

ZNOTRAJVRSTNA RAZNOLIKOST FITOPATOGENE GLIVE *Monilinia laxa* IN RAZVOJ SPECIFIČNE DETEKCIJSKE METODE

Tjaša GRIL¹, Franci CELAR², Branka JAVORNIK¹, Jernej JAKŠE¹

¹Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, Ljubljana

²Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, travništvo in pašništvo, Ljubljana

IZVLEČEK

Leta 1997 so v sadovnjaku Resje na Gorenjskem opazili na jablanah nenavadne simptome venenja poganjkov. Izolacija patogena je potrdila kot povzročitelja fitopatogeno glivo *Monilinia laxa*. Poznejše umetne inokulacije so pokazale na možnost obstoja specializirane forme (*Monilinia laxa* f. sp. *mali*). AFLP metoda omogoča iskanje polimorfizmov znotraj ozko sorodnih organizmov. Z omenjeno metodo smo analizirali 67 izolatov glive *M. laxa* iz različnih gostiteljev (15 jablanovih izolatov in 52 izolatov iz koščičarjev) ter z uporabo različnih statističnih orodij poskušali potrditi domneve o obstoju specializirane forme. Na osnovi nukleotidnega zaporedja specifičnih fragmentov, ki se namnožujejo pri jablanovih izolatih smo izdelali hitro in zanesljivo diagnostično metodo za razlikovanje specializirane forme. Specializirana oblika glive ima podobna bolezenska znamenja kot karantenska bakterija *Erwinia amylovora* (hrušev ožig). Tako bi uspešno izdelani markerji služili kot nedvoumen test za razlikovanje glivnih oz. bakterijskih okužb v kratkem časovnem intervalu. V praksi bi se lahko izognili nepotrebnim sankcijam na terenu.

Ključne besede: diagnostika, molekularski markerji, *Monilinia laxa*, forma *specialis*, znotrajvrstna variabilnost

ABSTRACT

INTRASPECIFIC VARIABILITY OF THE PLANT PATHOGENIC FUNGUS *Monilinia laxa* AND THE DEVELOPMENT OF A RELIABLE DIAGNOSTIC METHOD

Unusual symptoms of apple shoots dying were observed in 1997 in Resje, Gorenjska. Artificial inoculation suggested the possible existence of a specialized form (*Monilinia laxa* f. sp. *mali*). AFLP method is often used for detecting polymorphisms among closely related species. We report here on the results of AFLP analysis of 67 fungal isolates from various hosts (15 from apples, 52 from stone fruits). Using various statistical tools, apple isolates were clearly distinguished from others, confirming the possible existence of a specialized form. Selected polymorphic bands, amplified only in apple isolates were sequenced and transformed to SCAR markers with the aim of developing a rapid and unambiguous diagnostic tool for detecting the specialized. Such markers would be advantageous since *M. laxa* f.sp. *mali* causes similar symptoms as the quarantine bacterium *Erwinia amylovora* (fire blight) and the availability of a reliable test for rapidly distinguishing between fungal and bacterial infections would prevent unnecessary measures in orchards.

Key words: diagnostics, molecular markers, *Monilinia laxa*, forma *specialis*, intraspecific variability

1 UVOD

Znotraj relativno velikega rodu fitopatogenih gliv *Monilinia* se zaradi pogostosti pojavljanja in posledično visoke gospodarske škode, ki jo povzročajo izpostavljaajo tri vrste, ki jih poimenujemo glive rjave gnilobe. Ime v grobem opiše tudi najznačilnejše bolezensko znamenje, na okuženem sadnem drevju, gnilobo plodov. To so *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *M. fructigena* Honey in *M. fructicola* (G. Winter) Honey (Byrde in Willetts, 1991). Leta 1997 so v sadovnjakih na Gorenjskem opazili nenavadno venenje in sušenje jablanovih dreves. Povzročitelja so identificirali kot vrsto *M. laxa*. Po umetnem okuževanju naslednje leto so zaradi pojava bolezenskih znamenj le na jablanah, posumili na obstoj specializacije, vezane na gostiteljske rastline patogena (Celar in Valič, 1999). V literaturi se omenja specializirana forma glive, *M. laxa* f.sp. *mali* Harrison{?}, najdene samo na jablani, kjer povzroča sušenje cvetov, odmiranje poganjkov in raka, o čemer poročajo tudi mikologi in fitopatologi iz Rusije in Indije (Byrde in Willetts, 1977; Sharma, 1987).

Vrste rodu *Monilinia* so vrsto let ločevali na podlagi standardnih fitopatoloških metod, vendar se nekateri morfološki kriteriji med seboj prekrivajo, zato niso dovolj zanesljive za rutinsko uporabo. Razvijali so alternativne metode kot so izoencimska analiza in vpliv dolgovalovnega UV sevanja na rast kolonij (Byrde in Willetts, 1977, De Cal in Melgarejo, 1999). Na PCR temelječa diagnostika je služila predvsem za ločevanju vrste *M. fructicola* od drugih dveh vrst oz. vrste *M. laxa* od vrste *M. fructicola* (Ioos in Frey, 2000, Hughes in sod., 2000). Študije genetske variabilnosti znotraj rodu so redko opravljene oziroma jih sploh ni.

V namene molekularne diagnostike služijo metode različnih molekularnih markerjev (Deacon, 2006). Na osnovi objavljenih študij posameznega markerskega sistema smo predvideli, da bi z metodo dolžinskega polimorfizma namnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) dobili natančne odgovore na naša vprašanja. Je robustna in učinkovita metoda pri analizah ozko sorodnih organizmov, aplicirana do sedaj že na vrsti biotičnih sistemov in zagotavlja visoko ponovljivost.

Osnovni namen študije je bil oceniti stopnjo diverzitete znotraj vrste *M. laxa*, raziskati nepojasnjeno znotrajvrstno specializacijo ter razviti diagnostično metodo, s katero bi lahko nedvoumno ločevali patogena glede na gostiteljski izvor.

2 MATERIALI IN METODE

Vključili smo 67 izolatov glive *M. laxa*. Večino, 49 izolatov, smo s sistematičnim vzorčenjem koščičarjev in pečkarjev po sadovnjakih v Sloveniji pridobili spomladi leta 2006. Enajst izolatov smo dobili iz mikološke zbirke Kmetijskega inštituta Slovenije. Sedem jih je bilo iz tujine: štirje izolati neznanega gostitelja iz Japonske in trije iz glivne banke CBS na Nizozemskem. V AFLP analizi je bilo osemnajst češnjevih (*Prunus avium*), sedemnajst mareličnih (*Prunus armeniaca*), petnajst jablanovih (*Malus domestica*), štiri izolate iz japonske češnje (*Prunus serrulata*), trije izolati iz kutine (*Cydonia oblonga*), dva breskova (*Prunus persica*), dva slivova izolata, (*Prunus domestica*), po eden izolat iz divje jablane (*Malus sylvestris*) in japonske marelice (*Prunus mume*) ter štirje izolati neznanega gostitelja. Glivno kulturo smo vzpostavili v aseptičnih razmerah s prenosom konidijev na PDA (Biolife Italiana, Italija) gojišče. Po 14 dnevih smo na osnovi morfoloških karakteristik potrdili zeleno vrsto in po 3 agarne čepke z micelijem v premeru 4 mm prenesli v 150 ml erlenmajerice s tekočim gojiščem iz sladu (Merck KGaA, Nemčija).

Celokupno genomsko DNA smo izolirali s CTAB metodo povzeto po Kump in sod. (1992) z dodatnim večkratnim čiščenjem z organskim topilom. Izoliranim vzorcem smo vrstno pripadnost potrdili še s PCR detekcijo (Hughes in sod., 2000; Ioos in Frey, 2000).

Za AFLP analizo smo uporabili prvotno objavljeni protokol (Vos in sod., 1992) z minimalnimi modifikacijami (Radišek in sod., 2001). Elektroforegrame smo vrednostili s program Allele Locator 1.03 (Amersham Biosciences, ZDA) in izdelali binarno matriko (zastopanosti (1) oz.

nezastopanosti (0)). Monomorfne markerje smo izločili iz nadaljnje obdelave podatkov. Določili smo vse lokuse, ugotovili njihove dolžine ter na osnovi polimorfnih lokusov izračunali odstotek polimorfizma, določili smo tudi število vseh lokusov in število polimorfnih lokusov za posamezen izolat in poiskali specifične DNA fragmente, ekskluzivno jablanove ali zastopane samo pri drugih izolatih. Z računalniškim programom NTSYSpc 2.02 (Rohlf, 1998) smo na osnovi dobljene binarne matrike izračunali Dice-ove koeficiente genetske podobnosti. Za grafično predstavitev združevanja vzorcev smo na osnovi izračunanega koeficienta podobnosti z UPGMA metodo izdelali dendrogram. Zanesljivost izračunane topologije smo preverili z uveljavljeno Felsensteinovo (1985) metodo, s samovzorčenjem (angl. bootstrapping) s TreeCon programom (Van de Peer in De Wachter, 1994). S PCO analizo smo poskušali predstaviti geometrijske razdalje med posameznimi vzorci. Dice-ova matriko podobnosti smo vnesli v programske module NTSYS-pc programa (DCENTER, EIGEN in MXPLOT) ter rezultate predstavili v grafikonu. Za preučevanje populacijske genetske strukture smo uporabili računalniški program STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000). Znana je prekomerna ocenitev števila skupin (K), kar je Evanno s sodelavci (2005) korigiral s predlagano vrednostjo po meri ΔK . Predpogoj za analizo molekularne variance je predpostavljena logična struktura vzorcev, testira se le signifikantnost hipoteze o njenem obstoju (Excoffier in sod., 1992). Analizirane izolate smo razdelili: 1) jablanovi izolati (15 izolatov) in vsi ostali izolati (52 izolatov), 2) jablanovi izolati (15 izolatov) in češnjevi izolati (18 izolatov), 3) jablanovi izolati (15 izolatov) in marelični izolati (18 vzorcev), ter češnjevi in marelični izolati ter izvedli smo štiri neodvisne AMOVA teste, kjer smo preverjali ničelno hipotezo o neobstoju statistično značilne razlike med njimi. Analizo smo opravili s programom Arlequin (Schneider in sod., 2000).

Razvoj diagnostične metode, ki je temeljila na pretvorbi specifičnih AFLP fragmentov v preprostejše, sekvenčno okarakterizirane namnožene regije vključuje ponovno namnoževanje specifičnih fragmentov (ekskluzivnih jablanovih ali fragmentov iz drugih izolatov), detekcijo na poliakrilamidnem gelu z barvanjem s srebrom, kloniranje, določevanje nukleotidnega zaporedja in izdelavo specifičnih parov začetnih oligonukleotidov ter optimizacija pomnoževanja v PCR.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Pri genotipizaciji 67-ih izolatov smo namnožili 1089 ločenih fragmentov. Največje število fragmentov (96) se je namnožilo pri kombinaciji E-GA+M-AT, najmanjše (33) pri E-GT kombinaciji z dvema različnima M-selektivnima začetnima oligonukleotidoma (M-CG, M-GA). V povprečju smo odkrili 54,5 AFLP markerjev na kombinacijo velikostnega razreda od 50 do 745 baznih parov. Detektirali smo 354 (32,5%) polimorfnih fragmentov, v povprečju 17,7 na par začetnih oligonukleotidov, najvišje število polimorfnih fragmentov (29) se je namnožilo pri kombinaciji E-GA+M-AT, najmanj (4) pa pri kombinaciji E-GT+M-CG. Odkrili smo 23 specifičnih AFLP fragmentov velikosti od 62 do 583 bp, ki so se namnožili ekskluzivno pri jablanovih izolatih. Manj, 12, specifičnih AFLP fragmentov velikosti med 55 in 576 bp se je namnožilo pri izolatih iz drugih gostiteljev. Združevanje vzorcev z UPGMA metodo je potrdilo obstoj dveh glavnih skupin izolatov glede na gostiteljski izvor, na jablanove in vse ostale izolate. Znotraj obeh podskupin je sicer opažena variabilnost, vendar nadaljnega združevanja glede na geografski ali gostiteljski izvor nismo opazili.

Izrazito diferenciacijo UPGMA klusterske analize smo potrdili tudi z 2-dimenzionalnim PCO razsevnim grafikonom. Nadaljnega razvrščanja znotraj skupin nismo opazili. Enako je ustrezna korekcija z ΔK statistiko (Evanno, 2005) v programu STRUCTURE analizirane izolate razdelila v dve jasno definirani skupini. Na osnovi rezultatov AMOVA testa smo povzeli, da se jablanovi izolati statistično značilno razlikujejo od izolatov marelic in češenj, medtem ko med slednjima ni razlik. S tem naša domnevanja o obstoju specializirane forme še dodatno potrdimo.

S Primer 3.0 (Rozen in Skaletsky, 2000) programom smo skonstruirali 61 specifičnih parov začetnih oligonukleotidov za SCAR markerje, 33 specifičnih za jablanove izolate in 28 specifičnih za vse ostale izolate. Specifičnost namnoževanja sta ohranila dva jablanovo (#9 in #60) in eden (# 33) par začetnih oligonukleotidov za ostalo skupino izolatov.

4 SKLEPI

V naši raziskavi smo prvič uporabili AFLP metodo na izolatih vrste *M. laxa* iz različnih gostiteljev ter jo tudi optimizirali za omenjeno vrsto. Rezultati apliciranih klusterskih analiz (UPGMA, PCO) potrjujejo obstoj dveh skupin glivnih izolatov znotraj celotne skupine. Manjšo skupino kamor se je nedvoumno in z visoko vrednostjo samovzorčenja razvrstilo 13 od 15 jablanovih izolatov ter večjo skupino, kjer se je razvrstilo vseh ostalih 54 izolatov. Nadaljnje geografsko ali drugo razvrščanje ni bilo opaženo. Z uporabo na Bayesovem algoritmu temelječe računalniške programske opreme Structure lahko le potrdimo dognanja predhodnih klusterskih analiz. AMOVA analiza je potrdila naše predhodne hipoteze o obstoju določene stopnje variabilnosti med izolati glede na izvor različnih gostiteljev.. V našem primeru lahko potrdimo, da smo uspešno izvedli pretvorbo AFLP markerjev v diagnostične SCAR markerje, vendar smo nekoliko izgubili pri specifičnosti namnoževanja, čemur bomo v prihodnjem posvetili več pozornosti, saj so specifičnost ohranili le trije markerji. Razvita diagnostična metoda bo omogočala hitro in nedvoumno potrjevanje dednine jablanovih izolatov ter preprečevala napačne identifikacije in radikalne posege v pridelovanju sadja ob morebitnem ponovnem izbruhu karantenske bakterije *Erwinia amylovora*, ki povzroča hrušev ožig.

5 LITERATURA

- Celar F., Valič N. 1999. Pojav glive *Monilinia laxa* f. sp. *mali* v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 3.-4. marec 1999. Društvo za varstvo rastlin: 485-488
- De Cal A., Melgarejo P. 1999. Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Disease*, 83, 1: 62-65
- Deacon J. 2006. *Fungal Biology*. 4. izdaja. Oxford, Blackwell Publishing: 372 str.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 8: 2611-2620
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 2: 479-491
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 4: 783-791
- Hughes K.J.D., Fulton C.E., McReynolds D., Lane C. R. 2000. Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *EPPO Bulletin*, 30, 3-4: 507-511
- loos 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, 4: 373-378
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani – Kmetijstvo, 59: 63-66
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 2: 945-959
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2001. Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium alboatrum* and *Verticillium dahliae*). Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani – Kmetijstvo, 77, 2: 136-146
- Rohlf F.J. 1998. NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.02. Exeter software, New York, Setauket, 2 disketi.

- Rozen S., Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. V: Krawetz S., Misener S. (ur.) Bioinformatics methods and protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa, Humana Press: 365-386
- Sharma R.L., Kaul J.L. 1987. Blossom blight and fruit rot of apple. Indian Journal of Plant Pathology, 19, 2: 208-211
- Van de Peer Y., De Wachter Y. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Computer Applications in the Biosciences, 10, 5: 569-570
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23, 21: 4407-4414