

# Diagnostyka molekularna grzybów z rodzaju *Pezicula* sp. – kluczowych patogenów jabłek

Klaudia Szpilska, Karolina Oszust\*, Jacek Panek, Agata Gryta, Michał Pylak, Magdalena Frąć

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin,

e-mail\*: k.oszust@ipan.lublin.pl



## Wprowadzenie

Sektor produkcji jabłek pełni ważną rolę w gospodarce naszego kraju. Polska jest bowiem jednym z największych producentów jabłek w Europie w związku z tym wielkość i jakość produkcji należą do priorytetowych zagadnień, na których koncentrują się producenci jabłek. Sadownicy borykają się jednak m.in. z problemem chorób przechowalniczych. Do chorób tych należy gorzka zgnilizna jabłek powodowana przez grzyby z rodzaju *Pezicula* sp. sensu lato (syn. *Neofabraea* sp.). Ze względu na latentny charakter gorzkiej zgnilizny trudno jest ocenić jakość jabłek podczas zbioru, ponieważ objawy choroby pojawiają się dopiero podczas przechowywania owoców w chłodniach. Do zakażenia dochodzi kilka miesięcy wcześniej, jeszcze w okresie wzrostu owoców. Źródłem infekcji są zarodniki przenoszone wraz z kroplami deszczu na zranione owoce i korę. Pierwsze objawy choroby na jabłkach są widoczne w postaci małych, brunatnych plam, które powiększają się i łączą ze sobą. Ze względu na długość okresu w jakim mogą wystąpić objawy choroby, niezbędne jest opracowanie czułego i dokładnego narzędzia diagnostycznego służącego do identyfikacji tych patogenów grzybowych.

## Materiały i metody

Dokonano przeglądu literatury na temat metod diagnostyki molekularnej grzybów należących do rodzaju *Pezicula* sp. (Tabela 1). Gariépy i in. zaprojektowali startery specyficzne dla gatunku do wykrywania *Pezicula* spp./ *Neofabraea* spp. metodą multipleksowej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a następnie zostały one zmodyfikowane i ulepszone przez kolejnych badaczy [1]. Inni naukowcy z kolei opracowali startery PCR w oparciu o sekwencje  $\beta$ -tubuliny w celu identyfikacji gatunku *Pezicula* sp. [2].

Tabela 1. Przegląd metod diagnostyki molekularnej grzybów należących do rodzaju *Pezicula* sp.

Starter	Orientacja	Sekwencje starterów (5'-3')	Metoda izolacji czystego szczepu	Metoda izolacji DNA (kit)	Amplifikacja	Literatura
RCAf	F	GACGACGCATCACCAACATC	Pozyskane z kolekcji kultur	MagPure Fungal DNA TL kit	94°C 1 min, 35 cykli w 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min	[1]
RCAr	R	TGAATCCCTGACACCAACACG				
N/P	F	CTT TCT CCG TTG TCC CAT CC	Pobrano fragmenty tkanki ze zmienionego chorobowo jabłka	Promega SP fungal DNA kit	94°C 2 min; 98°C 10 s, 57°C 30 s, 30 cykli w 72°C 30 s, 72°C 5 min	[2]
N/P	R	GAACATTGCGCATCTGGTCC				
UP18S42	F	CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC	Pobrano tkanki z jabłek z widocznymi objawami gorzkiej zgnilizny, a następnie wyizolowano pojedyncze zarodniki	Qiagen	95°C 2 min, 35 cykli w 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 72°C 7 min	[3]
LO28S22	R	GTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATG				
mrSSU1	F	AGCAGTGAGGAATATTGGTC				
mrSSU3R	R	ATGTGGCACGTCTATAGCCC				
Bt-T2m-UP	F	CAACTGGGCTAAGGGTCATT				
Bt-LEV-LO1	R	GTGAACCCATCTCGTCCATA				
EF1-983F	F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT				
EF1-2218R	R	ATGACACCRACRGCRACRGTYTG				
Neo_mal-loTub-262	R	GACAGCCAACCTTGCGG				
Neo_per-loTub-382	R	GGGTGCAACATCTGTTGT				
Neo_spnov-loTub-319	R	TGGTGAGAGGAGCGAAC				
Neo_alba3	R	AATATTAGCAGGATATCTCTTCAAG				
Neofab_uni	F	AACTTTCTCCGTGTGCCATC				
UN-UP18S-42	F	GGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC				
UN-LO28S576B	R	CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG				

N/P – nie podano; F – starter forward; R – starter reverse



## Wnioski

Analiza dostępnej literatury wskazuje na potrzebę opracowania sposobu wczesnej detekcji grzybów powodujących gorzką zgniliznę jabłek już w okresie przechowywania zebranych owoców. Pomimo wielu opracowanych starterów specyficznych priorytetem pozostaje ciągły rozwój narzędzi diagnostycznych w celu zapobiegania rozprzestrzenianiu się patogenów grzybowych z rodzaju *Pezicula* sp.

## Literatura

1. Lin H. doi: <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0448>
2. Cao D. doi: [10.4236/aim.2013.31009](https://doi.org/10.4236/aim.2013.31009)
3. Carneiro A. C. doi: [10.1094/PDIS-04-21-0687-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0687-RE)
4. Michalecka M. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12449>