

## SPREMLJANJE GLIV IZ RODU *Monilinia* NA CVETOVIH, LISTIH IN PLODOVIH BRESKEV IN MARELIC Z METODO PCR V REALNEM ASU

Alenka MUNDA<sup>1</sup>, Barbara GERI STARE<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

### IZVLE EK

Sadna gniloba je pomembna glivi na bolezen koš i arjev. V naših rastnih razmerah povzro a znatne izgube pridelka tako med obiranjem kot med skladiš enjem in transportom. Nevarnejša je v letih s pogostimi padavinami in zmernimi temperaturami. Bolezen povzro ajo glive iz rodu *Monilinia*, bodisi domorodni vrsti *M. laxa* in *M. fructigena*, bodisi introducirana karantenska vrsta *M. fructicola*. Pogoste so tudi mešane okužbe z vsemi tremi glivami. Pojav in jakost bolezn i sta v veliki meri odvisna od navzo nosti konidijev, ki povzro ijo primarne in sekundarne okužbe. Namen naše raziskave je bilo ugotavljanje konidijev gliv iz rodu *Monilinia* na površju cvetov, listov in plodov izbranih vrst koš i arjev. Tako smo v letu 2012 v enakomernih asovnih intervalih vzor ili cvetove, liste in plodove v štirih proizvodnih nasadih breskev in marelic na Goriškem. Opravili smo osem vzor enj, razporejenih skozi vso rastno dobo. Vzorce smo pripravili s spiranjem trosov gliv s površine nabranih rastlinskih delov in jih nato analizirali z metodo PCR v realnem asu na podlagi TaqMan kemije. Med analiziranimi 102 vzorci nismo zasledili glivo *M. fructicola*, pri 55 vzorcih pa smo potrdili zastopnost drugih vrst iz rodu *Monilinia*.

397

**Klju ne besede:** *Monilinia* spp., PCR v realnem asu, sadna gniloba

### ABSTRACT

#### MONITORING OF *Monilinia* sp. ON FLOWERS, LEAVES AND FRUITS OF PEACH AND APRICOT USING REAL-TIME PCR

Brown rot is an important fungal disease of stone fruits. In our production region it causes substantial pre- and postharvest losses, particularly in the years with frequent precipitations and moderate temperatures. The disease can be induced either by the two indigenous species *M. laxa* and *M. fructigena*, or by the newly introduced quarantine species *M. fructicola*. Frequently all three species act together in mixed infections. The incidence and severity of the disease largely depends on the availability of conidia that induce primary and secondary infections. The aim of our study was to monitor the occurrence of *Monilinia* spp. conidia on flower, leaf and fruit surfaces of selected stone fruit species. In 2012 we collected flowers, leaves and fruits in regular intervals in four commercial peach and apricot orchards in the Goriška region. Eight field surveys were conducted during the entire growing season. Samples were prepared by rinsing fungal spores from the surface of collected plant material and further analyzed using real-time PCR based on TaqMan chemistry. *M. fructicola* has not been detected in any of the 102 samples, while the presence of other *Monilinia* has been detected in 55 samples.

**Key words:** brown rot, *Monilinia* spp., real-time PCR

<sup>1</sup> dr., univ. dipl. inž. agr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup> dr., univ. dipl. biol., prav tam

## 1 UVOD

Sadna gniloba je pomembna glivi na bolezen koš i arjev. V naših rastnih razmerah se pojavlja redno in povzroča izgube pridelka tako med obiranjem kot tudi pozneje, med skladiščenjem in transportom sadja. Nevarnejša je v letih z zmernimi temperaturami in pogostimi padavinami, ki spodbujajo tvorbo trosov in širjenje okužbe. Bolezen povzročajo glive iz rodu *Monilinia*. Rod vključuje številne vrste, ki jih uvrščamo v dve skupini: *Junctoriae* in *Disjunctoriae*. Vse gospodarsko pomembne povzročitelje sadne gnilobe sodijo v skupino *Junctoriae*. Pri nas sta pogosti in razširjeni predvsem domorodni vrsti *M. laxa* in *M. fructigena*. Leta 2009 je bila k nam vnesena tudi *M. fructicola* (Munda, Viršek-Marn, 2010), ki velja za nevarnejšo od domačih vrst in je bila do nedavna uvrščena med karantenske škodljive organizme.

Glive iz rodu *Monilinia* povzročajo dve vrsti poškodb: propadanje cvetov in mladih poganjkov ter gnitje plodov. Pojav in jakost bolezni sta odvisna od trosov oz. inokuluma povzročiteljev bolezni. Odstranjevanje virov okužbe in s tem zmanjšanje inokuluma je tako ključnega pomena pri varstvu pred boleznijo. V odmrlih tkivih, kjer glive prezimijo, se spomladi ob ugodnih vremenskih razmerah oblikujejo trosi, ki predstavljajo primarni inokulum in povzročajo okužbo cvetov in plodov. Kasneje se bolezen širi s sekundarnimi trosi. Poglavitni viri primarnega inokuluma so mumificirani plodovi in veje z razjedami. Viri sekundarnega inokuluma pa so vsa okužena tkiva, na katerih se med letom oblikujejo trosi. Glede na vremenske razmere se razvije različno število generacij sekundarnih trosov. Njihova koncentracija v zraku narašča vse od prvega pojava okužb na plodovih pa do obiranja plodov (Holb, 2008). Primarne in sekundarne okužbe lahko ostanejo prikrite oz. latentne vse dokler vremenske razmere ne postanejo ugodne za širjenje bolezni (Gell *et al.*, 2008).

Namen naše raziskave je bilo spremljanje trosov gliv povzročiteljev sadne gnilobe v nasadih koš i arjev med rastno dobo. Predstavljamo ugotovitve o pojavljanju trosov teh gliv na površini cvetov, listov in plodov pri izbranih sortah breskev in marelic v rastni dobi leta 2012.

## 2 MATERIAL IN METODE

V letu 2012 smo v enakomernih časovnih intervalih vzorili ali na videz zdrave cvetove, liste in plodove v štirih nasadih breskev in marelic na Goriškem. Opravili smo osem vzorjenj, razporejenih skozi vso rastno dobo. Vzorce smo pripravili tako, da smo nabrane rastlinske dele spirali v sterilni destilirani vodi (10 ml) na stresalniku (30 minut, 170 obratov/min). Dobljeno suspenzijo trosov smo zgostili s centrifugiranjem ter odvzeli 100 µl tekočine, iz katere smo izolirali DNA gliv s pomočjo robota MagMax in komercialnega kompleta MagMax 96 Total RNA Isolation Kit (Ambion). Vzorce DNA smo nato analizirali z metodo PCR v realnem času na podlagi TaqMan kemije (Brouwershaven *et al.*, 2010). Metoda je zelo občutljiva in omogoča zanesljivo detekcijo vrste *M. fructicola* ter skupine drugih povzročiteljev sadne gnilobe (*M. fructigena*, *M. laxa* in *Monilia polystroma*). Ob vsakem vzorjenju smo del nabranega rastlinskega materiala (cvetovi, plodi in zreli plodovi) uporabili za ugotavljanje latentne okužbe. Rastlinske dele smo površinsko razkužili in 7 dni inkubirali pri temperaturi 23°C; plodove smo pred tem za 10 ur zamrzili pri temperaturi -14°C (Emery *et al.*, 2000). Na latentno okuženih delih so se po inkubaciji razvili trosonosci in trosi gliv iz rodu *Monilinia*.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Analizirali smo 102 vzorca, ki sta predstavljala mikofloro na površju cvetov, listov in plodov breskev in marelic, vzorjenih od cvetenja pa do zorenja plodov. Glive povzročitelje sadne gnilobe smo ugotovili pri dobri polovici vzorcev (55 vzorcev). Pri marelicah so bili trosi na površju rastlinskih delov izrazitejši v času cvetenja in ob zorenju plodov, pri breskvah pa v

zgodnji fazi zorenja plodov. Del rezultatov o spremljanju trosov pri izbranih sortah marelic in breskev predstavljamo v preglednici 1. Pri analiziranih vzorcih nismo zasledili glive *M. fructicola*, eprav se prou evani nasadi nahajajo na varnostnem obmoju za to glivo. Pokazali pa smo zastopanost drugih gliv rodu *Monilinia* (*M. fructigena*, *M. laxa* in/ali *Monilia polystroma*). Za zdaj vrsta *Monilia polystroma* v Sloveniji še ni bila potrjena in je z uporabljeno metodo tudi ne moremo nedvoumno dolo iti. Razmeroma majhno število pozitivnih vzorcev, pri katerih smo potrdili glive povzro iteljice sadne gnilobe, lahko pripišemo vremenskih razmeram, ki so bile v asu trajanja poskusa neugodne za razvoj sadne gnilobe, kar se je odražalo tudi v razmeroma nizkem odstotku okuženih plodov in visokem deležu latentnih okužb.

Preglednica 1: Trosi gliv iz rodu *Monilinia* v izbranih nasadih marelic in breskev

datum vzor enja	nasad	sadna vrsta in sorta	trosi na <sup>a</sup>		latentna okužba (%) <sup>b</sup>
			cvet- ovih	plod- ovih	
16. 3. 2012	1	marelica, Goldrich	+		0
		marelica, Bora	+		2
27. 3. 2012	2	breskev, Norman	-		0
		breskev, Maria Marta	-		0
	3	breskev, Redhaven	-		0
		breskev, Veteran	-		0
4	breskev, Rubirich	+		0	
	19. 4. 2012	marelica, Goldrich	-	-	0
marelica, Bora		-	+	30	
15. 5. 2012	1	marelica, Goldrich	-	+	NT
		marelica, Bora	+	+	NT
	2	breskev, Norman	+	-	0
		breskev, Maria Marta	+	-	0
		breskev Redhaven	+	-	0
	3	breskev, Veteran	-	-	0
		breskev, Rubirich	-	-	0
	15. 6. 2012	1	marelica, Goldrich	+	-
marelica, Bora			+	+	39
27. 6. 2012	1	marelica, Goldrich	+	+	5
		breskev, Norman	-	-	0
	2	breskev, Maria Marta	+	+	0
		breskev, Redhaven	+	+	0
	3	breskev, Veteran	-	-	NT
		breskev, Rubirich	+	+	22
25. 7. 2012	2	breskev, Norman	+	-	10
		breskev, Maria Marta	-	-	0
	3	breskev, Redhaven	-	-	16
		breskev, Veteran	-	-	0
9. 8. 2012	2	breskev, Maria Marta	+	-	45
		breskev, Veteran	+	-	23

Legenda:

a - trosi vrst iz rodu *Monilinia*, dolo eni z metodo PCR v realnem asu

b – delež okuženih cvetov, plodi ev ali zrelih plodov po površinskem razkuževanju in sedemdnevni inkubaciji v laboratoriju; NT – ni podatka

Dinamika inokuluma gliv iz rodu *Monilinia* je bila predmet številnih raziskav, v katerih so bodisi spremljali koncentracijo trosov v zraku (Corbin *et al.*, 1968; Lou *et al.*, 2007) bodisi ugotavljali trose na površju plodov (Gell *et al.*, 2009; Villarino *et al.*, 2012). Metode, ki so jih pri tem uporabili, ve inoma temeljijo na mikroskopskem pregledu ulovljenih trosov. Ker so si

vrste rodu *Monilinia* zelo podobne, jih po morfoloških značilnostih trosov ne moremo razlikovati. Za nedvoumno identifikacijo vrste moramo uporabiti molekulske tehnike. Konvencionalni PCR, ki se sicer rutinsko uporablja za identifikacijo teh gliv, je za spremljanje inokuluma gliv manj primeren. Zaradi znatno večje občutljivosti je metoda PCR v realnem času (Brouwershaven *et al.*, 2010), ki omogoča kvantifikacijo vrste *M. fructicola*, veliko ustrežnejša za spremljanje nihanja inokuluma med rastno dobo.

Kvantifikacija in spremljanje nihanja inokuluma gliv povzročitelja sadne gnilobe v sadovnjaku sta pomembna parametra pri napovedovanju izbruhov bolezni, določanju rokov škropljenj in oceni jakosti okužbe (Luo *et al.*, 2007). V epidemiološki študiji, ki so jo Gell in sodelavci (2009) opravili v Španskih nasadih breskev, so potrdili pozitivno korelacijo med številom trosov na površini rastlinskih delov in pogostostjo latentnih okužb. Ugotavljajo, da je latentnih okužb več ob vremenskih razmerah, ki za razvoj bolezni niso ugodne. Opozarjajo tudi, da je za učinkovito varstvo pred boleznijo poleg odstranjevanja primarnih virov okužbe potrebno tudi zmanjšanje števila trosov na površini plodov.

#### 4 SKLEPI

Z metodo PCR v realnem času smo analizirali 102 vzorcev in zastopanost gliv povzročitelja sadne gnilobe potrdili pri 55 vzorcih. Vrste *M. fructicola* nismo ugotovili, potrdili pa smo trose drugih povzročiteljev sadne gnilobe. Pojav in jakost sadne gnilobe sta v veliki meri odvisna od trosov, ki povzročijo primarne in sekundarne okužbe. Z raziskavo smo pokazali, da je metoda PCR v realnem času uporabna za ugotavljanje trosov na površju rastlinskih delov, kar je eden od pomembnih parametrov pri napovedovanju pojava bolezni.

#### 5 ZAHVALA

Delo je nastalo v okviru ciljnega raziskovalnega projekta V4-1102 Reševanje problematike ustaljenih karantenskih bolezni sadnih vrst *Prunus spp.* za ohranitev pridelave, ki ga financirata ARRS in Ministrstvo za kmetijstvo in okolje. Za pomoč pri izvedbi se zahvaljujemo dr. Nikiti Fajtu in Sadjarskemu centru Bilje.

#### 6 LITERATURA

- Brouwershaven van, I.R., Bruil M.L., Leeuwen van, G.C.M., Kox, L.F.F., 2010. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops, *Plant Pathology* 59: 548–555.
- Corbin, J. B., Ogawa, J. M., Schultz, H. B., 1968. Fluctuations in numbers of *Monilinia laxa* conidia in an apricot orchard during the 1966 season. *Phytopathology*, 58: 1387–94.
- Emery, K. M., Michailides, T. J., Scherm, H., 2000. Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia, *Plant Disease*, 84: 853-857.
- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J., Melgarejo, P., 2008. Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia* spp. and the incidence of brown rot of peach fruit: factors affecting latent infection. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 487–498.
- Holb, I. J., 2008. Monitoring conidial density of *Monilinia fructigena* in the air in relation to brown rot development in integrated and organic apple orchards. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 397–408.
- Munda, A., Viršek Marn, M., 2010. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* affecting peach orchards in Slovenia. *Plant disease*., 94: 1166.
- Luo, Y., Ma, Z., Reyes, H.C., Morgan, D., Michailides, T.J., 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.
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., Lamarca, N., De Cal A., 2012. Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 585–598.