

# Szybka i czuła metoda wykrywania sprawców chorób przechowalniczych owoców – wsparcie dla polskich jabłek w opanowaniu nowych rynków zbytu.

prof. dr hab. inż. Joanna Puławska,  
mgr Monika Michalecka, mgr inż. Anna Poniatowska

**Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice**



# CHOROBY PRZECHOWALNICZE OWOCÓW



- gorzka zgnilizna (*Neofabraea* spp.)
- brunatna zgnilizna (*Monilinia* spp.)
- szara pleśń (*Botrytis cinerea*)
- mokra zgnilizna (*Penicillium expansum*)
- *Colletotrichum* spp., *Neonectria galligena*, *Diaporthe eres*,  
*Stemphylium vesicarium*
- choroby występują corocznie we wszystkich rejonach uprawy jabłoni na świecie
- straty spowodowane przedzbiórczym gniciem owoców w Europie sięgają około 7% w przypadku upraw konwencjonalnych i 25% w przypadku upraw ekologicznych
- na skutek gnicia owoców w czasie przechowywania od 5 do około 40% jabłek traci wartość handlową

# GRZYBY Z RODZAJU *MONILINIA* i *NEOFABREA*



- Źródłem infekcji są zrakowacenia i nekrozy na pniu i pędach drzew lub chore owoce pozostawione w sadzie
- Do infekcji owoców dochodzi latem
- W momencie zbioru na owocach brak jakichkolwiek symptomów
- Symptomy choroby pojawiają się w czasie przechowywania

- Problem przy transporcie owoców do odległych rynków zbytu
- Problem będzie narastał – brak środków do zwalczania chorób kory i drewna

- Problem z eksportem polskich jabłek
- Poszukiwanie nowych rynków zbytu – otwieranie rynków na Dalekim Wschodzie
- Bardzo restrykcyjne wymagania fitosanitarne – duża odpowiedzialność po stronie PIORiN
- *Neofabrea* spp., *Monilinia fructicola*, *Erwinia amylovora* – organizmy kwarantannowe np. w Chinach



# GRZYBY Z RODZAJU *MONILINIA* PORAŻAJĄCE OWOCE ZIARNKOWE

*M. fructigena*



7 doba  
inkubacji  
w temp.  
pokojowej

*M. polystroma*



*M. fructicola*



14 doba  
inkubacji  
w temp.  
pokojowej



*N. perennans*



*N. kienholzii*



*N. vagabunda*



~~*N. ... icis*~~



Objawy choroby na jabłkach - powodowane przez 4 gatunki grzybów – bardzo podobne: **okrągłe nekrotyczne zmiany, zapadnięte lub lekko wklęsłe, ciemne z jaśniejszym środkiem, a pod skórą zgnilizna mięszu w formie stożka. Kolor acerwulusów od białego po szary.**

**Niezwykle ważna jest  
czuła i szybka detekcja  
patogenów w  
bezobjawowo  
porażonych owocach  
przed wysyłką jabłek**



## METODY KONWENCJONALNE WYKRYWANIA GRZYBÓW Z RODZAJÓW *NEOFABRAEA* I *MONILINIA*

- izolacja na podłoża mikrobiologiczne
- obserwacja wzrostu kultur
- oznaczenie cech fenotypowych (mikro- i makroskopowych) i fizjologicznych
- testy patogeniczności

### Ograniczenia:

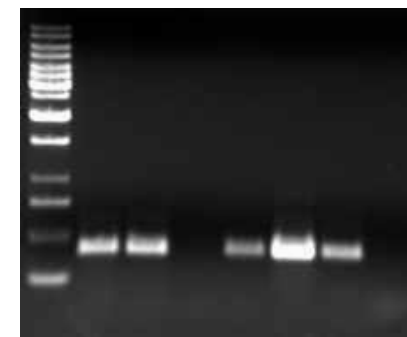
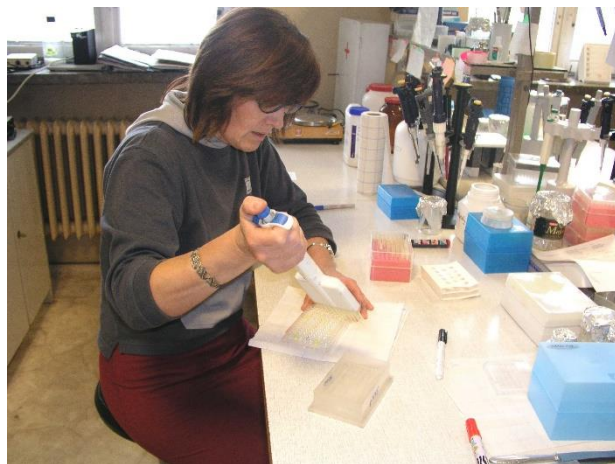
- widoczne objawy, niezdatne do detekcji porażenia latentnego
- zbyt mała zmienność szczepów między gatunkami, zbyt duża wewnątrzgatunkowa
- czasochłonne, mało precyzyjne





# METODY MOLEKULARNE WYKRYWANIA GRZYBÓW Z RODZAJÓW NEOFABRAEA I MONILINIA

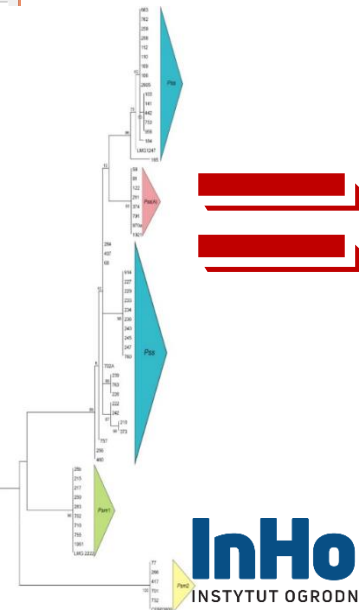
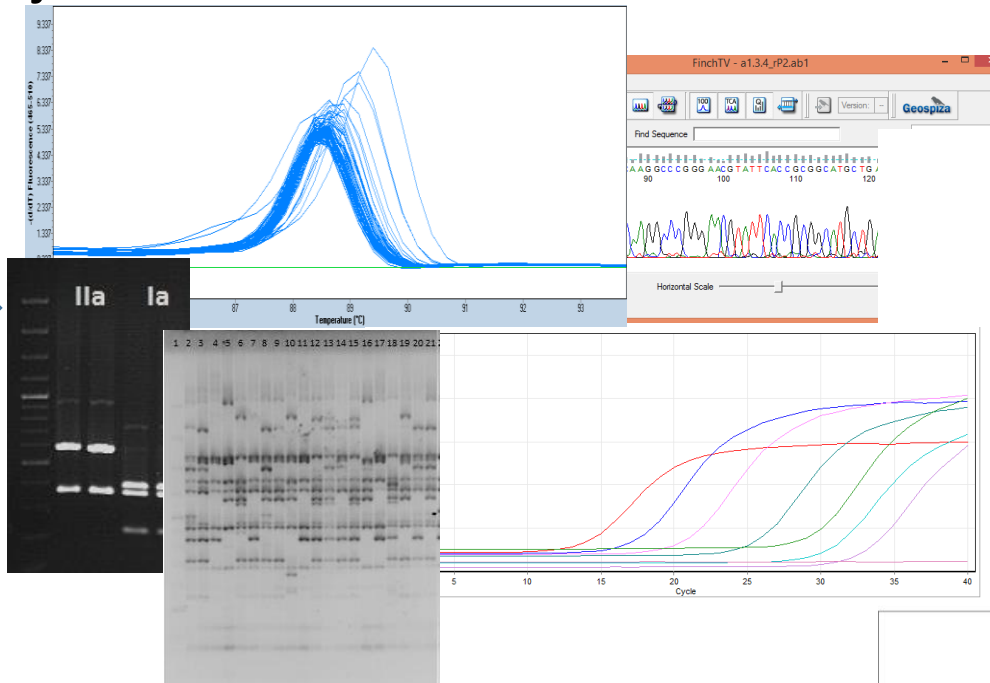
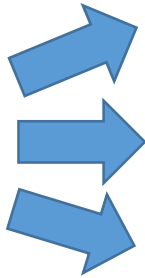
- Metody bazujące na DNA są bardziej precyzyjne
- Punkt wyjścia: Izolacja DNA z kultur akseńicznych oraz materiału mieszanego: grzyba pasożytniczego na jabłku



# Dostępne metody molekularne:

Z wykorzystaniem technik:

- PCR
- Multiplex PCR
- qPCR
- RFLP
- Sekwencjonowanie DNA
- LAMP

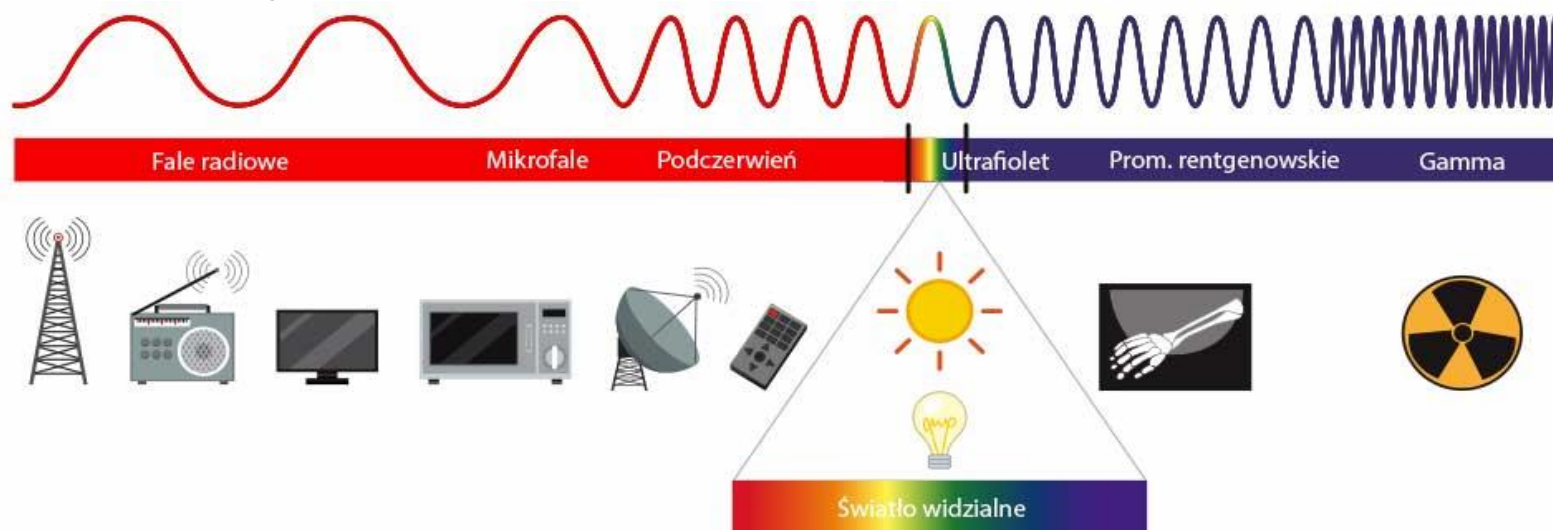


**Detekcja grzybów  
*Monilinia* spp. i *Neofabraea*  
*spp.* w bezobjawowo  
porażonych jabłkach**

## CEL BADAŃ

Opracowanie czułej metody detekcji *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* oraz *N. vagabunda*, *N. perennans* i *N. kienholzii* w porażonych bezobjawowo jabłkach

### Teledetekcja:



## CEL BADAŃ

Opracowanie czułej metody detekcji *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* oraz *N. vagabunda*, *N. perennans* i *N. kienholzii* w porażonych bezobjawowo jabłkach

### Metoda LAMP:

- Optymalizacja protokołu izolacji DNA z zakażonych jabłek
- Zaprojektowanie starterów do czułego i specyficznego wykrywania grzybów trzech gatunków *Monilinia* i trzech gatunków *Neofabrea*
- Opracowanie i walidacja metody umożliwiającej czułą i specyficzną detekcję grzybów z rodzaju *Monilinia* i *Neofabrea* w czasie rzeczywistym

## ETAP 1

### INOKULACJA JABŁEK W SADZIE DOŚWIADCZALNYM

**Lokalizacja:** Dąbrowice (łódzkie)

**Odmiana:** Topaz (podatna na brunatną zgniliznę drzew ziarnkowych i gorzką zgniliznę jabłek)

**Inokulum:**  $1 \times 10^6$  konidiów/ml grzybów patogenicznych

**Czas inokulacji:** 30 dni przed zbiorami

**Warunki pogodowe podczas inokulacji:**  
temperatura 18°C, względna wilgotność powietrza 78%

**Przechowywanie:** 5 miesięcy w 2 °C



## INOKULACJA JABŁEK W WARUNKACH LABORATORYJNYCH

**Odmiana:** Topaz

**Inokulum:**  $1 \times 10^6$  konidiów/ml

**Przechowywanie:** 10-15 dni w  
24°C



## ETAP 2

# POBIERANIE PRÓBEK JABŁEK I IZOLACJA DNA

- Owoce pobrano z przechowalni 30, 60 i 120 dni po zbiorze (3 sztuki jabłek)
- W warunkach laboratoryjnych owoce pobrano po 24 h od inokulacji, a następnie co 2 dwa dni aż do wystąpienia objawów chorobowych na wszystkich jabłkach
- Cała skórka jabłka została usunięta, wysuszona i zhomogenizowana
- Wykonano ekstrakcję DNA (protokół NucleoSpin Plant II Maxi z modyfikacjami)
- Czystość i jakość otrzymanego DNA sprawdzano spektrofotometrycznie
- W celu wykluczenia obecności inhibitorów reakcji PCR uzyskane DNA rozcieńczono i amplifikowano ze starterami uniwersalnymi do DNA jabłoni i grzybów strzępkowych



### ETAP 3 OPRACOWANIE METODY I WALIDACJA

- Poszukiwano genów, które mogłyby być dobrym markerem identyfikacyjnym, wybrano: gen *hsp* dla *Monilinia* kodujący białko szoku termicznego oraz *acpA* i *aspS* gen kodujący białko z domeną wiążącą GTP oraz gen proteazy aspartylowej
- Zaprojektowano jeden zestaw starterów HSP\_Moni dla metody LAMP w celu detekcji *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* oraz dwa zestawy do grzybów z rodzaju *Neofabrea* (jeden dla *N. vagabunda* i drugi dla *N. kienholzii* i *N. perennans*)
- Testowano specyficzność zestawów starterów w reakcjach z ponad kilkuset szczepami grzybów
- Reakcję LAMP optymalizowano w oparciu o DNA akseńskich kultur grzybów oraz sztucznie zakażonych jabłek z objawami gorzkiej zgnilizny jabłek lub brunatnej zgnilizny drzew ziarnkowych i DNA wyizolowany z jabłek bezobjawowych
- Walidację metody przeprowadzono w reakcji LAMP z DNA pochodzącym z naturalnych infekcji jabłek powodowanych przez grzyby *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. polystroma* oraz *N. vagabunda*, *N. kienholzii* i *N. perennans*.

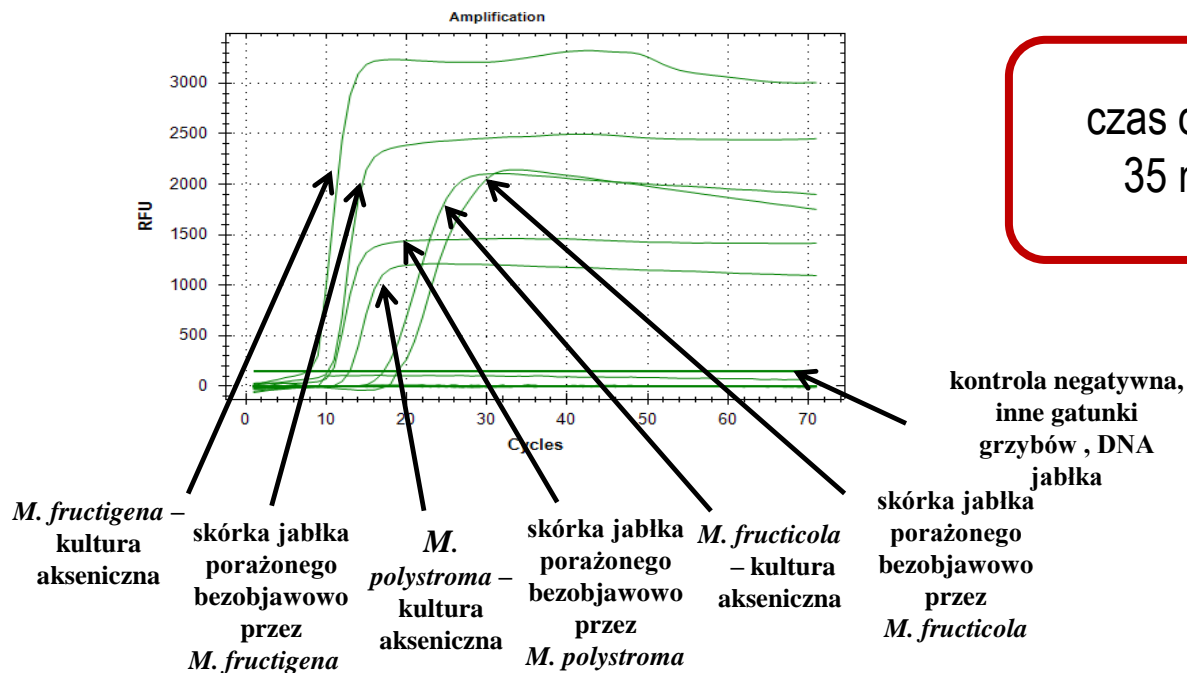
# WYNIKI

## OPTYMALIZACJA REAKCJI LAMP I WALIDACJA METODY

W wyniku przeprowadzonej reakcji LAMP z zestawem starterów HSP\_Moni otrzymano produkty reakcji dla:

- DNA szczepów grzybów *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. polystroma*
- DNA wyizolowanym z jabłek zakażonych grzybami z rodzaju *Monilinia*
- DNA wyizolowanym z jabłek porażonych przez grzyby z rodzaju *Monilinia*

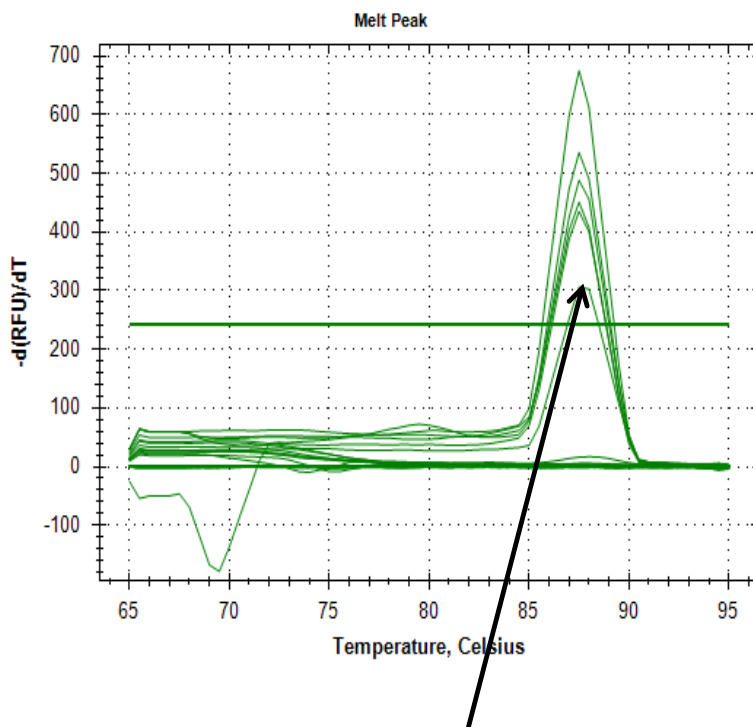
Dla DNA innych grzybów oraz DNA jabłoni wynik reakcji z zestawem starterów HSP\_Moni był negatywny.



Rys. Krzywe amplifikacji uzyskane w reakcji LAMP z zestawem starterów HSP\_Moni i DNA *Monilinia* spp.

## WYNIKI OPTYMALIZACJA REAKCJI LAMP

Analiza temperatury topnienia produktów po reakcji wykazała obecność pojedynczego piku dla 87,5°C w próbach z DNA szczepów *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola*

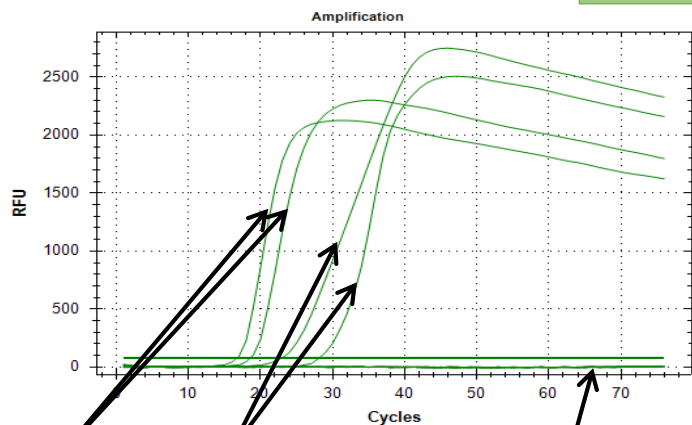


Produkty reakcji z DNA  
*M. fructigena*, *M. polystroma*  
i *M. fructicola*

# Wyniki:

- DNA po izolacji – sprawdzono, że jest amplifikowalne
- Reakcja LAMP z testowanymi zestawami z DNA z kultur aksecyjnych oraz materiału objawowego:

## LAMP detekcja *N. vagabunda*

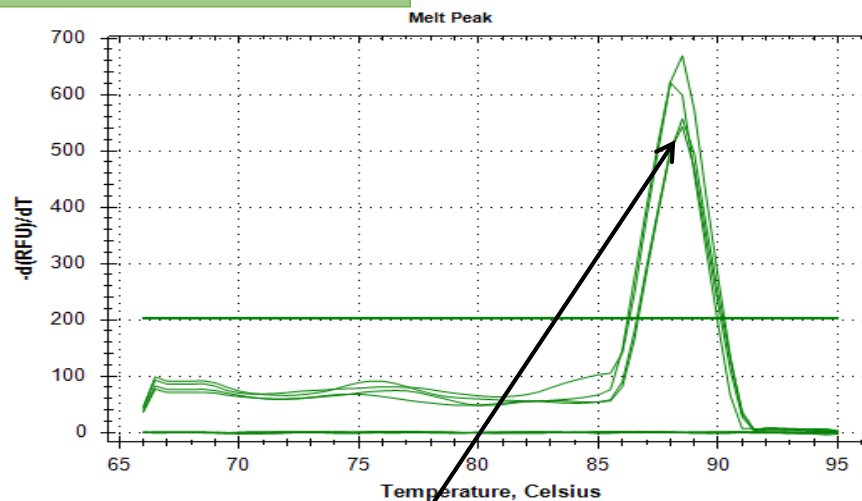


*N. vagabunda*  
czyste kultury

Jabłko z  
objawami  
*N. vagabunda*

Kontrola  
negatywna (inne  
gatunki grzybów,  
DNA jabłka)

czas detekcji  
35 minut



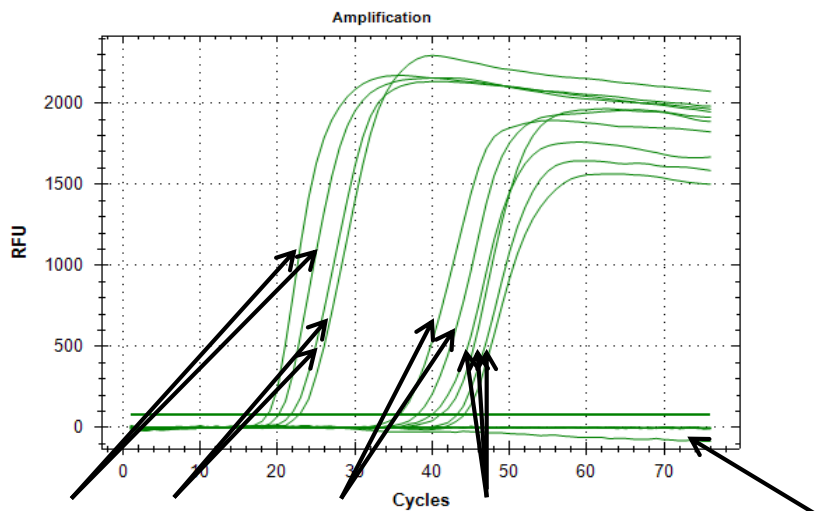
Topienie produktów  
reakcji

88,5°C

# Wyniki:

## LAMP

### Detekcja *N. kienholzii* i *N. perennans*



*N. perennans*  
czyste kultury

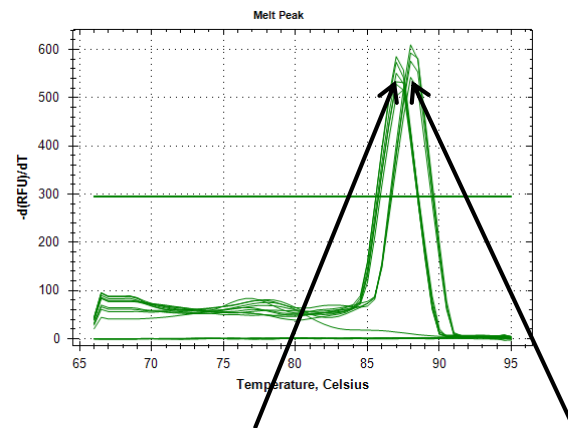
Naturalna  
infekcja  
*N. perennans*

*N. kienholzii*  
czyste kultury

Naturalna  
infekcja  
*N. kienholzii*

Kontrola  
negatywna (inne  
gatunki grzybów,  
DNA jabłka)

czas detekcji  
35 minut

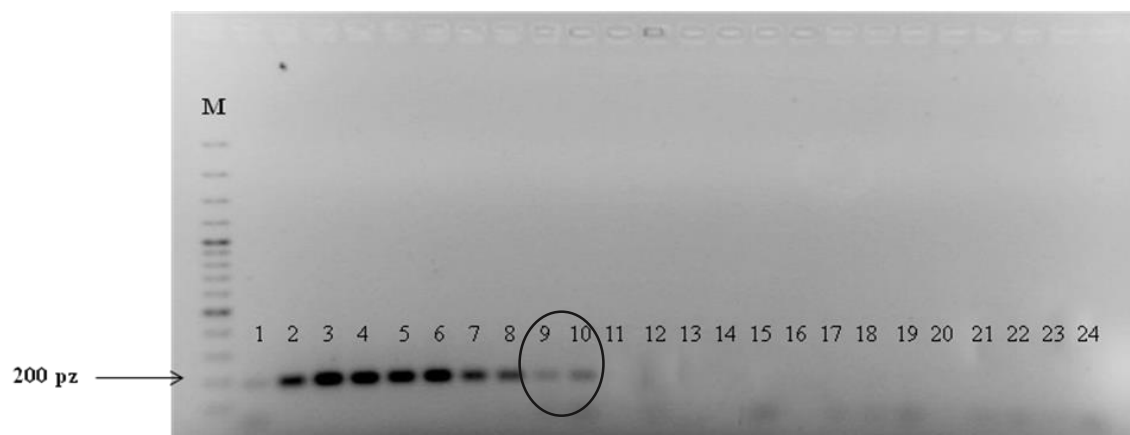


Topienie  
produktów reakcji  
*N. kienholzii* w  
87,0 °

Topienie  
produktów  
reakcji  
*N. perennans*  
w 88,0 °C

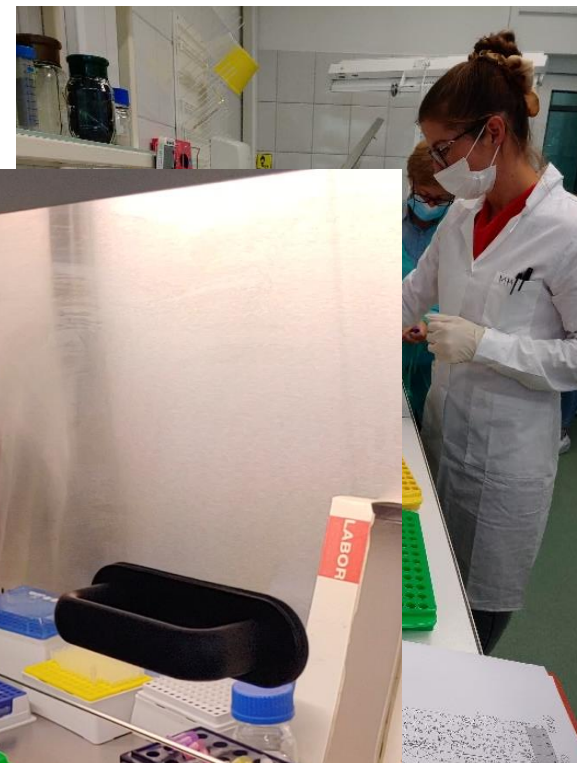
## WYNIKI CZUŁOŚĆ METODY LAMP

- Czulość wykrywania DNA wynosiła około **od 0,1 pg/μl do 1 pg/μl**.



Zdjęcie 2. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji fragmentu genu *hsp60* ze starterami HSP\_Moni\_F3 i HSP\_Moni\_B3 (1,5% żelu agarozowy). M – marker wielkości (O'Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Thermo Scientific), 1-2 – szczep P5b *M. polystroma* (stężenie 10 ng/μl), 3-4 – szczep T1a *M. fructigena* (stężenie 10 ng/μl), 5-6 – szczep DFc1 *M. fructicola* (stężenie 10 ng/μl), 7-8 – mix szczepów P5b, T1a i DFc1 zawieszony w wodzie (rozcieńczenie 50 –krotne), 9-10 - mix szczepów P5b, T1a i DFc1 zawieszony w wodzie (rozcieńczenie 100 –krotne), 11-24 - mix szczepów P5b, T1a i DFc1 (2x rozcieńczenie 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 25000 -krotne), 23 - DNA wyizolowane z jabłka, 24 – kontrola negatywna

## OPRACOWANE METODY WDROŻONO DO LABORATORIÓW GIORIN



# Podsumowanie i wnioski

- Opracowana metoda szybkiej i czułej detekcji patogenów z rodzajów *Neofabrea* i *Monilinia* z zastosowaniem LAMP jest pierwszą taką metodą na świecie
- Metoda została wdrożona w 4 laboratoriach GIORiN
- Metoda będzie wykorzystywana na podstawie próbek pobieranych losowo
- Problem będzie narastał – brak środków do ochrony jabłoni przed chorobami kory i drewna
- Inne kraje produkujące jabłka również są zainteresowane







07/2018-06/2020

# Early detection of fungal storage pathogens on pome fruits (EARLDETEC)



## Funding

Non-competitive funding mechanism. Each funder only pays for the participation of their

## Objectives

The overall goal is to provide qualitative and quantitative early detection systems for



Dr Ulrike Persen

[www.inhort.pl](http://www.inhort.pl)



Dziękuję za uwagę!