

Wykrywanie utajonych infekcji jabłek powodowanych przez grzyby z rodzaju *Neofabraea* z wykorzystaniem techniki LAMP

Monika Michalecka, Anna Poniatowska, Joanna Puławska

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Ochrony Roślin

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

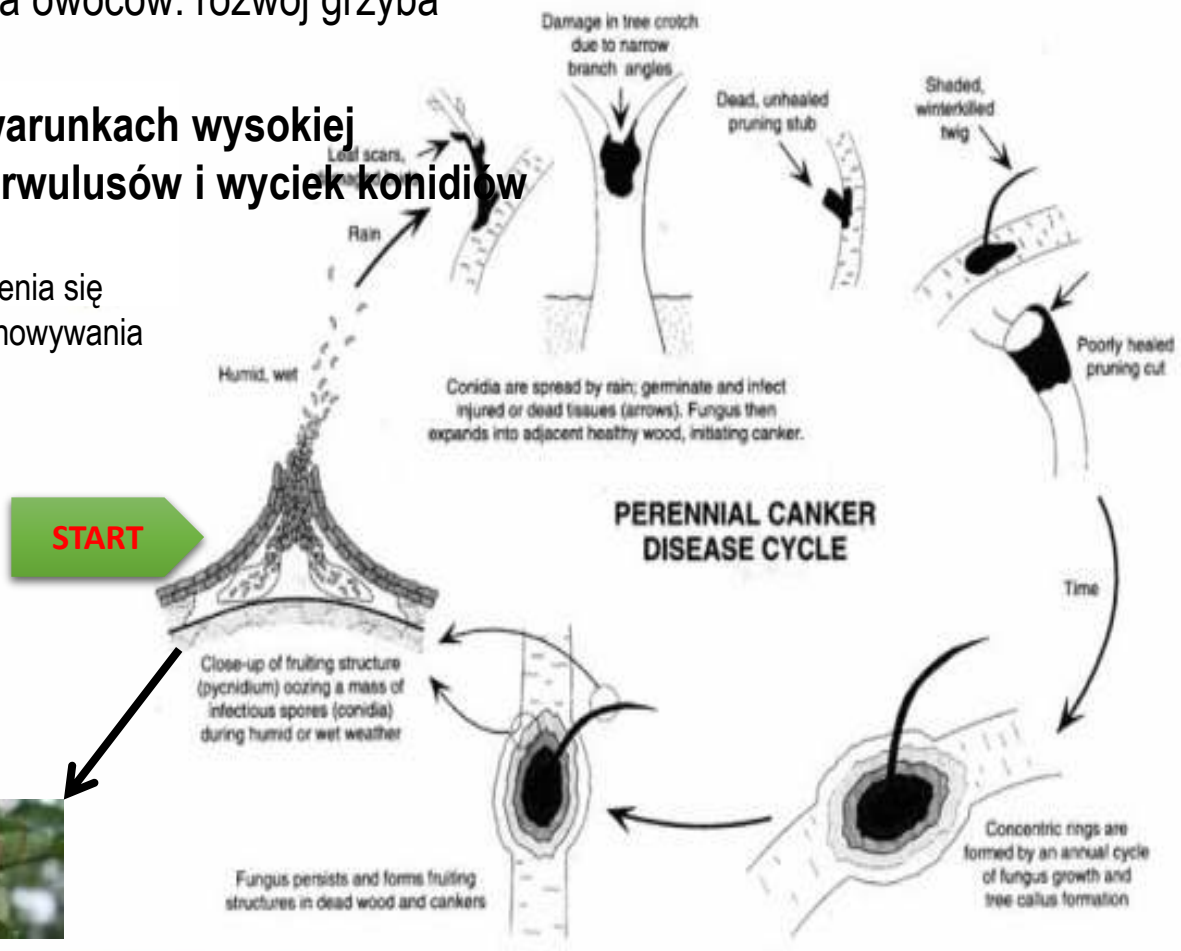
e-mail: monika.michalecka@inhort.pl

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



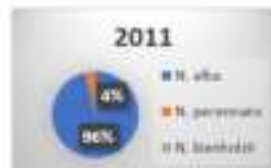
Cykl rozwojowy grzybów powodujących gorzką zgnilizną jabłek

- Owoce: patogen kolonizuje przetchlinki
- Początkowo: owoce w chłodni, utajona forma choroby, kilka miesięcy
- gdy dojrzałość konsumpcyjna owoców: rozwój grzyba i objawów choroby
- **Na plamach gnilnych, w warunkach wysokiej wilgotności – pęknięcie acerwulusów i wyciek konidiów**
 - według Dugan i wsp. (1993), gorzka zgnilizna nie rozprzestrzenia się między jabłkami podczas przechowywania



http://nyslpm.cornell.edu/factsheets/treefruit/diseases/pc/pc_cycle.gif

Detekcja grzybów powodujących gorką zgniliznę jabłek w bezpośrednio w skórce jabłek z objawami choroby



550 jabłek

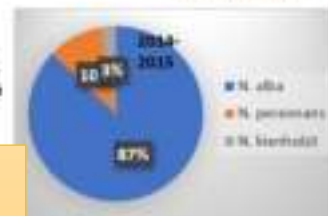
Nie stwierdzono obecności *N. malvarum*

Identyfikacja grzybów z rodzaju *Neofabraea* w czystych kulturach



Nie stwierdzono obecności *N. malvarum*

497 izolatów



W Polsce:

- dominuje *Phlyctema vagabunda*
- *N. perennans*
- *N. kienholzii*

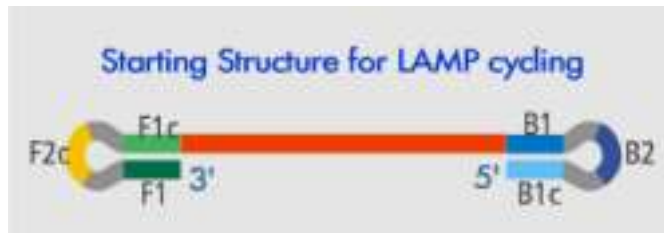
CEL BADAŃ

Opracowanie metody detekcji *Phlyctema vagabunda*, *Neofabraea perennans* i *Neofabraea kienholzii* 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. Materiał referencyjny: czyste kultury grzybów (*P. vagabunda*, *Neofabraea spp.* oraz innych grzybów powszechnie występujących na jabłkach) oraz jabłka z objawami gorzkiej zgnilizny. Materiał badany: jabłka odmiany Topaz, sztucznie zakażane w sadzie eksperymentalnym w Dąbrowicach zarodnikami grzybów: *P. vagabunda*, *N. perennans* oraz *N. kienholzii*. Po miesiącu jabłka zbierano i umieszczano w chłodni, a następnie wyjmowano do badania w 30, 60 i 120 dniu.

2. 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.

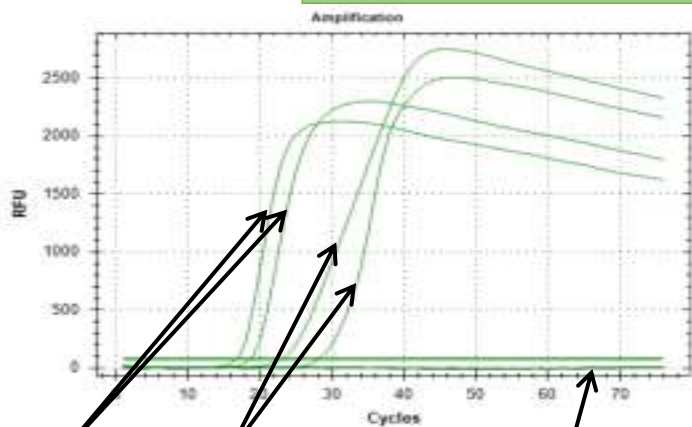
3. Projektowanie dwóch zestawów starterów, do genów *acp1* (kodującego białko wiążące GTP) oraz *asps* (kodującego proteazę aspartylową badanych grzybów).

4. Optymalizacja warunków przebiegu reakcji **LAMP** z tymi zestawami, testowanie specyficzności i czułości wykrywania w oparciu o DNA materiału referencyjnego oraz DNA jabłoni.

5. Walidacja metody z wykorzystaniem jabłek z objawami choroby oraz zastosowanie metody do detekcji patogenów w jabłkach bezobjawowych (materiał badany).

WYNIKI:

LAMP w 66°C
detekcja *P. vagabunda*
(zestaw do *asps*)



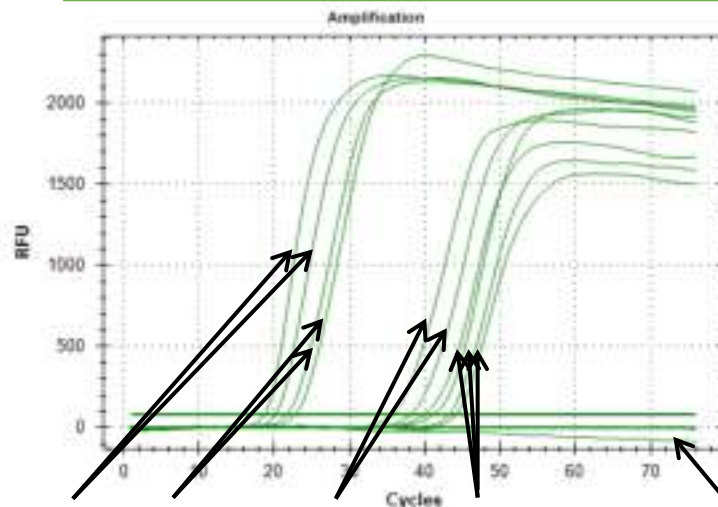
P. vagabunda
czyste kultury

Jabłko z
objawami
P. vagabunda

Kontrola
negatywna (inne
gatunki grzybów,
DNA jabłka)

czas detekcji:
35 minut

LAMP w 66°C
Detekcja *N. kienholzii* i *N. perennans*
(zestaw do *acp1*)



N. perennans
czyste kultury

Naturalna
infekcja
N. perennans

N. kienholzii
czyste kultury

Naturalna
infekcja
N. kienholzii

Kontrola
negatywna (inne
gatunki grzybów,
DNA jabłka)

Opracowana metoda umożliwiła specyficzne wykrycie trzech gatunków grzybów: *P. vagabunda*, *N. perennans* i *N. kienholzii* w badanym materiale. Czulość wykrywania patogenów wynosiła około 4 pg/μl w kulturze aksonicznej grzybów i 1,0 – 1,5 pg/μl w mieszaninie z DNA jabłka.

W celu zwiększenia czulości detekcji grzybów w materiale bezobjawowym, przed reakcją LAMP stosowano preamplifikację docelowego DNA.