



DNA MARKERS USED TO IDENTIFY PATHOGENS CAUSING ROOT ROT DISEASE IN SPRUCE (*PICEA ABIES* L. KARST.) FOR FORENSIC PURPOSES

Justyna A. NOWAKOWSKA¹, Małgorzata BORYS¹, Tomasz OSZAKO^{2,3}

¹ Department of Silviculture and Genetics, Forest Research Institute, Sękocin Stary, Poland

² Department of Forest Protection, Forest Research Institute, Sękocin Stary, Poland

³ Department of Forestry, Technical University of Białystok, Hajnówka, Poland

Abstract

The paper describes the first case of a Polish court using reliable DNA identification of the harmful pathogens *Heterobasidion annosum* (s. str.) and *H. parviporum*, causing major wood root rot in Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). In 2011, the District Court in E. received a complaint from a non-governmental organization concerning the illegal removal of spruces growing in a hedge close to private residential buildings. The Court asked the Forest Research Institute to confirm the validity of the local authority's decision to remove the spruce hedge. To this end, two means of diagnosis were applied, i.e. visual estimation of symptoms of root rot disease caused by *Heterobasidion* spp. and their identification in decayed wood tissues on the basis of molecular DNA methods. Typical rot symptoms of spruce stems were noticed in two out of ten wood samples and the broad extent of rot in their inner parts was indicative of the disease having developed over a very long time. The genetic study with DNA-specific markers confirmed that 20% of the investigated Norway spruce materials were infected with *H. annosum* (s. str.) and *H. parviporum*. Other samples rather showed wood rot caused by saprotrophic wood-decaying fungi. The above data validated the decision to remove what were indeed shown to be diseased trees.

Key words

Root rot; DNA identification; PCR; Wood-decay fungi.

Received 25 May 2012; accepted 4 February 2013

1. Introduction

Analysis of DNA markers for the purpose of identification of organic material is widely applied in criminalistics and forensic medicine, as it can provide conclusive evidence in cases of doubt as regards the origin of a given sample, often collected in a trace amount [1]. DNA markers have also been applied successfully in forestry for several years to the identification of evidence material in the form of seized wood, e.g. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.), pedunculate oak (*Quercus robur* L.), sessile

oak (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), European beech (*Fagus sylvatica* L.), black alder (*Alnus glutinosa* L.) and silver birch (*Betula pendula* L.) [7].

Such DNA studies (identifications) are based on the detection of DNA fragments (genetic markers) of sizes ranging from tens to hundreds of base pairs (bp), which enable accurate and fast molecular diagnosis of a given organism. Identification of forest fungus or fungus-like pathogens (including *Phytophthora*, Oomycota) mainly relies on the sequencing of internal transcribed sequences (ITS), as well as *cox1*, *cox2*, NADH dehydrogenase (*nad1*), and elongation factor

1 α and β -tubulin genes [2]. Comparison between the obtained DNA sequence in the laboratory and reference sequences deposited in free access data banks like GenBank, Q-base, etc. very frequently make possible the identification of a given pathogen with a high (near 100%) probability.

Similar genetic markers have also been developed to identify *Heterobasidion annosum* Fr. Bref. s. str., and *Heterobasidion parviporum* (Niemelä and Korhonen), both being fungal pathogens growing on the trunks of spruce and pine and capable of posing a threat to trees of these species [5]. *Heterobasidion annosum* is a particularly dangerous spruce pathogen, causing a disease known as root rot [6]. It causes the internal decomposition of the wood of tree trunks and damage to roots and external parts of the wood (sapwood), which as a consequence leads to the dying of trees. Another pathogen, *H. parviporum*, causes root rot in spruce trees and mould in the central heartwood (duramen) of the trunk, which increases the risk of tree trunks falling over or breaking under the influence of, e.g. strong wind.

2. Case description

In 2011, the District Court in E. received a complaint from an (environmental) NGO to the effect that an official of the local municipality had unjustifiedly issued permission for the felling of nearly two hundred spruce trees making up a hedgerow along the boundary of a private estate. The contested issue was whether, at the time of taking the decision to cut down about 170 thirty-year-old trees, they were infected with *H. annosum* causing root rot and an associated risk of the trunks falling over or breaking. In the delivered opinions of the summoned experts, the disease symptoms corresponded to the description of the disease of root rot: reduced annual growth and overturned spruce in the row, visible wood rot after cutting cross-sections of the trunks. Therefore, it was necessary to confirm the cause of the disease and to assess the degree of threat to life or health of people at the present moment and in the future.

The District Court (Criminal Division II) in E. commissioned the Forest Research Institute in Sękocin Stary to carry out an analysis of the secured evidence material in the form of wood discs collected from 10 stumps remaining after the spruce trees had been felled.

The aim of the expert report was to determine whether the spruce trees growing in the hedgerow were infected with *H. annosum*.

Determination of the presence of species of pathogens in the studied samples of evidence material (spruce wood) and their identification were carried out macroscopically and also on the basis of DNA analysis at the Department of Forest Protection and also in the Molecular Genetics Laboratory of the Department of Forest Tree Breeding and Genetics, Forest Research Institute.

3. Materials and methods

Analysis was carried out on ten wood discs (of thickness 5 cm) that had been selected and cut from stumps left behind after the felling of the aforementioned group of 170 spruce trees. First, macroscopic traces of rot (decay) were sought in the wood, and then, using molecular methods, it was ascertained whether this rot is caused by fungi of the genus *Heterobasidion*.

Due to the long duration of storage of the evidence material in plastic bags (from March to December 2011), the obtained wood discs were contaminated by mould fungi growing on the surface; therefore they were first carefully washed under running water, and then after drying, the bottom side of each disc was ground (sanded) in such a way as to enable visual assessment of the presence and range of internal rot (decay) of the wood (Figure 1 and 2).

Before genetic analysis of the evidence material was performed, conditions of detection of species of *Heterobasidion* on the basis of a direct polymerase chain reaction (PCR) with the application of primers specific for *H. annosum* and *H. parviporum* were optimized [5]. Mycelia of *H. annosum* and *H. parviporum* originating from pure cultures of these species stored in the collections of the Department of Forest Protection under numbers IBL/AŻ: 11 and 12 were analysed. Direct amplification of selected fragments of DNA was carried out using the Phire[®] Plant Direct PCR Kit (FINNZYMES) in accordance with the producer's instructions.

To this end, a small amount of lignified tissue (diameter 0.5 mm) was placed in 20 μ l Dilution Buffer, centrifuged and then incubated at room temperature for 3 min. Then 0.5 μ l of supernatant was collected as a template and 20 μ l of PCR reaction mixture was prepared (1 \times Phire Plant PCR Buffer, 0.5 μ M of each primer (ITS6 and ITS4), 0.4 μ l of Phire[®] Hot Start II DNA Polymerase (FINNZYMES).

PCR was then performed in a PTC-200 thermocycler (MJ Research) programmed to carry out an initial denaturation at 98°C for 5 min, 40 cycles (consisting

of denaturation at 98°C for 5 s, annealing at T_m for 5 s, and extension at 72°C for 5 s) and then a final extension step at 72°C for 1 min [4]. The optimal parameters of the PCR reaction were tested, applying a temperature gradient to the annealing (T_m), ranging from 51 to 67°C.

In order to carry out correct genetic analysis, two fragments of wood were collected from the ten spruce discs using a Pressler borer (of drill diameter 10 mm) in places showing symptoms of rotting, and triturated in liquid nitrogen. Next 1 µg of powdered tissues of wood was added to the reaction buffer of the Phire® Plant Direct PCR Kit together with primers for *H. annosum* and *H. parviporum*, according to the procedure described above for DNA analysis of pure cultures of *Heterobasidion* [3, 8].

PCR-amplified DNA fragments of pure cultures of *Heterobasidion* and genomic DNA of the wood infected by unknown fungi were separated by 2% agarose-gel electrophoresis at a voltage of 90V with addition of ethidium bromide (final concentration 5 ng/ml). The size of the obtained DNA profiles was estimated with the help of a molecular mass standard FastRuler MR DNA Ladder (Fermentas) and compared with DNA profiles from pure cultures of *H. annosum* and *H. parviporum* from the Forest Research Institute collection.

4. Results

4.1. Morphology of wood decay

All the spruce stem samples presented visual symptoms of the presence of pathogens responsible for stem-wood decay (not illustrated). The observed discolouration was caused by fungi (including ones causing sap stain), which grew for about 9 months in the dead wood of stumps after felling and during storage of evidence material in sealed plastic bags.

The symptoms of wood degradation present in all the examined samples (discs) were caused either by earlier infection of *Heterobasidion* spp. or else later in the course of the storage of the discs. The wood rot which arose after the felling of the spruce trees was caused by saprotrophic fungi growing exclusively on dead plant material, whilst the *Heterobasidion* was already present in the living trees. This is attested to by the extensive area of internal rotting of wood found in the investigated spruce samples (2 examples of which are illustrated in Figures 1 and 2), which were indicative of *Heterobasidion* having developed over many years prior to the removal of the trees.

The presence of *Heterobasidion* was ascertained in samples no. 3 and 4, on account of the highly-visible characteristic decay layer (Figure 1 and 2). The area of decay covered ca. 50% of the internal part of sample no. 3 (Figure 1), and more than 50% in sample no. 4 (Figure 2).

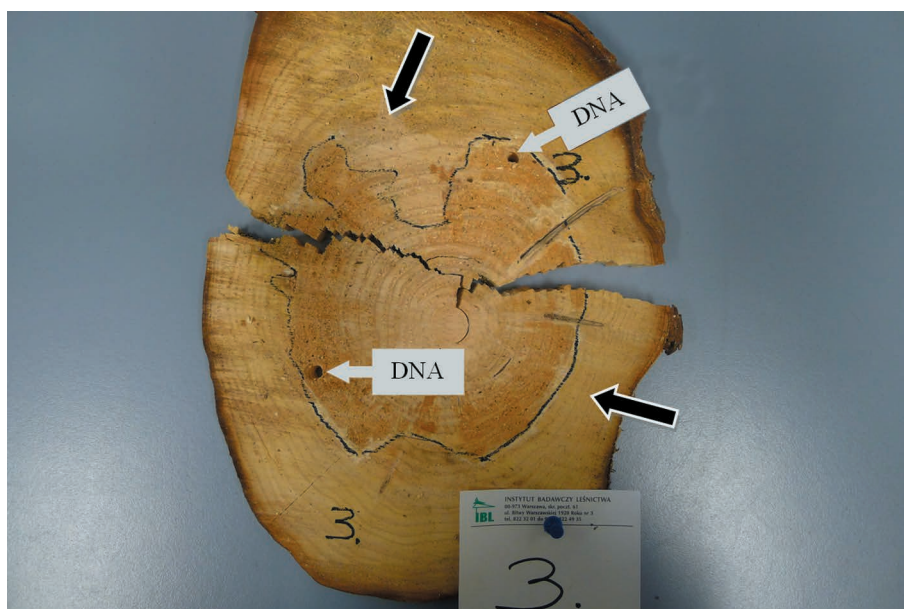


Fig. 1. Wood rot visible in the inner part of the trunk (borders marked with the black line, indicated with black arrows) caused by root rot fungi *H. parviporum* and *H. annosum*. Fragments of tissues (indicated with white arrows) for DNA analysis were taken with a Pressler borer (of about 1 cm diameter).

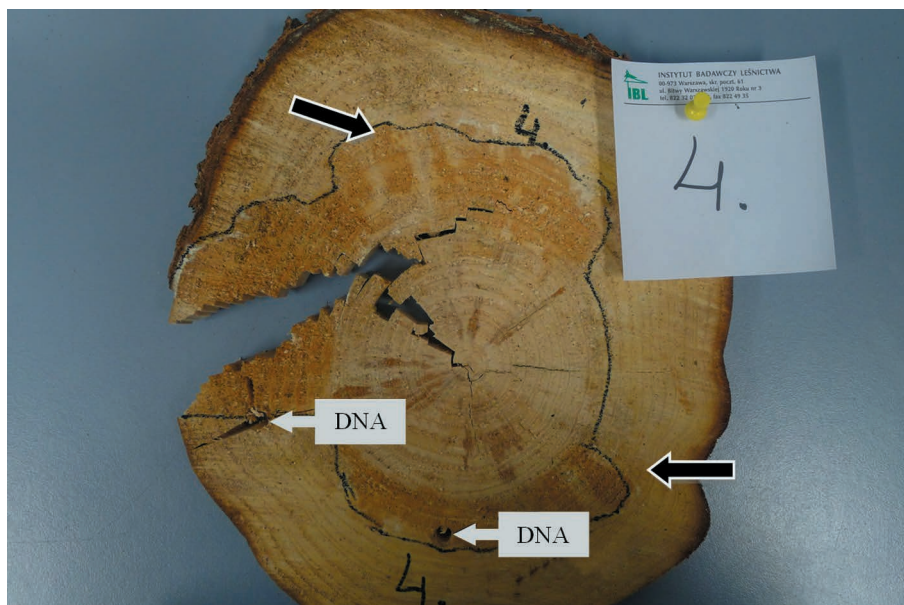


Fig. 2. Visible extensive wood rot (borders marked with the black line, indicated with black arrows) caused by *H. annosum*. Fragments of tissues (indicated with white arrows) for DNA analysis were taken with a Pressler borer (of about 1 cm diameter).

4.2. Molecular analysis of pure fungal cultures

On the basis of preliminary PCR reactions carried out on genetic material from pure *H. annosum* and *H. parviporum* cultures from the Forest Research Institute collection, it was established that the optimal primer annealing temperature T_m for obtaining PCR products for both pathogens was 53°C (Figure 3). In this case, PCR amplification of *H. annosum* DNA resulted in a 100 bp DNA fragment, while the amplification of *H. parviporum* generated a 350 bp DNA fragment. The mixing of two pure cultures, i.e. IBL/AŻ 11 *H. annosum* and IBL/AŻ 12 *H. parviporum*, from the Forest Research Institute collection yielded two PCR products of 100 and 350 bp visible on the electrophoresis gel, attesting to the presence of two pathogens in the studied sample (Figure 3). When a temperature for annealing of $T_m = 51^\circ\text{C}$ was applied in the case of *H. parviporum* in PCR, an additional unspecific PCR product of 450 bp occurred (in addition to the characteristic fragment) (Figure 3). On the other hand, when the pure culture of *H. annosum* was tested with $T_m = 67^\circ\text{C}$, one non-specific PCR product of ca. 500 bp was detectable (Figure 3).

4.3. Molecular analysis of the evidence material

On the basis of genetic analysis of the evidence material, neither *H. annosum* nor *H. parviporum* was

found to be present in samples no. 1, 2, 5, 6, 7, 11/K 3/IK and 4/IK. Conversely, in spruce sample no. 3, specific DNA products of 100 and 350 bp, characterizing *H. annosum* and *H. parviporum* respectively, were present (Figure 4). *H. parviporum* was identified by specific PCR probes in sample no. 4 (Figure 4). Moreover, samples no. 3 and 4 shared an additional PCR product of 250 bp originating from other fungi causing breakdown of wood, which had infected stumps left after felling of trees (Figure 4). An additional PCR product of ca. 450 bp was amplified in sample no. 4, which had been identified earlier as a non-specific PCR product amplified in pure *H. parviporum* culture outside optimal conditions of $T_m = 53^\circ\text{C}$ (Figure 3).

The obtainment of additional DNA fragments in PCR not identified by Väinö and Hantula [5] was probably a reflection of the presence of other non-pathogenic, saprotrophic fungi that could have started developing in spruce wood stumps just after felling and/or later, during the period in which samples were stored. These fungi could also have existed as endophytes within living asymptomatic spruce tissue. The presence of saprophyte DNA genetically similar to *Heterobasidion* did not, however, have significance for the analyses. It is possible that the DNA of *Heterobasidion* also degraded as a result of long-term storage of wood samples exposed to enzymes from saprotrophic fungi.

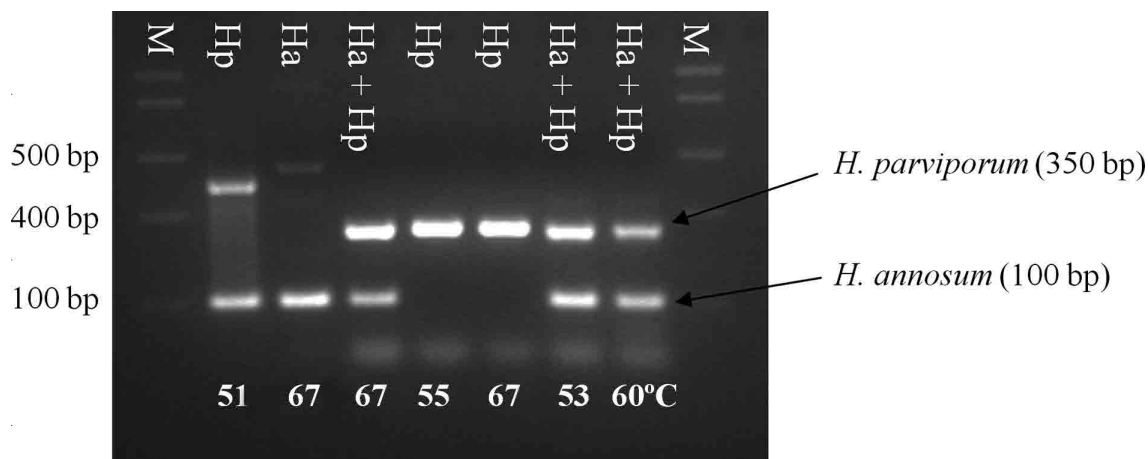


Fig. 3. Electrophoretic separation of DNA fragments amplified from pure cultures of *Heterobasidion* mycelium (100 bp product) and *H. parviporum* (350 bp product). M: DNA size marker. Ha; *H. annosum*, Hp: *H. parviporum*. T_m values tested for PCR optimization are given on the x-axis.

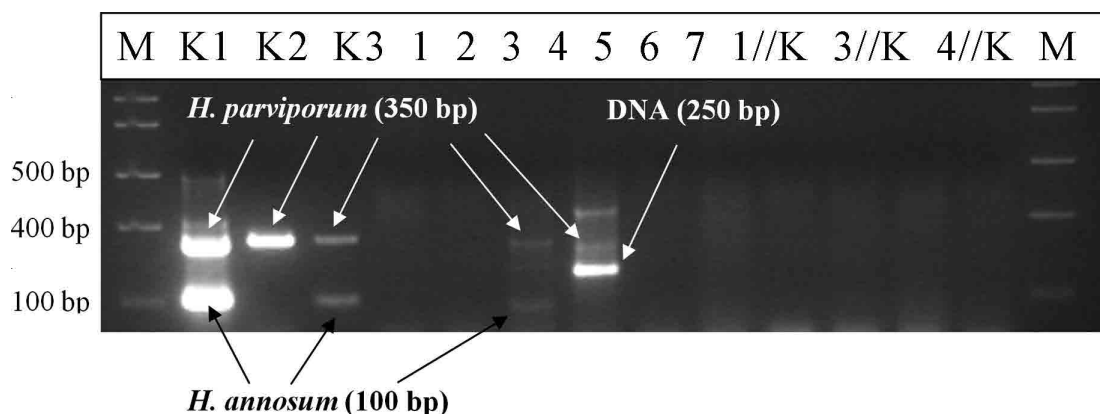


Fig. 4. Electrophoretic separation of PCR products after amplification with primers specific for *H. annosum* (100 bp) and *H. parviporum* (350 bp). M: DNA size marker. K1 and K3: positive controls made up by mixing two pure cultures of *H. annosum* and *H. parviporum* from Forest Research Institute collection; K2: positive control composed of pure culture of *H. parviporum* from Forest Research Institute collection; 1 – 4//K: investigated wood samples. DNA fragments of 250 bp size in samples 3 and 4 most probably belong to unknown pathogenic fungi.

4.4. Conclusions stemming from analysis of evidence material

Summing up the analysis of the evidence material, we may conclude that besides the internal decay characteristic of the presence of *Heterobasidion* in discs no. 3 and 4, the remaining rot in discs no. 1, 2, 5, 6, 7, 1//K, 3//K and 4//K had a superficial character and was distributed in outer parts of cross sections, which indicates that it was caused by non-pathogenic fungi. Butt rot in spruce trees develops only in central parts of trunks (fulfilling only mechanical functions) for many years, without damage to physiological processes of

trees. Trees break when there is significant breakdown of lignin fibres.

It thus seems that the decision to fell all trees was justified, since the other tested trees (not just specimens 3 and 4) were probably also or probably will be infected by butt rot. This is due to the biology of *H. annosum* (with ubiquitous spores) and the specific nature of ex-agricultural lands (where there is a lack of antagonistic organisms), on which the first generation of coniferous species is usually strongly attacked and dies before reaching maturity (utilizable age). Leaving the spruce trees would result in their inevitable dying out and the emergence of broken and fallen trees threatening the surroundings. The disease caused by

Heterobasidion spp. could also easily transfer to other species, especially coniferous ones. In forestry maximum damages occurs in young stands, which have to be clear cut (about 100,000 hectares annually) [6].

Due to the fact the Norway Spruce (*Picea abies* L. Karst.) does not grow well in the prevailing soil conditions on the property (former farmland), the hedgerow lost its function of protecting against the wind [9]. Due to the presence of *H. annosum*, the hedgerow should be replaced by deciduous species (more resistant to the disease), if that is the will of the landowner.

This article is the first report in Poland up till now about the application of DNA analyses to identification of pathogens, perpetrators of the dangerous disease: root (butt) rot, for forensic purposes. Confirmation of the presence of *H. annosum* in the stumps of spruce was a decisive factor in the issuing of an acquittal and in rejecting the claim of the environmental organisation about the unjustified felling of the row of trees. Thus, the judgement of the District Court in E. showed the usefulness of the method (validation) for forensic purposes.

5. Conclusions

1. Analysis of the evidence showed symptoms entirely consistent with the activity of wood-decay fungi in all 10 of the tested samples of wood. In two trees, pathogens causing the serious disease known as butt rot were identified.
2. The *H. annosum* and *H. parviporum* found in 20% of all investigated trees (i.e. in no. 3 and 4) are capable of posing a risk to human life and health due to their activity within trees. This leaves the decision to cut out the diseased trees that had been challenged in court as a fully justified one supported by the detailed genetic analysis.
3. Taking into consideration the above findings, as well as the status of the diagnosed disease as both progressive and irreversible, the decision issued by the local authority in question must be deemed correct in the context of the state-of-the-art pursuit and practice of forestry. The widespread (ca. 50%) coverage of rot in both of the infected tree trunks (samples no. 3 and 4) is suggestive of root infection having taken place many years ago, probably at a time when high annual growth promoted intercellular penetration by the *Heterobasidion* mycelia.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Anna Żółciak from the Department of Forest Protection at the Forest Research Institute for providing pure *H. annosum* (IBL/AŻ: 11) and *H. parviporum* (IBL/AŻ: 12) mycelia, stored in the collections of the Department of Forest Protection.

References

1. Bal J., *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*, PWN, Warszawa 2006.
2. Belbahri L., McLeod A., Paul B. [et al.], Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (*Pythiaceae*), *FEMS Microbiology Letters* 2008, 284, 17–27.
3. Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M. [et al.], A molecular phylogeny of Phytophthora and related Oomycetes, *Fungal Genetics and Biology* 2000, 30, 1–32.
4. FINNZYMES [www.finnzymes.com].
5. Hantula J., Vainio E., Specific primers for the differentiation of *Heterobasidion annosum* (s. str.), and *H. parviporum* infected stumps in Northern Europe, *Silva Fennica* 2003, 37, 181–187.
6. Krótkoterminowa prognoza występowania ważniejszych szkodników i chorób infekcyjnych drzew leśnych w Polsce, Instytut Badawczy Leśnictwa, *Analizy i Raporty* 2011, 10, 161.
7. Nowakowska J. A., Application of DNA markers against illegal logging as a new tool for the Forest Guard Service, *Folia Forestalia Polonica, Series A*, 2011, 53, 142–149.
8. White T. J., Bruns T., Lee S. [et al.], Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, [in:] *PCR protocols: A guide to methods and applications*, Innes M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. [et al., eds.], Academic Press, San Diego 1990.
9. Zajączkowski K., *Dobór drzew i krzewów do zadrzewień na obszarach wiejskich*, Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa 2001.

Corresponding author

Tomasz Oszako
Instytut Badawczy Leśnictwa
Zakład Ochrony Lasu
Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 2
05-090 Raszyn
e-mail: t.oszako@ibles.waw.pl

ZASTOSOWANIE W CELACH SĄDOWYCH MARKERÓW DNA DO IDENTYFIKACJI PATOGENÓW – SPRAWCÓW CHOROBY HUBY KORZENI ŚWIERKA (*PICEA ABIES* L. KARST.)

1. Wstęp

Analiza markerów DNA w celu identyfikacji materiału organicznego jest metodą powszechnie stosowaną w kryminalistyce i medycynie sądowej, dostarcza bowiem dowodów rozstrzygających wątpliwości dotyczących pochodzenia danej próbki, często pobranej w ilości śladowej [1]. Od kilku lat także w leśnictwie markery DNA są z powodzeniem stosowane do identyfikacji materiału dowodowego, jakim jest drewno pochodzące z kradzieży, np. sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst.), dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i bezszypułkowego (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.), olszy czarnej (*Alnus glutinosa* L.) i brzozy brodawkowatej (*Betula pendula* L.) [7].

W identyfikacji na poziomie genetycznym brane są pod uwagę fragmenty DNA (markery genetyczne) o wielkości od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad (pz), które umożliwiają precyzyjną i szybką diagnostykę molekularną danego organizmu. W identyfikacji patogenów grzybowych lub grzybopodobnych (Oomycota) najczęściej stosowaną metodą jest sekwencjonowanie wewnętrznych transkrybowanych sekwencji rozdzielających rybosomalnego DNA (ang. Internal Transcribed Sequence, ITS) oraz genów cytochromowej oksydazy *cox1* i *cox2*, NADH dehydrogenazy *nad1*, czynnika elongacji *ef1a* i β -tubuliny [2]. Porównanie otrzymanej sekwencji DNA z sekwencjami referencyjnymi dostępnymi w międzynarodowych bazach danych (np. GenBank, Q-base i innych) bardzo często umożliwia identyfikację danego patogenu z prawdopodobieństwem bliskim 100%.

Podobne markery genetyczne opracowano również w celu identyfikacji *Heterobasidion annosum* Fr. Bref. s. str. i *Heterobasidion parviporum* (Niemelä and Korhonen), groźnych patogenów grzybowych rozwijających się na pniach świerka i sosny [5]. Szczególnie groźnym patogenem świerka jest korzeniowiec wieloletni (*Heterobasidion annosum* s. str.), sprawca choroby nazywanej hubą korzeni. Powoduje ona wewnętrzny rozkład drewna pni oraz uszkodzenia korzeni i zewnętrznych (bielastych) partii drewna, co w konsekwencji prowadzi do zamierania drzew [6]. Inny patogen, *Heterobasidion parviporum*, powoduje zgniliznę korzeni świerków i wypróchnienie centralnej twardej części pnia, co zwiększa ryzyko wywrócenia lub złamania pni drzew pod wpływem np. silnego wiatru.

2. Opis przypadku

W 2011 roku do Sądu Rejonowego w E. wpłynął wniosek ze strony stowarzyszenia ekologów o bezpodstawne wydanie zgody przez pracownika gminy na ścięcie żywopłotu świerkowego. Kwestią sporną było to, czy w chwili podejmowania decyzji o wycięciu około 170 trzydziestoletnich świerków, drzewa były porażone przez korzeniowca wieloletniego powodującego hubę korzeni i związane z tym ryzyko wywrócenia lub złamania pni. Według dostarczonych opinii powołanych ekspertów, symptomy chorobowe odpowiadały opisowi choroby huby korzeni: skrócone przyrosty roczne i wywrócone świerki w szpalerze, widoczna zgnilizna drewna po ścięciu na przekroju poprzecznym pni. W związku z tym należało potwierdzić przyczynę choroby oraz ocenić stopień zagrożenia dla życia lub zdrowia ludzi w chwili obecnej i w przyszłości.

Sąd Rejonowy II Wydziału Karnego w E. zlecił Instytutowi Badawczemu Leśnictwa w Sękocinie Starym analizę materiału dowodowego zabezpieczonego w postaci krążków drewna pobranych z 10 pni pozostałych po ściętych świerkach. Celem ekspertyzy było rozpoznanie, czy świerki rosnące w żywopłocie były zakażone korzeniowcem wieloletnim.

Obecność i identyfikację gatunków patogenów w badanych próbkach materiału dowodowego drewna świerkowego wykonano makroskopowo oraz na podstawie analizy DNA w Zakładzie Ochrony Lasu oraz w Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Hodowli i Genetyki Drzew Leśnych IBL.

3. Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 10 krążkach drewna (o grubości 5 cm) pobranych z pozostałych po ścięciu drzew pniaków. Najpierw poszukiwano makroskopowych śladów zgnilizny w drewnie, a następnie metodami molekularnymi stwierdzano, czy zgnilizna ta spowodowana jest przez grzyby z rodzaju *Heterobasidion*.

Z powodu długiego przechowywania materiału dowodowego w workach foliowych (od marca do grudnia 2011 r.) otrzymane krążki drewna były zanieczyszczone powierzchniowo rozwijającymi się grzybami pleśniowymi, dlatego najpierw starannie je umyło pod bieżącą wodą, a następnie po osuszeniu zeszlifowano spodnią stronę każdego krążka tak, aby wizualnie ocenić obec-

ność i zasięg zgnilizny wewnętrznej drewna (rycina 1 i 2).

Zanim przystąpiono do analiz genetycznych materiału dowodowego, zoptymalizowano warunki detekcji gatunków korzeniowca na podstawie bezpośredniej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. PCR, Polymerase Chain Reaction) z zastosowaniem starterów specyficznych dla *H. annosum* i *H. parviporum* [5]. Do analiz użyto grzybnie *H. annosum* i *H. parviporum* pochodzące z czystych kultur tych gatunków przechowywanych w kolekcji Zakładu Ochrony Lasu pod numerami IBL/AŻ: 11 i 12. Reakcję bezpośredniej amplifikacji wybranych fragmentów DNA przeprowadzono z zastosowaniem zestawu Phire Plant Direct PCR Kit (FINNZYMES) według zaleceń producenta. W tym celu umieszczano niewielką ilość zdrewniałej tkanki (o średnicy 0,5 mm) w 20 µl buforu do rozcieńczania, wirowano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 min. Następnie pobierano 0,5 µl supernatantu jako matrycy i przygotowano 20 µl mieszaniny reakcyjnej PCR (1× Phire Plant PCR Buffer; 0,5 µM startera wiodącego i wstecznego oraz 0,4 µl Phire Hot Start DNA Polymerase (FINNZYMES)). Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze PTC-200 (MJ Research), zaprogramowanym na 5 min wstępnej denaturacji w temperaturze 98°C, 40 cykli (5 s denaturacji w 98°C, 5 s przyłączania fragmentów w temperaturze T_m , 5 s wydłużania fragmentów w 72°C) oraz 1 min końcowego wydłużania fragmentów w 72°C [4]. Optymalne parametry reakcji PCR testowano, stosując gradient temperatury przyłączania starterów (T_m) od 51°C do 67°C. W celu przeprowadzenia właściwych analiz genetycznych z dziesięciu krążków świerkowych pobrano świdrem Preslera (o średnicy wiertła 10 mm) dwa fragmenty drewna z miejsc wykazujących objawy zgnilizny i utarło w ciekłym azocie. Następnie 1 µg sproszkowanych tkanek drewna dodano do buforu reakcyjnego zestawu Phire Plant Direct PCR Kit wraz ze starterami dla *H. annosum* i *H. parviporum* wg procedury opisanej powyżej dla analizy DNA czystych kultur korzeniowców [3, 8].

Powielone w reakcji PCR fragmenty DNA czystych kultur korzeniowca i DNA genomowego z drewna zasiedlonego przez nieznaną grzybę rozdzielono elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym pod napięciem 90 V z dodatkiem bromku etydyny (w końcowym stężeniu 5 ng/ml). Wielkość otrzymanych profili DNA oszacowano za pomocą standardu wielkości FastRuler MR DNA Ladder (Fermentas) i porównano ze wzorcami uzyskanymi z analizy DNA grzybni czystych kultur *H. annosum* i *H. parviporum* z kolekcji IBL.

4. Wyniki

4.1. Ocena morfologiczna

Wszystkie badane krążki pniaków świerkowych wykazywały symptomy obecności grzybów powodujących procesy rozkładu drewna (niezilustrowane). Obserwowane przebarwienia powodowane były przez grzyby (m.in. powodujące siniznę drewna), które rozwijają się przez ok. 9 miesięcy w martwym drewnie pniaków po ścięciu drzew oraz podczas przechowywania materiału dowodowego w zamkniętych workach foliowych.

Objawy rozkładu drewna obecne we wszystkich dziesięciu krążkach były spowodowane zarówno wcześniejszymi infekcjami przez korzeniowca, jak i późniejszymi, do których doszło podczas przechowywania krążków drewna. Zgnilizny drewna, które powstały po ścięciu świerków, spowodowane były przez grzyby saprotroficzne rozwijające się wyłącznie na martwym materiale roślinnym, podczas gdy korzeniowiec był obecny jeszcze w żywych drzewach. Świadczy o tym rozległy obszar zgnilizny wewnętrznej drewna stwierdzony w badanych krążkach (wyrzynkach) świerkowych (rycina 1 i 2), co potwierdza, że patogen rozwijał się przez wiele lat, zanim doszło do wycięcia drzew.

W dwóch krążkach materiału dowodowego o numerach 3 i 4 stwierdzono objawy zgnilizny charakterystycznej dla grzybów z rodzaju *Heterobasidion* (rycina 1 i 2). Obszar zgnilizny zajmował ok. 50% wewnętrznej części fragmentu pnia nr 3 (rycina 1), w próbie nr 4 obszar zgnilizny był większy niż połowa przekroju pnia (rycina 2).

4.2. Analiza molekularna czystych kultur korzeniowców

Na podstawie wstępnych reakcji PCR przeprowadzonych na materiale z czystych kultur *H. annosum* i *H. parviporum* z kolekcji IBL ustalono, że optymalna temperatura przyłączania starterów dla otrzymania produktu PCR dla obu patogenów łącznie wynosi 53°C (rycina 3). Prawidłowa amplifikacja DNA *H. annosum* generowała produkt o wielkości 100 pz, a w przypadku *H. parviporum* – produkt o wielkości 350 pz. W przypadku, gdy mieszanina reakcyjna zawierała materiał z czystych kultur *H. annosum* i *H. parviporum* (IBL), otrzymano podwójny produkt amplifikacji, tzn. 100 i 350 pz, świadczący o obecności dwóch patogenów w badanej próbie (rycina 3). W przypadku czystej kultury *H. parviporum* przy temperaturze przyłączania starterów $T_m = 51^\circ\text{C}$ pojawiał się, oprócz charakterystycznego fragmentu, również niespecyficzny produkt PCR o wielkości 450 pz (rycina 3), natomiast w przypadku *H. annosum* niespecyficzny produkt PCR o wielkości ok. 500 pz amplifikowany był przy $T_m = 67^\circ\text{C}$ (rycina 3).

4.3. Analiza molekularna materiału dowodowego

Na podstawie analiz genetycznych materiału dowodowego nie potwierdzono obecności patogenów z rodzaju *Heterobasidion* w badanych próbach o numerach 1, 2, 5, 6, 7, 1/IK 3/IK i 4/IK. W krążku drewna nr 3 stwierdzono obecność DNA dwóch gatunków korzeniowca: *H. parviporum* oraz *H. annosum* (rycina 1 i 3). W próbce nr 4 analizy DNA potwierdziły obecność *H. parviporum* (rycina 4). Dodatkowo z materiału pochodzącego z krążków nr 3 i 4 powielony został fragment DNA o wielkości 250 pz pochodzący z innych grzybów powodujących rozkład drewna, które zasiedliły pniaki pozostawione po ścięciu drzew (rycina 4). W przypadku krążka nr 4 amplifikowany został również fragment DNA o wielkości ok. 450 pz, który zidentyfikowano wcześniej jako niespecyficzny produkt PCR generowany w czystych kulturach *H. parviporum* poza temperaturą optymalną $T_m = 53^\circ\text{C}$ (rycina 3).

Zaobserwowane dodatkowe fragmenty DNA w reakcji PCR, niezidentyfikowane przez Hantula i Vaino [5], wynikały prawdopodobnie z obecności innych niepatogenicznych saprotroficznych grzybów, które mogły rozpocząć rozkład drewna pniaków świerkowych zarówno zaraz po ścięciu, jak i później, w trakcie przechowywania pobranych próbek drewna. Grzyby te mogły także egzystować jeszcze w żywych świerkach jako endofity. Obecność DNA saprotrofów spokrewnionych filogenetycznie do korzeniowców nie miała jednak znaczenia dla prowadzonego postępowania. Możliwe, że DNA korzeniowca również uległo degradacji na skutek długiego przechowywania materiału dowodowego w obecności enzymów innych grzybów.

4.4. Wnioski wypływające z analizy materiału dowodowego

Podsumowując analizę materiału dowodowego, można stwierdzić, że poza zgnilizną wewnętrzną charakterystyczną dla obecności korzeniowca w krążkach nr 3 i 4, pozostałe zgnilizny na krążkach nr 1, 2, 5, 6, 7, 1/IK 3/IK i 4/IK miały charakter powierzchniowy i rozmieszczone były w zewnętrznych częściach przekroji poprzecznych, co wskazuje, że wywołały je niepatogeniczne grzyby. Huba korzeni u świerków rozwija się wyłącznie w centralnych częściach pni (pełniących tylko funkcje mechaniczne) przez wiele lat, bez szkody dla procesów fizjologicznych drzew. Do złamania drzew dochodzi w momencie, gdy nastąpi znaczny rozkład włókien ligniny.

Wydaje się zatem, że decyzja o wycięciu wszystkich drzew była słuszna, ponieważ prawdopodobnie pozostałe badane drzewa (nie tylko okazy 3 i 4) również były lub prawdopodobnie będą zainfekowane przez hubę korzeni. Wynika to z biologii korzeniowca wieloletniego (o wszechobecnych zarodnikach) i specyfiki gruntów

porolnych (gdzie brak organizmów antagonistycznych), na których pierwsze pokolenie gatunków iglastych jest zwykle silnie atakowane i nie dożywa wieku rębnego. Pozostawienie świerków skutkowało nieuchronnym ich obumieraniem i powstawaniem złomów i wykrotów zagrożających otoczeniu. Choroba powodowana przez *Heterobasidion* spp. mogłaby też przenieść się łatwo na inne gatunki, szczególnie iglaste. W leśnictwie maksymalne uszkodzenia występują w młodnikach, które trzeba usuwać zrębami zupełnymi (ok. 100 tys. ha rocznie) [6].

Ze względu na niedopasowanie gatunku świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst.) do warunków glebowych panujących na posesji (grunty porolne), żywopłot utracił funkcję ochronną przed wiatrami [9]. Ze względu na obecność korzeniowca wieloletniego żywopłot zastąpić należałoby gatunkami liściastymi (bardziej odpornymi na chorobę), o ile taka byłaby wola właściciela gruntu.

Niniejsza praca jest, jak dotąd, pierwszym doniesieniem w Polsce o zastosowaniu analiz DNA do identyfikacji patogenów, sprawców groźnej choroby huby korzeni, w celach sądowych. Potwierdzenie obecności DNA korzeniowca wieloletniego w pniakach świerka przesądziło o wydaniu uniewinniającej decyzji i oddaleniu powództwa organizacji ekologicznej o niezasadnym wycięciu szpaleru drzew. Tym samym, wyrok Sądu Rejonowego w E. wykazał przydatność (walidację metody) dla potrzeb sądowych.

5. Podsumowanie

1. Analizy materiału dowodowego wykazały symptomy rozkładu drewna przez grzyby we wszystkich dziesięciu badanych próbach drewna, w tym w dwóch z nich stwierdzono groźne patogeny powodujące chorobę zwaną hubą korzeni.
2. Na podstawie szczegółowych analiz genetycznych ustalono, że w chwili podejmowania decyzji przez osobę oskarżoną 20% drzew mogło stanowić zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi, ponieważ zostały one porażone patogenami *H. annosum* i *H. parviporum* (drzewa nr 3 i 4). Porażone drzewa mogły zatem stanowić zagrożenie bezpieczeństwa osób przebywających w ich pobliżu.
3. Biorąc powyższe pod uwagę uznano, że wydanie decyzji na wycięcie chorych drzew było uzasadnione, ponieważ stwierdzona choroba jest postępująca i nieodwracalna, prowadząc do śmierci drzew. Obszerny zasięg (ok. 50%) zgnilizny w obu porażonych pniach drzew nr 3 i 4 świadczy o tym, że do infekcji korzeni doszło wiele lat temu, prawdopodobnie w okresie intensywnego wzrostu (większe przyrosty sprzyjające międzykomórkowej penetracji grzybni).

Podziękowania

Autorzy dziękują dr inż. Annie Żółciak z Zakładu Ochrony Lasu IBL za dostarczenie czystych grzybni *H. annosum* (IBL/AŻ: 11) i *H. parviporum* (IBL/AŻ: 12) przechowywanych w kolekcji Zakładu Ochrony Lasu.