakterystyczne dla *M. medusae* (tabela nr 1, fot. nr 6-8).

Urediniospory *M. medusae* mają gładką część ekwatorialną; *M. larici-populina* i *M. allii-populina* mają gładką część szczytową zarodnika, wszystkie inne gatunki z rodzaju *Melampsora* stwierdzane tylko na osikach mają powierzchnię równomiernie pokrytą kolcami (*M. pulcherrima*, *M. pinitorqua*, *M. larici-tremulae*, *M. rostrupii*, *M. magnusiana*). Dlatego też na podstawie cech morfologicznych opisanych w tabeli nr 1 można odróżnić grzyba *M. medusae* od innych gatunków z rodzaju *Melampsora* występujących w Europie.

Metoda ta jest prosta, wymaga minimalnych umiejętności taksonomicznych i posiadania mikroskopu świetlnego. Pomimo, że jest wysoce specyficzna, może być trudno wykryć kilka urediniospor grzyba *M. medusae* w dużej masie urediniospor należących do innych gatunków z rodzaju *Melampsora* i w takim przypadku można rozważyć zastosowanie metod molekularnych.

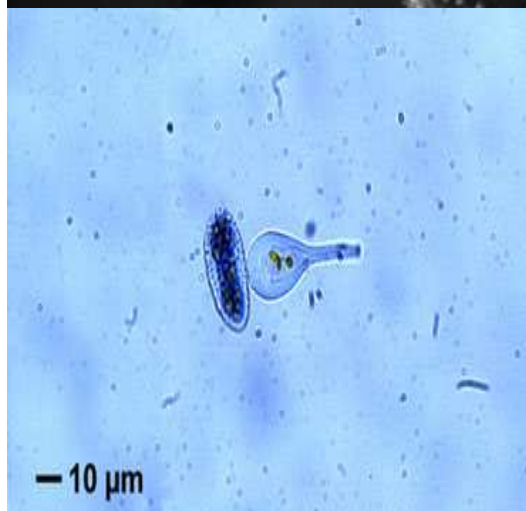
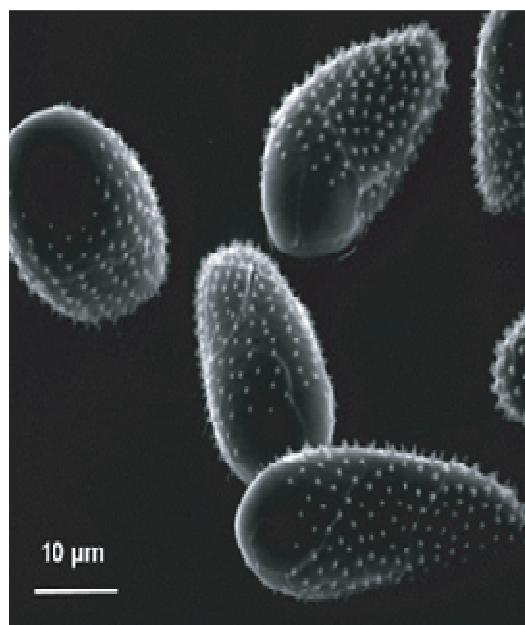
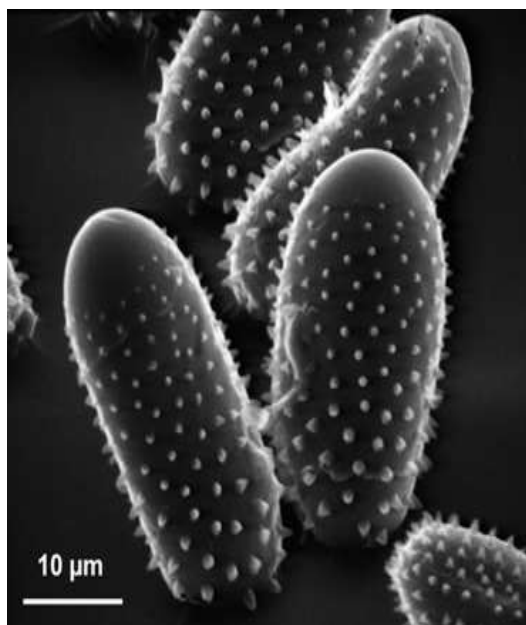


**Fot. nr 5** Urediniospory grzyba *Melampsora medusae* f. sp. *deltoideae* z typową gładką częścią ekwatorialną (dzięki uprzejmości Hubert J, LNPV, Malzeville, FR).



**Fot. nr 6** (A) Urediniospory *Melampsora medusae* f. sp. *deltoideae* obserwowane przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego (dzięki uprzejmości Le Thiec D, INRA Nancy, FR) i (B) parafizy i urediniospory *M. medusae* f. sp. *deltoideae* obserwowane przy użyciu mikroskopu świetlnego (dzięki uprzejmości Frey P, INRA Nancy, FR).





**Fot. nr 7** (A) Urediniospory *Melampsora larici-populina* obserwowane przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego (dzięki uprzejmości Le Thiec D, INRA Nancy, FR) i (B) parafizy i urediniospory *Melampsora larici-populina* obserwowane przy użyciu mikroskopu świetlnego (dzięki uprzejmości Frey P, INRA Nancy, FR).

**Fot. nr 8** (A) Urediniospory *Melampsora allii-populina* obserwowane przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego (dzięki uprzejmości Le Thiec D, INRA Nancy, FR) i (B) parafizy i urediniospory *Melampsora allii-populina* obserwowane przy użyciu mikroskopu świetlnego (dzięki uprzejmości Frey P, INRA Nancy, FR).

## Metody molekularne

*Metoda A* (Husson i wsp., 2003) (załącznik nr 1)

Husson i wsp. (2003, 2009) opisali dla gatunków z rodzaju *Melampsora* szereg par starterów opartych o region rDNA, szczególnie docelowy region ITS grzyba *M. allii-populina* (ITS – Map F/R) *M. larici – populina* (ITS-Mlp-F/R) i *M. medusae* f. sp. *deltoidae* (ITS-Mmd-F/R). Poza tym, analiza sekwencji ITS grzyba *M. medusae* f. sp. *tremuloidae* wykazała, że DNA uzyskane z form specjalnych może być z powodzeniem powielane w reakcji PCR z

zastosowaniem starterów ITS-Mmd-F/R, ponieważ docelowe sekwencje są identyczne dla obu *form specjalnych* (R. Ioos, LNPV, obserwacje własne).

#### Metoda B (Bourassa i wsp., 2005) (załącznik nr 2)

Bourassa i wsp. (2005) opracowali dwa markery PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) pochodzące z SCARs wyizolowanych z grzyba *M. medusae* f. sp. *deltoidae*. Początkowo opracowane dla genotypowania izolatów *M. medusae* f. sp. *deltoidae*, dwie pary starterów (docelowo locus 'A', 502 pz, i locus 'B', 594 pz. odpowiednio) mogą być także użyteczne do wykrywania tego taksonu. Zastosowanie obu par starterów dało pozytywne sygnały dla *M. medusae* f. sp. *tremuloidae*, za wyjątkiem kilku szczepów, z których uzyskane DNA nie amplifikowało się lub wydajność PCR była zbyt niska (DL Joly i N Feau, Canadian Forest Service, informacja ustna).

#### Zalety i wady metody molekularnej A i B

Wykrycie obu *form specjalnych* grzyba *M. medusae* z zastosowaniem analizy molekularnej umożliwia jednocześnie zbadanie wielu próbek, z których każda zawiera tysiące urediniospor (1mg = średnio  $4 \times 10^5$  zarodników), co nie jest osiągalne przy identyfikacji morfologicznej. Metody te są bardzo czułe i selektywne, ze względu na możliwość zbadania dużej liczby urediniospor, w porównaniu do metody morfologicznej. Niemniej jednak, stosując metodę A można uzyskać wyniki fałszywie pozytywne, jeśli uredinia są zebrane z liści osiki (*P. tremula* lub *P. alba*) zainfekowanej przez *M. larici-tremulae* lub *M. pinitorqua*. Podobnie, fałszywie negatywne wyniki można uzyskać przy zastosowaniu metody B dla niektórych szczepów zarówno *M. medusae* f. sp. *deltoidae* jak i *M. medusae* f. sp. *tremuloidae*. Analityczną specyficzność różnych starterów przedstawia tabela nr 2.

Tabela nr 2 Sekwencje i specyficzność różnych starterów

Starter	Sekwencja (5'-3')	Wielkość produktu (bp)	Region	Specyficzność							
				Mmd a*	Mmt b**	Mlp c*	Map d*	Mlt e**	Mp f**	Mr g**	
ITS-Mmd-F ITS-Mmd-R	GAG TTG CTT AAA TGC GAT TC CTA AAG GTA AAT TCA ATG GG	575	ITS region	+	+	-	-	+	+	-	
c1c3a2f c1c3a2r	GGG GGT CTT TAG GAC AAA TTC GAG CCA GCA TGA AAC AC	502	'locus A'\$	+§	+§	-	-	-	-	-	
c1c3a3f 5	TTC GAG CCA GAA GTT GTT TC TTC GAG CCA GGA TCA CTT	594	'locus B'\$	+	+§	-	-	-	-	-	
ITS1 ITS4	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	660-680&	ITS region	+	+	+	+	+	+	+	

a *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*

b *Melampsora medusae* f. sp. *tremuloidae*

c *Melampsora larici-populina*

d *Melampsora allii-populina*

e *Melampsora larici-tremulae*

f *Melampsora pinitorqua*

g *Melampsora rostrupii*.

\* Gatunki występujące tylko na topolach z sekcji *Aigeiros* i *Tacamahaca* lub ich mieszańcach

\*\* Gatunki występujące tylko na topolach z sekcji *Populus*

& Zależnie od gatunku *Melampsora*.

§ Nieznana lokalizacja, pojedyncza kopia locus (Bourassa i współ., 2005)

§ Za wyjątkiem kilku izolatów (puste allele lub niska wydajność PCR).

## Kultury referencyjne

Kultury referencyjne nie są dostępne.

Kontrole pozytywne uzyskane w wyniku subklonowania dla metody molekularnej A i B można uzyskać na prośbę, kontaktując się mailowo z R. Ioos ( LNPV, FR) (patrz adres poniżej)

## Sprawozdawczość i dokumentacja

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

## Informacje dodatkowe

Więcej informacji o tym organizmie można uzyskać od:

Dr R Ioos, Laboratoire National de la Protection des Ve'ge'taux (LNPV), Station de Mycologie, Domaine de Pixe're'court, BP 90059, F54220 Malze'ville (FR). e-mail: renaud.ioos@agriculture.gouv.fr

Dr P Frey, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Interactions Arbres - Microorganismes, 54280 Champenoux (FR). e-mail: frey@nancy.inra.fr

## Podziękowania

Niniejszy protokół został w oryginale opracowany przez:

Ioos R, Laboratoire National de la Protection des Ve'ge'taux, Malze'ville (FR), Frey P and Husson C, Institut National de la Recherche Agronomique, Nancy (FR).

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

Bourassa M, Bernier L & Hamelin RC (2005) Direct genotyping of the poplar leaf rust fungus, *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*, using codominant PCR-SSCP markers. *Forest Pathology* 35, 245–261.

Cellerino GP (1999) *Review of poplar diseases*. International Poplar Commission, FAO. Available at: <http://www.efor.ucl.ac.be/ipc/pub/celle01/celle01.htm> (Accessed on 25 February 2008).

CMI (1975) *Melampsora medusae*. IMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No 480. Commonwealth Mycological Institute, Kew (GB).

EPPO (1997) PQR, Plant Quarantine data Retrieval System. Available from <http://www.eppo.org/Databases/databases.htm>

EPPO /CABI (1997) *Melampsora medusae*. Quarantine pests for Europe, 2nd edn, pp. 811–815. CAB International, Wallingford (GB).

Feau N, Vialle A, Allaire M, Tanguay P, Joly DL, Frey P *et al.* (2009) Fungal pathogen (mis-) identifications: a case study with DNA barcodes on *Melampsora* rusts of aspen and white poplar. *Mycological Research* 113, 713–724.

Frey P, Ge'rrard P, Feau N, Husson C & Pinon J (2005) Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. In: *Rust Diseases of Willow and Poplar* (Ed. Pei MH & Mc Cracken AR), pp. 63–72, CAB International, Wallingford (GB).

- Henrion B, Chevalier G & Martin F (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* **98**,37–43.
- Husson C, Frey P, Boussoel N, Loevenbruck P & Pinon J (2003) *Deux me´thodes de diagnostic mole´culaire des espe`ces de Melampsora, agent de la rouille foliaire des peupliers*. Journe´es du re´seau de Mycologie de la Socie´te´ Franc¸aise de Microbiologie, Nancy, 15–17January 2003.
- Newcombe G, Stirling B, McDonald S & Bradshaw HD (2000) *Melampsora columbiana*, a natural hybrid of *M. medusae* and *M. occidentalis*. *Mycological Research* **104**, 261–274.
- Pinon J (1973) Les rouilles du peuplier en France. Syste´matique et re´partition du stade ure´dien. *European Journal of Forest Pathology* **3**, 221–228.
- Pinon J (1986) Situation de *Melampsora medusae* en Europe. *EPPO Bulletin* **16**, 547–551.
- Pinon J (1991) Ele´ments de re´partition des rouilles des peupliers cultive´s en France. *Comptes-Rendus de l'Acade´mie d'Agriculture de France* **77**,109–115.
- Pinon J & Frey P (2005) Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: *Rust Diseases of Willow and Poplar* (Ed. Pei MH & McCracken AR), pp. 139–154. CAB International, Wallingford (GB).
- Shain L (1988) Evidence for *formae speciales* in the poplar leaf rust fungus *Melampsora medusae*. *Mycologia* **80**, 729–732.
- Spiers AG & Hopcroft DH (1994) Comparative studies of the poplar rusts *Melampsora medusae*, *M. larici-populina* and their interspecific hybrid *M. medusae-populina*. *Mycological Research* **98**, 889–903.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Method and Applications* (Ed. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ), pp. 315–322. Academic Press, New York, NY(US).
- Wilkinson AG & Spiers AG (1976) Introduction of the poplar rusts *Melampsora larici populina* and *M. medusae* to New Zealand and their subsequent distribution. *New Zealand Journal of Science* **19**, 195–198.

## **Załącznik 1. Metoda A: Identyfikacja PCR konwencjonalnym z użyciem starterów ITS ( Husson i wsp., 2003)**

### *1. Informacje ogólne*

Husson i wsp. (2003) opisał technikę opartą na konwencjonalnym PCR zaprojektowanym dla rDNA Internal Transcribed Spacers (ITS) w celu identyfikacji *M. medusae* f. sp *deltoidae* z urediniospor zebranych z liści topoli, nawet w mieszaninie z innymi gatunkami.

Startery do PCR obejmują dwa regiony w obrębie ITS i produkują amplikon o wielkości 575 pz. z DNA wyizolowanego z *M. medusae* f. sp *deltoidae* (sekwencja dla regionu ITS dla *M. medusae* f. sp *deltoidae* może być uzyskana z Genbank, numery akcesyjne od AY375273 do AY375275).

Specyficzny region ITS jest amplifikowany z DNA *M. medusae* f. sp *deltoidae* przy zastosowaniu pary starterów ITS-Mmd-F (forward) i ITS –Mmd-R (reverse) (Tabela 2). Reakcja PCR z powodzeniem dała produkt o wielkości 575 pz. z DNA uzyskanego z izolatów grzyba *M. medusae* f. sp *deltoidae* zebranego z różnych kontynentów i różnych odmian hybrydowych topoli (*P. x interamericana*, *P. x euramericana*) (Husson i wsp., 2003).

Próg detekcji oszacowano na mniej niż 50 urediniospor *M. medusae* f. sp *deltoidae* do  $8 \times 10^5$  urediniospor *M. larici-pupulina* (Husson i wsp., 2003).

Metoda ta jest właściwa do wykrywania grzyba *M. medusae* f. sp *deltoidae* na topolach należących do sekcji *Aigeiros* i *Tacamahaca*. Przeciwnie, przy wykrywaniu grzyba *M. medusae* f. sp *tremuloidae* metodą PCR nie powinno się stosować starterów ITS-Mmd-F/R bowiem dają reakcję krzyżową z DNA wyizolowanym z dwóch innych endemicznych gatunków *Melampsora* infekujących osiki (*P. tremula* i *P. alba*), w szczególności *M. pinitorqua* i *M. larici-tremulae* (patrz Tabela 2). Jednakże, chociaż te ostatnie gatunki infekują osiki, to nie są patogeniczne dla topoli z sekcji *Aigeiros* i *Tacamahaca*. Z tego też powodu uredinia grzyba *M. pinitorqua* i *M. larici-tremulae* nie mogą być znajdowane na topolach uprawnych i nie powinny dawać wyników fałszywie pozytywnych w opisanym przypadku.

## 2. Metody

### Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.

Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego uzyskanego z urediniospor może być prowadzone przy użyciu buforów do lizy przygotowanych samodzielnie i organicznych roztworów rozpuszczalnika, takich jak przy metodzie CTAB/fenol-chloroform opisanej przez Henrion i wsp., (1994) lub przy zastosowaniu dostępnych komercyjnych zestawów do izolacji z roślin z użyciem np. kulek pokrytych silikonem lub obracających się kolumn z membrana krzemionkową.

W przypadku obu technik zebrane urediniospory (1-2 mg) przenosi się do probówek i mechanicznie uszkadza przez dodanie 100  $\mu$ l buforu lizującego i zastosowanie 10 sterylnych szklanych kuleczek o średnicy 3mm (5 minut na obrotowej wstrząsarce, 2000 rpm) lub użycie 2 sterylnych metalowych lub wolframowo-karbidowych kulek o średnicy 3 mm (1 min w homogenizatorze, 30Hz). Następnie, dodaje się kolejne 300  $\mu$ l buforu lizującego i ekstrahuje DNA zgodnie z metodą opracowaną przez Henrion i wsp., (1994) lub w przypadku stosowania komercyjnych zestawów do izolacji DNA, zgodnie z instrukcją producenta. Całkowitą ilość DNA wymywa się przy zastosowaniu 100  $\mu$ l buforu do elucji lub Tris EDTA (10mM Tris HCL, pH 8, 1mM EDTA, pH 8) i bezpośrednio stosuje jako matrycę do reakcji PCR.

### Reakcja PCR

Specyficzny region grzyba *M. medusae* f.sp *deltoidae* jest amplifikowany przy zastosowaniu techniki PCR w sposób następujący:

Mieszanka do reakcji PCR zawiera:

- 1x bufor do PCR dostarczony wraz z polimerazą DNA,
- 1.5 mM  $MgCl_2$ ,
- 0.2  $\mu$ M startery ITS-Mmd-F, ITS-Mmd-R
- 250  $\mu$ M dNTP,
- 0.0375 U/  $\mu$ l polimerazy DNA,
- 200-300 ng matrycy DNA,
- Wodę do analiz molekularnych dodaje się do uzyskania objętości końcowej (20  $\mu$ l).

Woda powinna być oczyszczona (dejonizowana lub destylowana), sterylizowana przez autoklawowanie lub filtrowana z użyciem filtra o wielkości porów 0,2  $\mu$ m, wolna od nukleaz.



Reakcja PCR powinna być prowadzona w termocyklerze z pokrywą grzewczą i zawierać etap wstępnej denaturacji w temperaturze 95°C przez 3 minuty (zwiększony do 10 minut jeśli stosuje się tzw. „hotstart” polimerazę DNA) następnie 30 cykli denaturacji, przyłączania starterów i elongacji przez 30 sekund w temp. 95°C, 30 sekund w temp. 50°C, i 1 minutę w temp. 72 °C, odpowiednio i końcowy etap wydłużania w temp. 72 °C przez 7 minut.

Produkty PCR są rozdzielane przy wykorzystaniu techniki elektroforezy w 1% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Matryca DNA zawierająca amplifikowalne DNA z grzyba *M. medusae* f. sp. *deltoidae* w reakcji PCR ze starterami ITS-Mmd-F/ITS-Mmd-R da produkt o wielkości 575 par zasad.

### 3. Niezbędne informacje proceduralne

**Negatywna kontrola ekstrakcji DNA** (tzw. próba ślepa) powinna być dołączona do każdej serii izolacji DNA w celu zapewnienia braku kontaminacji podczas tego etapu.

**Negatywna kontrola PCR** nie zawierająca badanego DNA, powinna być dołączona w każdym teście w celu zapewnienia braku kontaminacji podczas PCR.

**Pozytywna kontrola PCR** – powinna być stosowana (produkt amplifikacji DNA z subklonowanego *M. medusae* f. sp. *deltoidae* ze starterami ITS-Mmd-F/R). Kontrola pozytywna powinna odpowiadać ustalonym limitom detekcji testu PCR (LOD, limit detekcji). **Limit detekcji dla kontroli pozytywnej**<sup>2</sup> powinien być zawarty w celu oszacowania wydajności PCR i zapewnienia, że negatywne wyniki są następstwem niskiego poziomu lub braku produktu docelowego reakcji PCR w próbce DNA, niż nie wystarczającej wydajności reakcji PCR.

Jakość ekstraktu DNA powinna być oszacowana przez zastosowanie odpowiedniego przyrządu np. spektrofotometru lub przez sprawdzenie ekstraktu DNA w reakcji PCR ze starterami ITS1 i ITS4 (White i wsp., 1990). W tym przypadku, warunki reakcji PCR są takie, jak opisano powyżej, należy tylko zamienić startery ITS-Mmd-F/R na ITS1 i ITS4 (tabela 2) i obniżyć temperaturę przyłączania do 50°C. Pozytywny sygnał (średnio 660-680 pz.) uzyskany w tym teście może znaczyć, że ekstrakt DNA był amplifikowalny: DNA zostało wyekstrahowane z sukcesem i poziom inhibitorów reakcji PCR był dostatecznie niski. Dodatkowe dowody braku znaczącej inhibicji w reakcji PCR mogą być dostarczone poprzez stosowanie ad hoc **wewnętrznej kontroli amplifikacji**.

Interpretacja wyników:

- Próbką jest uznawana za pozytywną jeśli daje produkt o wielkości 575 pz. i zapewnione jest, że kontrole są negatywne (brak kontaminacji).
- Próbką jest uznawana za negatywną jeśli nie daje produktu o wielkości 575 pz. i zapewnione jest, że (i) ekstrakt DNA jest amplifikowalny (ii) nie pojawiła się znacząca inhibicja i jeśli użyta, (iii) LOD kontrola pozytywna testowana w PCR dała produkt o wielkości 575 pz..
- Jeśli uzyskane wyniki są sprzeczne lub wątpliwe, testy należy powtórzyć.

---

<sup>2</sup>LOD kontrola pozytywna jest uzyskana poprzez rozcieńczenie produktu uzyskanego ze starterami ITS-Mmd-F/R w odniesieniu do subklonowanego *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*. To może być zdefiniowane jako najniższa docelowa ilość DNA dająca pozytywny wynik w reakcji PCR przynajmniej w 95%, zapewniając tym samym ≤5% wyników fałszywie negatywnych.

## Załącznik 2. Metoda B: Identyfikacja PCR konwencjonalnym z użyciem starterów SCAR (Bourassa i wsp., 2005)

### 1. Informacje ogólne

Bourassa i wsp., (2005) opisali dwie techniki oparte na konwencjonalnym PCR wykorzystujące dwa *loci* o nieznanym położeniu (uzyskane z SCARs) i oba mogą być stosowane do identyfikacji *M. medusae* f. sp. *deltoidae*, z urediniospor pobranych z liści topoli.

Startery docelowe stosowane w PCR są zlokalizowane w regionach nazwanych odpowiednio „Locus A” i „Locus B”. W testach PCR dają produkt o wielkości 512 pz. i 594 pz. odpowiednio, z DNA wyizolowanym z *M. medusae* f. sp. *deltoidae*. Sekwencje dla badanych loci z *M. medusae* f. sp. *deltoidae* można uzyskać z Genbank: numery akcesyjne od AY489127 do AY489134 (locus A) i AY490805 do AY490813 (locus B).

Locus A jest amplifikowany z DNA *M. medusae* f. sp. *deltoidae* przy zastosowaniu pary starterów c1c3a2f (forward) i c1c3a2r (reverse), podczas gdy region Locus B jest amplifikowany z DNA *M. medusae* f. sp. *deltoidae* przy zastosowaniu pary starterów c1c3a3f (forward) i c1c3a3r (reverse) (tabela 2).

Metoda ta jest właściwa do wykrywania *M. medusae* f. sp. *deltoidae* z topoli należących do sekcji *Aigeiros* i *Tacamahaca*, ale istnieje ryzyko uzyskania wyników fałszywie pozytywnych przez tzw. puste allele występujące u niektórych izolatów. Rzeczywiście, gdy zastosowano reakcję PCR w przypadku 80 izolatów należących do innych gatunków rdzy, nie dała ona żadnego sygnału lub charakterystyczny fragment innej wielkości. W szczególności nie uzyskano żadnego sygnału z DNA pochodzącym od *M. larici-populina*, *M. allii-populina*, *M. larici-tremulae*, *M. rostrupii* i *M. pinitorqua* (Bourassa i wsp., 2005). Jednakże, te pary starterów nie były pierwotnie zoptymalizowane dla celów wykrywania i nie została oszacowana ich odpowiednia czułość. W dodatku, testy przesiewowe dla 40 izolatów *M. medusae* f. sp. *deltoidae*, należące do światowej kolekcji, z tą parą starterów wykazały, że puste allele pojawiły się u jednego izolatu z locus A i dlatego dały wyniki fałszywie negatywne (P. Frey, INRA Nancy, niepublikowane dane).

Jest ona również właściwa do wykrywania *M. medusae* f. sp. *tremuloidae* na osikach, ale z ryzykiem wyników fałszywie negatywnych powodowanych przez puste allele lub niską wydajność reakcji PCR z niektórymi izolatami (patrz tabela 2).

### 2. Metody

Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.

Zebrane i przeniesione do probówek urediniospory poddaje się liofilizacji. W zależności od ilości zarodników dodaje się do probówki odpowiednią ilość ziemi okrzemkowej (Sigma Chemical company, St Louis, USA). Zarodniki rozdrabnia się w 400 µl buforu lizującego (100mM Tris HCL, pH 9.5, 2% CTAB, 1.4 mM NaCl, 1% glikol polietylenowy 8000, 20 mM EDTA, pH 8, 1% β-mercaptoethanol).

Zawiesinę miesza się, a następnie inkubuje w 65°C przez 1 godzinę, ekstrahuje jednokrotnie z 400 µl mieszaniny fenol: chloroform: alkohol izoamylowy (w stosunku 25:24:1) i wiruje się 5 minut przy 10.000g.

Fazę wodną przenosi się do nowych probówek, poddaje precypitacji (wytrącaniu) z 1 objętością schłodzonego izopropanolu i wiruje się przez 5 minut przy 10.000g.

Uzyskany pelet przemywa się 70% alkoholem etylowym, suszy przez noc i zawiesza

w 20 µl buforu Tris EDTA (10mM Tris HCl, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8), a następnie stosuje się jako matrycę w reakcji PCR.

Alternatywą do tej procedury, opisaną przez Bourassa i wsp. (2005) dla ekstrakcji i oczyszczania DNA byłoby wykonanie procedury opisaną w załączniku dla metody A.

### Reakcja PCR

Dwa odległe regiony *M. medusae* f. sp. *deltoideae* nazwane „locus A” i „locus B” są amplifikowane w dwóch oddzielnych reakcjach PCR, każda z nich przeprowadzona jest w następujący sposób:

Mieszanka do reakcji PCR zawiera:

- 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl lub bufor, dostarczone z polimerazą DNA
- 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>,
- 1 µM startery (c1c3a2f i c1c3a2r dla Locus A i c1c3a3f i c1c3a3r dla locus B)
- 200 µM dNTP,
- 0.05 U/ µl polimerazy DNA,
- 1 µl matrycy DNA (nie wskazano stężenia)
- Wodę do analiz molekularnych dodaje się do uzyskania objętości końcowej (20 µl).

Woda powinna być oczyszczona (dejonizowana lub destylowana), sterylizowana przez autoklawowanie lub filtrowana z użyciem filtra o wielkości porów 0,2 µm, wolna od nukleaz.

Reakcja PCR dla Locus A i Locus B powinna być prowadzona w termocyklerze z pokrywą grzewczą i zawierać etap wstępnej denaturacji w temperaturze 95°C przez 3 minuty (zwiększony do 10 minut jeśli stosuje się tzw. „hotstart” polimerazę DNA) następnie 30 cykli denaturacji, przyłączania starterów i elongacji przez 30 sekund w temp. 92°C, 30 sekund w temp. 55°C i 1 minutę w temp. 72 °C odpowiednio i końcowy etap wydłużania w temp. 72 °C przez 10 minut.

Produkty PCR są rozdzielane przy wykorzystaniu techniki elektroforezy w 1% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydy. Matryca DNA zawierająca amplifikowalne DNA z grzyba *M. medusae* f.sp *deltoideae* w reakcji PCR ze starterami c1c3a2f/r da produkt o wielkości 502 pz. (locus A) i produkt o wielkości 594 pz. (locus B) ze starterami c1c3a3f/r.

### 3. *Niezbędne informacje proceduralne*

**Negatywna kontrola ekstrakcji DNA** (tzw. próba ślepa) powinna być dołączona do każdej serii izolacji DNA w celu zapewnienia braku kontaminacji podczas tego etapu.

**Negatywna kontrola PCR** nie zawierająca badanego DNA, powinna być dołączona w każdym teście w celu zapewnienia braku kontaminacji podczas PCR.

**Pozytywna kontrola PCR** – powinna być stosowana (produkt amplifikacji DNA z subklonowanego *M. medusae* f.sp *deltoideae* ze starterami c1c3a2f/r i c1c3a3f/r). Kontrola pozytywna powinna odpowiadać ustalonemu limitowi detekcji testu PCR (LOD, limit detekcji). **Limit detekcji dla kontroli pozytywnej**<sup>3</sup> powinien być zawarty w celu oszacowania wydajności PCR i zapewnienia, że negatywne wyniki są następstwem braku lub niskiego poziomu produktu docelowego reakcji PCR w próbce DNA, niż nie wystarczającej wydajności reakcji PCR.

Jakość ekstraktu DNA powinna być oszacowana przez użyciu odpowiedniego przyrządu np. spektrofotometru lub przez sprawdzenie ekstraktu DNA w reakcji PCR ze starterami ITS1 i ITS4 (White i wsp., 1990). W tym przypadku, warunki reakcji PCR są takie

jak opisano powyżej, należy tylko zamienić startery c1c3a2f/r i c1c3a3f/r na ITS1 i ITS4 (tabela 2) i obniżyć temperaturę przyłączania do 50 °C.

Pozytywny sygnał (średnio 660-680 bp) uzyskany w tym teście może znaczyć, że ekstrakt DNA był amplifikowalny: DNA zostało wyekstrahowane z sukcesem i poziom inhibitorów reakcji PCR był dostatecznie niski. Dodatkowe dowody braku znaczącej inhibicji w reakcji PCR mogą być dostarczone poprzez stosowanie *ad hoc* **wewnętrznej kontroli amplifikacji**.

Interpretacja wyników:

- Próbką jest uznawana za pozytywną jeśli daje produkt PCR o wielkości 502 pz. (locus A) lub o wielkości 594 pz. (locus B) i jest zapewnione że kontrole są negatywne (brak kontaminacji).
- Próbką jest uznawana za negatywną jeśli (i) nie daje produktu o wielkości 502 pz. (locus A) lub produktu o wielkości 594 pz. (locus B) (ii) jest zapewnione, że: ekstrakt DNA jest amplifikowalny i nie pojawiła się znacząca inhibicja i jeśli użyto(iii) LOD kontrola pozytywna testowana w reakcji PCR dała produkt o wielkości 502 pz. (locus A) i 594 pz. (locus B) odpowiednio.
- Jeśli uzyskane wyniki są sprzeczne lub wątpliwe, testy należy powtórzyć.

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Anna Wiśniewska	Grażyna Szkuta	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)

---

3 LOD kontrola pozytywna jest uzyskana poprzez rozcieńczenie produktu ze starterami c1c3a2f/r i c1c3a3f/r w odniesieniu do subklonowanego *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*. To może być zdefiniowane jako najniższa docelowa ilość DNA dająca pozytywny wynik w reakcji PCR przynajmniej w 95%, zapewniając tym samym  $\leq 5\%$  wyników fałszywie negatywnych.

