

Diagnostyka¹
Diagnostic

Monilinia fructicola

Zakres stosowania

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla grzyba *Monilinia fructicola*.

Zatwierdzenia i nowelizacje

Po raz pierwszy zatwierdzony we wrześniu 2002 roku. Poprawiony w 2009 roku.

Wprowadzenie

Monilinia fructicola powoduje chorobę niszczącą głównie owoce drzew pestkowych, ale może również atakować inne drzewa owocowe z różowatych (np. *Malus* i *Pyrus*). Grzyb może poważnie zredukować zbiory owoców w wyniku zamierania pąków kwiatowych lub zgnilizny dojrzałych owoców zarówno tych, które pozostały na drzewie, jak i po zbiorze. Patogen atakuje także liście i pędy. Stopień zaawansowania choroby zależy w dużej mierze od pogody. Zgorzel kwiatów następuje w wilgotnych warunkach lub deszczowej pogodzie z umiarkowanymi temperaturami dnia (20–25°C) i zimnymi nocami. Zgnilizna dojrzałych owoców postępuje szybko w wysokich temperaturach i wysokiej wilgotności powietrza. Trzy gatunki *Monilinia* i jedna anamorfa *Monilinia* (*Monilia* sp.) mogą powodować brązową zgniliznę owoców, a dwa z nich (*Monilinia fructigena* i *Monilinia laxa*) są obecne w Europie od wielu lat. *Monilia polystroma*, anamorfa gatunku blisko spokrewnionego z *M. fructigena*, znana jest tylko w Japonii (van Leeuwen i wsp., 2002). Z kolei *Monilinia fructicola* występuje w Północnej i Południowej Ameryce, Japonii i Australii (EPPO/CABI, 1997). Grzyb ten został wykryty we Francji podczas lustracji prowadzonych w roku 2001 (OEPP/EPPO, 2002). O stwierdzeniu patogena donoszono

¹ Użyte w standardach EPPO nazwy odczynników lub wyposażenia nie znaczą wykluczenia innych odczynników czy wyposażenia, które również mogą być przydatne.

z Hiszpanii (OEPP/EPPO, 2006) oraz z Republiki Czeskiej, gdzie lustracje prowadzono w 2006 roku (OEPP/EPPO, 2008). Dalsze rozprzestrzenienie patogena w Europie mogłoby prowadzić do wzrostu strat w sadach, szczególnie brzoskwini, nektarynki i moreli. Koszty zwalczania mogły wzrosnąć i rozwinąć się odporność na zastosowane fungicydy (van Leeuwen *et al.*, 2001).

Tożsamość

Nazwa: *Monilinia fructicola* (Winter) Honey

Synonim: *Sclerotinia fructicola* (Winter) Rehm

Anamorfa: *Monilia fructicola* Batra

Stanowisko taksonomiczne: Fungi: *Ascomycota: Helotiales*

Komputerowy kod Bayera: MONIFC

Kategoria fitosanitarna: EPPO A2 list: nr 153; EU I/A1

Wykrywanie

Zainfekowane pąki kwiatowe stają się brązowe i zamierają, a jeśli wilgotna lub deszczowa pogoda utrzymuje się, to na martwej tkance tworzy się zarodnikowanie grzyba. Po zgorzeli kwiatów zwykle dochodzi do infekcji pędów, ponieważ grzyb rośnie z porażonych pąków w kierunku przylegającej tkanki pędu. Jest on przyczyną zamierania powierzchni kory, która zwykle jest zapadnięta i ma ostro zarysowane brzegi. Porażone liście wykazują mniej lub bardziej okrągłe, brązowe martwe obszary, które później wypadają, dając wygląd „przestrzelenia” lub zamierają całe liście. Rozwijające się owoce mogą być atakowane przez grzyba w każdym stadium rozwoju, generalnie jednak choroba nie jest poważna do czasu, kiedy owoce osiągną dojrzałość. Porażone owoce mogą opadać, jak i pozostawać na drzewie. Owoce więdną, schną i w takiej postaci znane są, jako mumie. Sporodochia tworzą się na wszystkich częściach porażonych organów. Charakterystyczne objawy choroby przedstawiono na ryc. 1A i B. Najbardziej prawdopodobne jest, że za rozprzestrzenienie międzynarodowe patogena są odpowiedzialne przesyłki ukorzenionych roślin i świeżych owoców.

Identyfikacja

Gatunki *Monilinia* (*Monilia*) powodują brązową zgniliznę owoców, która jest trudna do odróżnienia jedna od drugiej. Identyfikacja jest możliwa poprzez połączenie metody hodowlanej

tj. cech morfologicznych kultury takich, jak: tempo i typ wzrostu oraz kolor kultury z morfologicznymi cechami, jak wymiary konidiów, długość strzępki kiełkowej (van Leeuwen & van Kesteren, 1998; De Cal & Melgarejo, 1999). Większość z tych cech ma charakter ilościowy i może zachodzić na siebie, dlatego identyfikacja musi być przeprowadzana w standaryzowanych warunkach i w czystej kulturze. Nawet wówczas, atypowe izolaty *M. fructicola* mogą zostać pomyłkowo zidentyfikowane, jako *M. laxa* lub odwrotnie (van Leeuwen & van Kesteren, 1998). W rezultacie same metody klasyczne nie są dostateczne do celów diagnostyki fitosanitarnej, która wymaga szybkości, niezawodności dla szczególnie szybko psujących się przesyłek owoców miękkich.

Niniejszy protokół diagnostyczny zaleca izolację *Monilinia* spp. z roślin żywicielskich, a następnie przeprowadzenie testu PCR specyficznego dla gatunku. Kiedy obecna jest grzybnia na badanym materiale możliwe jest również przeprowadzenie bezpośredniego testu PCR.

W sytuacji, kiedy metoda ta nie jest dostępna podejrzone kultury *M. fructicola* powinny zostać przesłane do laboratorium, które może przeprowadzić tego rodzaju badanie oraz szczegółową analizę taksonomiczną (np. Krajowe Laboratorium Referencyjne, Wageningen, Holandia).

Identyfikacja morfologiczna

Izolacja

Do izolacji stosuje się standardową procedurę wykładania fragmentów porażonego materiału (z lub bez powierzchniowej dezynfekcji) na lekko zakwaszony agar (pH 4–4.5). Donoszono o mieszanej infekcji *M. fructicola* z innymi gatunkami *Monilinia*, dlatego też izolacja powinna zostać przeprowadzona z różnych części owocu.

Podłoża hodowlane

Agar glukozowo-ziemniaczany (PDA) (van Leeuwen & van Kesteren, 1998; De Cal & Melgarejo, 1999).

Cechy charakterystyczne w kulturze

Zgodnie z literaturą tempo wzrostu dla *M. fructicola* na pożywce PDA w temp. 22°C, w świetle bliskim UV (320 –380 nm) 12 –16 godz. wynosi 9–20 mm, na 24 godz. (De Cal & Melgarejo,

1999), średnio ok. 13 mm na 24 godz. (van Leeuwen & van Kesteren, 1998). Inokulum (ok. 4 mm średnicy) pobrane z brzegu 4-dniowej kultury rosnącej na PDA w temp. 22°C i ciemności powinno być umieszczone w centrum szalki w dwóch powtórzeniach i inkubowane przez 10 dni w temp. 22°C przy 12 godzinnej ekspozycji na światło UV i takim samym czasie w ciemności (kolonie *M. fructicola* powinny wypełnić szalkę o średnicy 9 cm w 6-7 dni). Zamiennie 10 szalek można inkubować przez 5 dni, a tempo wzrostu obliczać ze zmian w średnicy pomiędzy 3 a 5 dniem. Zarodnikowanie powinno być obfite, w koncentrycznych pierścieniach (fot. 1 C), ze sporogeniczną tkanką zabarwioną na kolor orzechowy do szarawego (nie żółto-brązowy, jasno żółty lub żółto-kremowy). Brzeg kolonii powinien być prawie całkowity, a powierzchnia kolonii gładka (bez wzoru róży i czarnych sektorów). Z wiekiem mogą rozwijać się na powierzchni agaru lub wewnątrz pożywki nieregularne stromatyczne skorupki lub sklerotia w kształcie dysku. Liczne mikrokonidia mogą być widoczne makroskopowo w postaci czarnych sektorów, szczególnie na brzegach szalki Petriego. Kolor kultur powinien być określony wg Rayner (1970).

Porównanie z gatunkami podobnymi

Monilinia fructigena: Kultury charakteryzują się wolniejszym tempem wzrostu (ok. połowę wolniejszym niż *M. fructicola*) w warunkach opisanych powyżej. Kolor kultury *M. fructigena* jest kremowo-żółty, podczas gdy kultura *M. fructicola* jest wyraźnie 'nie kremowo-żółta, ale orzechowa do szarawej. *M. fructigena* zarodnikuje słabo.

Monilinia laxa: Kultury *M. laxa* charakteryzują się wolniejszym tempem wzrostu (ok. połowę wolniejszym niż *M. fructicola*) w warunkach opisanych wyżej. *M. laxa* posiada wyraźny płatkowaty brzeg kultury i wzór róży. Charakterystyczne czarne pierścienie/sektory związane są w kulturze z układem tzw. płatków róży. Na spodzie szalki widoczne są sektory lub pierścienie związane z płatkami (obszarów z czarnymi plamkami lub brązowymi sektorami lub pierścieniami można nie brać pod uwagę). Kolonie o wzorze róży (wyglądające jak otwarty kwiat np. grzybnia układa się w wyraźne warstwy na wierzchołku, które odpowiadają płatkom) można rozpoznać zarówno na wierzchniej, jak i spodniej stronie szalki. Grzyb zarodnikuje słabo.

Monilia polystroma: Kultury *M. polystroma* są podobne do tych, które tworzy *M. fructigena*, za wyjątkiem intensywnego tworzenia po 10–12 dniach inkubacji czarnej stromy na szalkach.

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę czterech gatunków, które rosły w standardowych warunkach. Rysunek 1 ilustruje różnice w morfologii kultur (C–E) oraz kiełkowanie konidiów (F–H). Klucz do identyfikacji opracowany przez Lane (2002) wykorzystuje charakterystyczne cechy kultur i można go zastosować do rozróżnienia trzech gatunków *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*. Kultury rosły na 4% PDA w temp. 22 °C, przez 12 godz. w ciemności i 12 godz. w świetle bliskim UV (320–380 nm).

Tabela 1

Porównanie charakteru kultur *Monilinia* spp. wyizolowanych z jabłek, gruszek i owoców pestkowych.

	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>	<i>M. fructigena</i>	<i>M. polystroma</i>
Kolor kultury	orzechowo-szarawa	orzechowo-szarawa	żółto-kremowa	żółto-kremowa
Wzrost przez 24 h	9 – 20 mm	2 – 11 mm	0 – 12 mm	4 – 9 mm
Zarodnikowanie	Obfite	Skąpe	Skąpe	Skąpe
Zarodniki w koncentrycznych pierścieniach	Tak	Nie	Czasami	Czasami
Brzeg kultury płatkowaty	Nie	Tak	Nie	Nie
Kultura o wzorze róży	Nie (rzadko)	Tak	Nie	Nie
Wzór róży z czarnymi sektorami	Nie	Tak	Nie	Nie

Morfologia

Strzępki: pierwotne strzępki są cienkościenne, często ponad 250 µm długie i 7–10 µm szerokie z jednym lub więcej odgałęzieniami, które tworzą się przed pierwszą przegrodą. Strzępki wtórne i następne są często dużo węższe.

Konidia: blastyczne, tworzą się w łańcuszkach (Ryc. 1 I, J) z najmłodszym zarodnikiem w części dystalnej lub czasami typu artrospory, elipsoidalne, jajowate lub cytrynkowate często ze ściętymi końcami, 8 –28 × 5–19 µm (najczęściej 12–16 × 8– 11 µm), hialinowe (w masie szare do

płowożółtych). Na agarze wodnym, przygotowanym z wody wodociągowej (18 h w 25°C) większość konidiów tworzy pojedyncze, długie i nierozgałęzione strzępki kielkowe 750–900 µm (Ryc. 1 H). Jednakże, strzępki kielkowe konidiów pobranych bezpośrednio z owoców mogą być bardziej zróżnicowane. Stadium mikrokonidialne (stadium spermatium) jest zwykle obecne i często liczne w starych kulturach.

Sklerotia: normalnie nie tworzą się sklerotia, ale na porażonych owocach rozwija się sucha substratowa stromata, której warstwy zastępują większość owocni.

Apotecja: tworzą się nieregularnie wiosną na opadłych, zmumifikowanych owocach.

Porównanie z gatunkami podobnymi

Konidia *Monilinia fructigena* są większe (średnio 17–21 × 10–13 µm) i często jedno konidium tworzy dwie strzępki kielkowe.

Monilinia laxa tworzy konidia w wielkości podobne do *M. fructicola*, jednak strzępki kielkowe są pojedyncze, ale skręcone i krótkie (150–350 µm).

Monilia polystroma ma morfologię podobną do *M. fructigena*, za wyjątkiem tego, że konidia są troszkę mniejsze (13–17 × 9–11 µm) i mieszczą się w tym samym zakresie, co wielkość konidiów *M. fructicola*.

Metody biologii molekularnej

Dla gatunku *M. fructicola* opracowano kilka metod molekularnych. Pierwsze metody były oparte na zastosowaniu podjednostki (SSU) rDNA z intronu I (Fulton & Brown, 1997, Snyder & Jones, 1999). Dalsze badania wykazały, że nie można było polegać na tych metodach bowiem niektóre izolaty *M. fructicola* nie miały grupy intronu w ich małych podjednostkach rDNA (Fulton *et al.*, 1999). Nowe startery PCR zostały opracowane przez Hughes i wsp. (2000), Ioos & Frey (2000), Côté i wsp. (2004), Gell i wsp. (2007). Procedury te rozróżniają od siebie *M. fructicola*, *M. fructigena* i *M. laxa*. Inne startery PCR oraz protokoły diagnostyczne zostały opublikowane przez Förster & Adaskaveg (2000), Boehm i wsp. (2001) i Ma i wsp. (2003). Jednakże, opisane metody odróżniają *M. fructicola* od *M. laxa* ale nie zostały zwalidowane do odróżniania *M. fructicola* od *M. fructigena*. Metoda PCR opracowana przez Hughes i wsp. (2000) wykazała brak reakcji krzyżowych z *M. polystroma* (K. Hughes, informacja ustna). Metoda PCR opracowana przez Ioos i Frey (2000) również nie daje reakcji krzyżowych z *M. polystroma* (L.F.F. Kox, informacja

ustna). Podobnie, Côté i wsp. (2004) wykazali, że ich metoda także nie daje reakcji krzyżowych z *M. polystroma*. Żadne z innych metod nie zostały zwalidowane pod kątem rozróżnienia *M. fructicola* od *M. polystroma*; może to nie stanowić problemu w regionie EPPO, bowiem uznaje się, że ten ostatni gatunek występuje tylko w Japonii. Luo i wsp. (2007) oraz van Brouwershaven i wsp. (publikacja w przygotowaniu) opracowali metody real-time PCR. Pierwsza metoda wykorzystująca barwnik SYBR Green została zwalidowana tylko dla gatunku *M. laxa*. Druga metoda z sondami TaqMan została zwalidowana dla czterech gatunków *Monilinia* spp., powodujących brunatną zgniliznę drzew owocowych.

Techniki PCR opracowane przez Ioos & Frey (2000) oraz van Brouwershaven i wsp. zostały opisane w Załączniku 1 i 2, jako metody rekomendowane. W przypadku obecności na badanym materiale grzybni możliwe jest przeprowadzenie bezpośredniego badania metodą PCR.

Materiał odniesienia

Można uzyskać z kolekcji:

- ATCC, 12301 Parklane Drive, Rockville, MD 20852-1776, USA. Fax +1 301 231 5826.
- Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, the Netherlands, fax +31 30 251 2097.

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji przedstawiono w standardzie EPPO PM 7/77 (1) *Sprawozdawczość i dokumentowanie wyników badań*.

Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje dotyczące tego organizmu można uzyskać od:

C. R. Lane, Central Science Laboratory (DEFRA), Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK).

G.C.M. van Leeuwen, National Reference Lab, PPS-Wageningen, the Netherlands.

Podziękowania

Protokół ten w wersji oryginalnej został przygotowany przez:

R. P. Baayen, R. Pieters & G. C. M. van Leeuwen, Dutch Plant Protection Service, Wageningen (Netherlands). K. J. D. Hughes & C. R. Lane, Central Science Laboratory (DEFRA), Sand

Hutton, York, YO41 1LZ (UK). Został poprawiony przez L. F. F. Kox & G. C. M. van Leeuwen Dutch Plant Protection Service, Wageningen (Netherlands)

Materiały źródłowe (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

Batra LR (1991) World Species of *Monilinia*: their Ecology, Biosystematics and Control. J. Cramer, Berlin (DE).

Boehm EWA, Ma Z & Michailides TJ (2001) Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. *Phytopathology* **91**, 428–439.

Byrde RJW & Willetts HJ (1977) The Brown Rot Fungi of Fruit. Pergamon Press, Oxford (GB).

De Cal A. & Melgarejo P (1999) Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Disease*. **83**, 62-65

Côté M-J, Tardiff M-C & Meldrum AJ (2004) Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* **88**, 1219-1225.

EPPO/CABI (1997) *Monilinia fructicola*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 530–535. CAB International, Wallingford (GB).

Förster H & Adaskaveg JE (2000) Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* **90**, 171–178.

Fulton CE & Brown AE (1997) Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiology Letters* **157**, 307–312.

Fulton CE, Van Leeuwen GCM & Brown AE (1999) Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 495–500.

Gell I, Cubero J & Melgajero P (2007) Two different approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 2629-2637

Hughes KJD, Fulton CE, McReynold D & Lane CR (2000) Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 507–511.

Ioos R & Frey P (2000) Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 373–378.

Ioos R, and Iancu G (2008) European collaborative studies for the validation of PCR-based detection tests targeting regulated fungi and oomycetes. *EPPO Bulletin*, *w druku*.

Lane CR (2002) A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *laxa*, based on examination of cultural characters. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 507– 511.

Luo Y, Ma Z, Reyes HC, Morgan D & Michailides TJ (2007) Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* **118**, 145-154.

Ma Z, Luo Y & Michailides TJ, (2003) Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. *Journal of Phytopathology* **151**, 312-322.

OEPP/EPPO (2002) First report of *Monilinia fructicola* in France. *EPPO Reporting Service* 2002/003.

OEPP/EPPO (2006) First report of *Monilinia fructicola* in Spain. *EPPO Reporting Service* 2006/043.

OEPP/EPPO (2008) First record of *Monilinia fructicola* in the Czech Republic. *EPPO Reporting Service* 2008/050.

Rayner RW (1970) *A Mycological Colour Chart*. CAB International, Wallingford (GB).

Snyder CL, Jones AL, 1999. Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Canadian Journal of Plant Pathology* **21**, 70-7.

van Brouwershaven IR, van Leeuwen GCM & Kox LFF (2008) A real-time (TaqMan))PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other *Monilinia* spp. on fruit. Manuscript in preparation.

van Leeuwen GCM & van Kesteren HA (1998) Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany* **76**, 2042–2050.

van Leeuwen GCM, Baayen RP & Jeger MJ (2001) Pest risk analysis (PRA) for the countries of the European Union as PRA area on *Monilinia fructicola*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 481–487.

van Leeuwen GCM, Baayen RP, Holb IJ & Jeger MJ (2002) Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp.nov. from *Monilia fructigena*. Mycological Research **106**, 444–451.

ZAŁĄCZNIK I.

Identyfikacja *Monilinia fructicola* z użyciem konwencjonalnego PCR (Ioos & Frey, 2000)

Protokół ten w wersji oryginalnej został opracowany przez Ioos & Frey (2000), a następnie poprawiony i zwalidowany podczas badań prowadzonych w ramach współpracy europejskiej (Ioos & Iancu, 2008).

Niniejsza metoda została sprawdzona podczas badań międzylaboratoryjnych przeprowadzonych w roku 2007, w których udział wzięło 13 laboratoriów należących do europejskiej sieci mikologów (European Mycological Network). Badania były zgodne z normą EN ISO 16140 i wykazały dokładność, czułość i selektywność odpowiednio 100%. Podczas gdy zgodność (np. jakościowa powtarzalność i odtwarzalność) zostały oszacowane na 100% każda (Ioos & Iancu, 2008).

Dla każdego gatunku zaprojektowano specyficzne startery. Ich specyficzność została sprawdzona na dużej kolekcji gatunków z rodzaju *Monilinia* składającej się z 17 izolatów *M. laxa*, 16 izolatów *M. fructigena* oraz 6 izolatów *M. fructicola*. Startery były również testowane z *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*, dwoma gatunkami grzybów blisko spokrewnionych z rodzajem *Monilinia* oraz z DNA wyekstrahowanym z innych patogenów powszechnie związanych z brunatną zgnilizną drzew owocowych. W żadnym przypadku wymienionych grzybów nie uzyskano produktu amplifikacji.

1. Informacje ogólne

- 1.1. Protokół ten został opracowany przez Ioos & Frey (2000)
- 1.2. DNA izoluje się z kultur (A) lub z podejrzanych o porażenie owoców (B).
- 1.3. Celem badania są dwa polimorficzne regiony ITS.
- 1.4. Amplikon pokrywa region obejmujący swoim zasięgiem zasady 88-108 (ITS 1) i zasady 422-443 (ITS 2).
- 1.5. Wielkość amplikonu wynosi 356 pz.

- 1.6. Oligonukleotydy: starter forward 5'-TATGCTCGCCAGAGGATAATT-3' (ITS1-Mfc1), starter reverse 5'-TGGGTTT TGGCAGAAGCACACT-3' (ITS4Mfc1). Startery powinny być oczyszczone.
- 1.7. Stężenie Tag DNA polimerazy 5 U μl^{-1} .
- 1.8. Stężenie nukleotydów: 0,2 μM dla każdego oligonukleotydu, 150 μM dla każdego dNTPs
- 1.9. Bufor Taq polimerazy: 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl.
- 1.10. TE bufor (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).
- 1.11. Do wszystkich reakcji stosuje się wodę do analiz molekularnych.
- 1.12. Test PCR został początkowo opracowany dla termocyklera firmy Hybaid, model Omn-E, jednakże inne termocyklery są również odpowiednie.

2. Metody

2.1. Izolacja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.

2.1.1. DNA izoluje się z kultur (A): pobiera się fragment o wielkości ok. 1 cm^2 z kultury grzyba lub (B) z podejrzanych owoców wycina się skalpelem fragment o średniej wielkości 1 cm^2 i przenosi do próbki mikrowirówkowej. Próbki są następnie rozcierane przez 2 min. z dwiema 3 mm kulkami ze stali lub węgla wolframu i dodatkiem 400 μl buforu lizującego, przy częstotliwości 30Hz w aparacie TissueLyser[®] Qiagen, les Ullis lub podobnym. Próbki można również zhomogenizować w móżdzierzu umieszczonym w ciekłym azocie lub z użyciem innej, skutecznej techniki homogenizacji.

2.1.2. Izolacja kwasu nukleinowego: DNA izoluje się z użyciem metody hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)/proteiny K (Henrion i wsp. 1994). Odpowiednie są również komercyjne zestawy do izolacji DNA (Ioos, ustna informacja) i powinny być one stosowane ze względu na niższą toksyczność ich składników.

2.1.3. Do czasu przeprowadzenia analizy oczyszczone DNA grzybowe lub pochodzące z porażonej tkanki roślinnej przechowuje się w temperaturze niższej niż -17°C .

2.2. Reakcja polimerazy łańcuchowej - PCR (stężenie końcowe)

2.2.1. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej reakcji PCR: 20 μl

2.2.2. bufor PCR: 1x

2.2.3. 2 mM MgCl_2

- 2.2.4. 150 μ M każdego dNTPs
- 2.2.5. 0,0375 U/ μ l Taq polimerazy
- 2.2.6. 0,2 μ M startera “forward”
- 2.2.7. 0,2 μ M startera “reverse”
- 2.2.8. 1-3 ng/ μ l badanego DNA
- 2.2.9. Uzupelnia się do objętości 20 μ l wodą molekularną
- 2.2.10. Parametry reakcji PCR: 3 min w 94°C, 35 cykli denaturacji (94°C, 30s), przyłączenie (63°C, 30s) i wydłużanie (72°C, 60s), z końcowym wydłużaniem (72°C, 10 min).

3. Istotne informacje proceduralne

- 3.1. Produkty PCR rozdziela się na 1% żelu agarozowym przygotowanym w 0,5× buforze TBE.
- 3.2. W celu zapewnienia, że nie wystąpiła kontaminacja do każdej reakcji należy włączyć kontrolę negatywną (bez badanego DNA) oraz kontrolę pozytywną odpowiednio do limitu wykrywalności (rozcieńczony genomowy DNA z referencyjnego szczepu *M. fructicola* lub namnożonego produktu PCR uzyskanego przy zastosowaniu starterów ITS1Mfcl/ITS4Mfcl). Ponadto, ponieważ dwa inne europejskie gatunki *Monilinia* tj. *M. fructigena* i *M. laxa* mogą być obecne w tej samej niszy ekologicznej i filogenetycznie są one bardzo bliskie *M. fructicola*, genomowe DNA ze szczepów referencyjnych obu gatunków może zostać włączone do każdej reakcji PCR. jako kontrola specyficzna.
- 3.3. Jakość ekstraktu DNA można ocenić stosując wewnętrzną kontrolę amplifikacji lub badanie ekstraktu z reakcji PCR z użyciem uniwersalnych starterów ITS1 i ITS4 (White i wsp., 1990). W tym ostatnim przypadku warunki reakcji PCR są takie same, jak opisano powyżej, a zamienia się startery ITS1Mfcl/ITS4Mfcl starterami ITS1 i ITS4 i obniża temperaturę przyłączenia do 50°C. Pozytywny sygnał z tego badania oznacza, że ekstrakt DNA został amplifikowany: czyli DNA zostało wyizolowane, a inhibitory miały wystarczająco niski poziom.
- 3.4. Próbkę roślinne, z których wyizolowano DNA, o wielkości 356 pz. powinny zostać uznane za porażone przez *M. fructicola*. Próbkę, które nie dały oczekiwane fragmentu DNA

powinny być uznane za negatywne wówczas, kiedy udowodni się, że ekstrakt DNA został zamplifikowany i nie stwierdzono wyraźnego wpływu inhibitorów.

Załącznik 2 – Identyfikacja *Monilinia fructicola* za pomocą real-time PCR (van Brouwershaven i wsp.)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Protokół diagnostyczny został opracowany przez van Brouwershaven i wsp. (artykuł w druku)
- 1.2. Źródło kwasu nukleinowego stanowi grzybnia
- 1.3. Badanie zostało zaprojektowane dla wewnętrznych przerywników transkrybowanych (ITS) produkującego amplikon o wielkości 140 pz.
- 1.4. Użyte Oligonukleotydy: starter prawy Mon139F(5'- CAC CCT TGT GTA TYATTA CTT TGT TGC TT -3'), starter lewy Mon139R (5'- CAA GAG ATC CGT TGT TGA AAG TTT TAA -3') i sondy Taqman P_fc (FAM-TAT GCT CGC CAG AGG ATA ATT-MGBNFQ i P₂_fgn/lx/ps (5'-VIC-AGT TTG RTT ATT CTC TGG CGA-MGBNFQ).
- 1.5. Do przygotowania reakcji i mieszaniny reakcyjnej została użyta woda do analiz molekularnych; powinna być oczyszczona (dejonizowana lub destylowana), sterylna (autoklawowana lub filtrowana na filtrze o wielkości oczek 0,45 µm) i wolna od nukleaz.
- 1.6. Do reakcji PCR zostały użyte mieszanina reakcyjna 2xX TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), zawierająca Taq polimerazę, bufor reakcyjny z MgCl₂ oraz nukleotydy (Applied Biosystems).
- 1.7. Amplifikację przeprowadzono z użyciem termocyklera real-time PCR np. 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems).
- 1.8. Czułość analityczna (limit detekcji) testu wynosi 0,6 pg DNA.
- 1.9. Specyficzność analityczna testu została określona z użyciem 11 izolatów *M. fructicola*, 11 izolatów *M. fructigena*, 6 izolatów *M. laxa*, 4 izolatów *M. polystroma* i 14 izolatów pokrewnych gatunków (*Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotium*) oraz grzybów, które mogą być obecne na owocach pestkowych i ziarnkowych. Wszystkie izolaty *M. fructicola* dały reakcję pozytywną. Nie obserwowano reakcji krzyżowych z innymi gatunkami.

2. Metody

2.1. Izolacja i oczyszczanie kwasu nukleinowego

2.1.1. DNA izoluje się z grzybni pobranej z owoców lub kultury grzyba. Grzybnię (ok. 1cm²) przenosi się do mikroprobówki wirówkowej (1,5ml) zabezpieczonej płaską pokrywką (np. probówki Superlock, BIOzym TC, Landgraaf, NL) zawierającej 1 nierdzewną, stalową kulkę (o średnicy 3,97 mm) i 300 µl buforu ekstrakcyjnego (0,02 M PBS, 0,05% Tween T25, 2% polyvinylpyrrolidone, 0,2% bovine serum albumine). Probówki umieszcza się w młynku (np. Mixer Mill MM300, Retsch, Eragny Sur Oise, Francja) na 80 sek. i 1,800 uderzeń na minutę. Mieszaninę odwirowuje się przez 5s przy maksymalnym przyspieszeniu mikrowirówki (16100 g) i 75µl uzyskanego supernatantu wykorzystuje się do ekstrakcji DNA.

2.1.2. DNA można ekstrahować z użyciem dostępnych w handlu kitów np. DNeasy Plant Kit (Qiagen) lub QuickPick Plant DNA kit (Bionobile, Parainen) zgodnie z instrukcją producentów. Końcowa objętość mieszaniny DNA wynosi 50 µl.

2.1.3. W przypadku izolacji DNA za pomocą DNeasy Plant Kit konieczne jest oczyszczenie DNA przy użyciu kolumn wypełnionych polyvinylpyrrolidone (PVPP). Kolumny typu Axygen Multi-Spin columns (Dispolab, Asten, The Netherlands) wypełnia się 0,5cm PVPP, umieszcza w pustej probówce reakcyjnej i dwukrotnie obmywa 250 µl wody molekularnej poprzez wirowanie kolumn przez 5 min przy 4 000 g. Zawiesina DNA jest dodawana do kolumny z PVPP i wirowana przez 5 min przy 4,000 g. Uzyskana frakcja jest stosowana do reakcji PCR. DNA izolowane z użyciem zestawu Quick Pick nie wymaga oczyszczania.

2.1.4. DNA użyć od razu lub przechowywać przez noc w temp. 4°C lub w temp. - 20°C do dłuższego przechowywania.

2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy

2.2.1 Master mix (stężenie na 25 µl pojedynczej reakcji)

- 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- 0,2 µl każdego startera
- 0,2 µl każdej sondy TaqMan
- do 20 µl woda molekularna
- 5,0 µl wyizolowanego DNA uzyskanego w sposób opisany wyżej

2.2.2 Parametry cykli PCR: 95°C przez 10 min, 40 cykli w 95°C przez 15 sek. i 60°C przez 1 min.

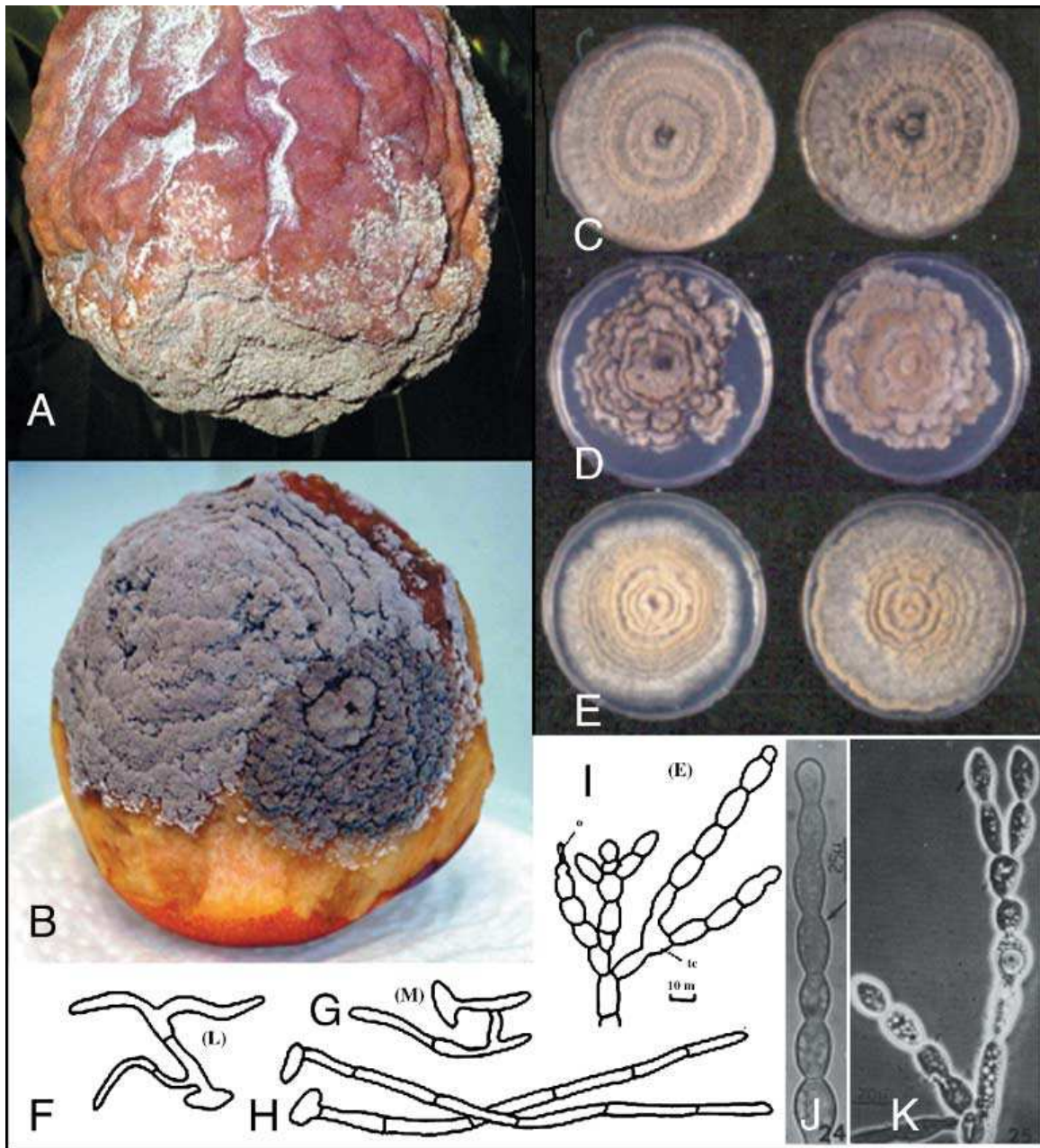
3. Istotne informacje proceduralne

3.1. Do każdego eksperymentu należy włączyć kontrolę negatywną (brak badanego DNA) w celu zbadania kontaminacji oraz kontrolę pozytywną (DNA ze szczepu referencyjnego).

3.2. Zaleca się włączyć do badania kontrolę hamowania ekstrakcji w celu monitorowania ekstrakcji inhibitorów. Może to być wyekstrahowany kwas nukleinowy, o którym wiadomo, że specyficzna sekwencja nie zawiera badanego DNA (np. konserwatywny gen gospodarza lub „uniwersalny” gen ITS). Alternatywnie, kiedy jest dostępna, to użyć syntetyczną kontrolę wewnętrznej amplifikacji.

3.3. Zaleca się, aby do każdej serii badań włączyć kontrolę kontaminacji. Zawiera ona wyekstrahowany kwas nukleinowy z użyciem próbki ślepej, która nie zawiera badanego DNA (np. nieporażony materiał roślinny lub czysty bufor ekstrakcyjny).

3.4. Wartość progowa cyklu (Ct) < 40 z sondą P_fc wskazuje na obecność DNA grzyba *M. fructicola*. A wartość progowa (Ct) < 40 z sondą P2_fgn/lx/ps wskazuje na obecność DNA gatunków *M. fructigena*, *M. laxa* lub *M. polystroma*.



Ryc. 1 Objawy chorobowe powodowane przez *Monilinia fructicola* (A, B), kultury *M. fructicola*, *M. laxa* and *M. fructigena* (C–E), typ kiełkowania konidium trzech gatunków *Monilinia* (F–H), konidia w łańcuszkach (I–K). (A) Sporodochia na naturalnie porażonych i zmumifikowanej brzoskwini (B) Sporodochia na sztucznie zainfekowanej brzoskwini (C) Kultury *M. fructicola* na PDA z koncentrycznymi pierścieniami (D) Kultury *M. laxa* na PDA tworzące płatkowatą rozetę (E) Kultura *M. fructigena* na PDA nie tworząca rozety i w kolorze kremowo-żółtym raczej niż szarawym (F, G) Typowe kiełkowanie konidium *M. laxa*. (H) Typowe kiełkowanie konidium *M. fructigena* i *M. fructicola*. (I, J) Łańcuszki konidiów *M. fructicola*, *M. fructigena* (K) i *M. laxa* (nie pokazano na rycinie) wyglądają dokładnie tak samo. A-B: Dzięki uprzejmości V. Mercier, Avignon (FR). C-E: dzięki uprzejmości G.C.M. van Leeuwen, Wageningen (NL). F-I: Byrde & Willets (1977). J.K: Batra (1991).