

WYKRYWANIE UTAJONYCH INFEKCI JABŁEK POWODOWANYCH PRZEZ GRZYBY RODZAJU *MONILINIA* Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI LAMP

Anna Poniatowska, Monika Michalecka, Joanna Puławska

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Ochrony Roślin

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

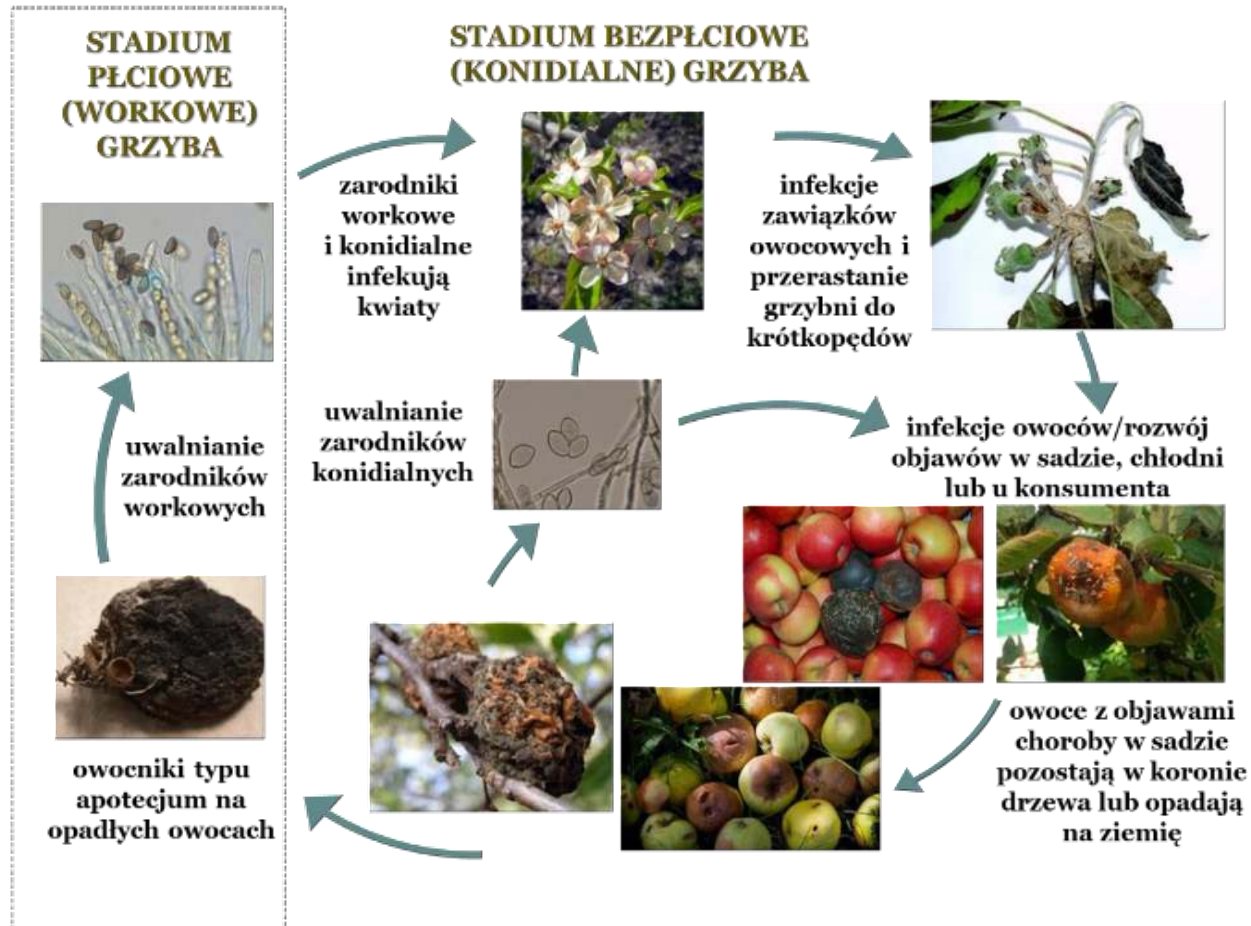
e-mail: anna.poniatowska@inhort.pl

Źródło finansowania badań:
*Pracę wykonano w ramach
projektu FITOEXPORT
(Gospostrateg
1/385957/5/NCBR/2018)
finansowanego przez NCBiR.*



CYKL ROZWOJOWY GRZYBÓW POWODUJĄCYCH BRUNATNĄ ZGNILIZNĄ DRZEW ZIARNKOWYCH

- W uprawie jabłoni najczęściej występują zgnilizny owoców.
- Grzyby rodzaju *Monilinia* mogą infekować owoce poprzez aparaty szparkowe, przetchlinki, bezpośrednio poprzez kutikulę czy uszkodzenia mechaniczne.
- Owoce porażone bezobjawowo charakteryzują się obecnością strzępek grzyba w przestrzeniach międzykomórkowych znajdujących się bezpośrednio pod skórą owocu. Nie pozostają całkowicie uśpione, ale powoli kolonizują komórki mezokarpu (Garcia-Benitez i in., 2016).



- Na powierzchni plam gnilnych, w warunkach wysokiej wilgotności tworzą się sporodochia.
- W przechowalniach grzybnia przerasta z porażonych owoców na owoce sąsiednie.

GRZYBY RODZAJU *MONILINIA* PORAŻAJĄCE OWOCE ZIARNKOWE

M. fructigena



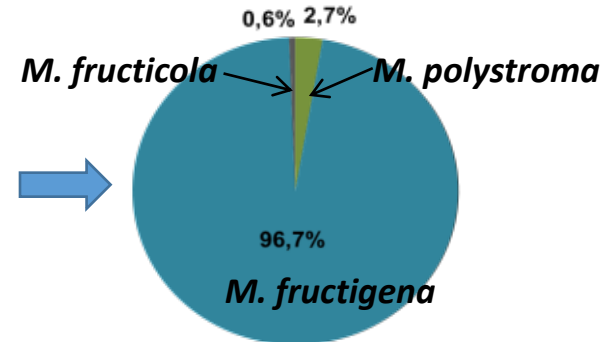
M. polystroma



M. fructicola



Udział procentowy gatunków
Monilia spp. w porażeniu
owoców ziarnkowych
w latach 2010 – 2016



CEL BADAŃ

Opracowanie metody detekcji *Monilia fructigena*, *Monilia polystroma* i *Monilia fructicola* w bezobjawowo porażonych jabłkach

Cele szczegółowe:

- Optymalizacja protokołu izolacji DNA z zakażonych jabłek
- Zaprojektowanie starterów do czułego i specyficznego wykrywania trzech gatunków
- Opracowanie i zwalidowanie metody umożliwiającej czułą i specyficzną detekcję tych grzybów w czasie rzeczywistym

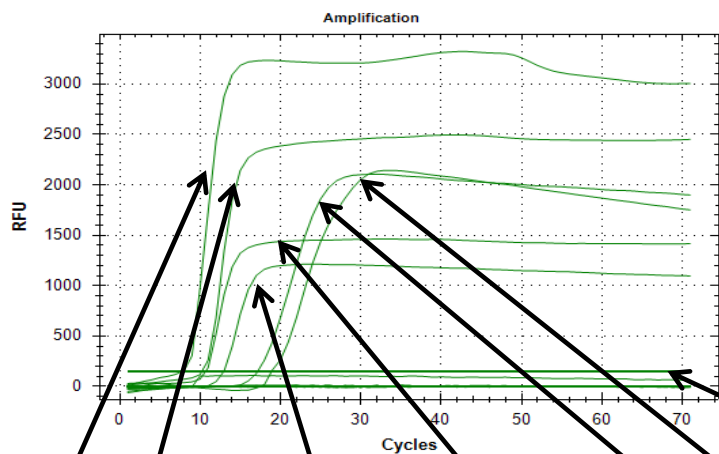
MATERIAŁ I METODY:



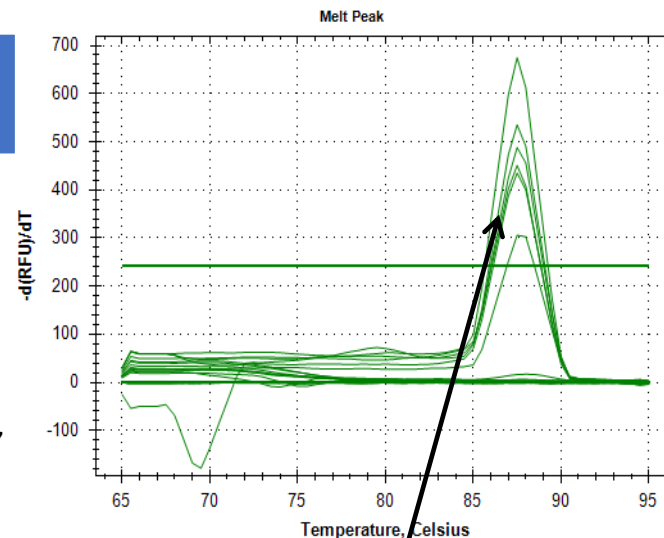
1. **Opracowanie protokołu** do izolacji DNA z całej skórki jabłka. W tym celu zdejmowano skórkę z całego jabłka, suszono, homogenizowano i całą poddawano procedurze izolacji DNA komercyjnym zestawem NucleoSpin Plant II Maxi (Machery-Nagel), z modyfikacjami własnymi.
2. **Zaprojektowanie zestawu starterów** do reakcji LAMP do genu *hsp60* (kodującego białko szoku termicznego) badanych grzybów.
3. **Optymalizacja warunków** przebiegu reakcji LAMP z zestawem starterów, testowanie specyficzności i czułości wykrywania w oparciu o DNA materiału referencyjnego (czyste kultury grzybów *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* oraz innych grzybów powszechnie występujących na jabłkach pochodzące z kolekcji CBS) oraz DNA owoców jabłoni.
4. **Walidacja metody** z wykorzystaniem jabłek z objawami brunatnej zgnilizny pochodzących z naturalnych infekcji powodowanych przez grzyby rodzaju *Monilinia*
5. **Zastosowanie metody do detekcji patogenów w jabłkach bezobjawowych.** Materiał badany: jabłka odmiany Topaz zainokulowane zawiesinami zarodników trzech badanych gatunków grzybów rodzaju *Monilinia*. Owoce przechowywano w warunkach chłodniczych oraz w temperaturze pokojowej. Ze skórki jabłek przechowywanych w temperaturze pokojowej codziennie izolowano DNA aż do momentu wystąpienia objawów chorobowych. W przypadku jabłek przechowywanych w warunkach chłodniczych próby skórki do izolacji pobierano w odstępach kilkudniowych. W celu zwiększenia czułości detekcji grzybów w materiale bezobjawowym, przed reakcją LAMP stosowano preamplifikację docelowego DNA.

WYNIKI:

LAMP w 65°C
detekcja *Monilinia* spp.
(zestaw do *hsp60*)



czas detekcji:
35 minut



M. fructigena –
kultura
akseniczna
skórka jabłka
porażonego
bezobjawowo
przez
M. fructigena

M. polystroma –
kultura
akseniczna
skórka jabłka
porażonego
bezobjawowo
przez
M. polystroma

M. fructicola
– kultura
akseniczna

kontrola
negatywna, inne
gatunki grzybów,
DNA jabłka

skórka jabłka
porażonego
bezobjawowo
przez
M. fructicola

Produkty reakcji z DNA
M. fructigena, *M. polystroma*
i *M. fructicola*

Czułość wykrywania DNA badanych gatunków grzybów w reakcji LAMP wynosiła około **2 pg**. Zastosowana **preamplifikacja DNA** przed reakcją LAMP znacznie zwiększała czułość wykrywania DNA grzybów rodzaju *Monilinia* do **0,1 pg**.

Zastosowana metoda (z preamplifikacją DNA) umożliwiła wykrycie *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* w czasie **24 h** od sztucznej inokulacji w przypadku **jabłek przechowywanych w temperaturze pokojowej** i w czasie **72 h** w przypadku **jabłek przechowywanych w warunkach chłodniczych**.