

Morfološke, serološke i molekularne analize prouzrokovača antraknoze ploda banane

Nataša Duduk¹, Mirko Ivanović¹ i Bojan Duduk²

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija
(natasadukic@yahoo.com)

²Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Banatska 31b, 11080 Beograd, Srbija

Primljen: 7. decembra 2009.

Prihvaćen: 14. decembra 2009.

REZIME

Na banani se javljaju dve vrste iz roda *Colletotrichum*, *C. musae* i *C. gloeosporioides*. Cilj ovog rada bio je ispitivanje etiologije antraknoznog propadanja plodova banane koje se u našoj zemlji nalaze u prometu. Iz obolelog ploda banane dobijen je izolat koji na PDA podlozi formira koloniju bele boje sa intenzivnim uniformnim rastom. Na osnovu dobijenih morfoloških osobina izolovane gljive nije se mogla definitivno uraditi identifikacija. Pozitivna serološka reakcija u ELISA testu sa monoklonalnim antitelima za *C. acutatum* govori o postojanju antigenog mesta za korišćena monoklonalna antitela. Pozitivna reakcija korišćenjem prajmera specifičnih za *C. gloeosporioides* ukazuje na sličnost u sekvenci ITS regiona ove gljive i ispitivanog izolata iz banane. Mada u literaturi nije zabeleženo da se korišćenjem CgInt prajmera specifičnog za *C. gloeosporioides* može amplifikovati i njemu filogenetski bliska *C. musae*, ovi rezultati ne isključuju mogućnost da je izolat iz banane *C. musae*. Biljka domaćin, zabeleženi simptomi i osobine kolonije izolata iz banane najviše odgovaraju *C. musae*. Na osnovu dobijenih rezultata morfoloških, antigenih i genetskih osobina izolat iz banane označen je kao *Colletotrichum* sp., a za tačnu identifikaciju prouzrokovača antraknoze ploda banane do nivoa vrste neophodno je sprovesti dalje analize.

Ključne reči: Banana; antraknoza; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Colletotrichum musae*; identifikacija

UVOD

Gljive roda *Colletotrichum* i njihovi teleomorfni stadijumi *Glomerella* spp. predstavljaju značajne biljne patogene širom sveta. Vrste roda *Colletotrichum* su prouzrokovajući karakterističnog oboljenja poznatog kao antraknoza, koje se odlikuje udubljenim nekrotičnim pe-

gama koje se šire i u okviru kojih patogen sporuliše. Antraknožno oboljenje se može ispoljavati u dva različita oblika: oboljenje koje se javlja u polju na plodovima u razvoju i oboljenje koje se javlja na zrelim plodovima posle berbe u skladištima (Freeman i sar., 1998). Ove gljive izazivaju značajne ekonomske štete u tropskim, suptropskim i toplijim regionima, ali su takođe i

prouzrokovajući značajnih bolesti biljaka u našoj zemlji, kako u polju, tako i u skladištu (Freeman i sar., 1998; Ivanović i sar., 2005, 2006).

Mada veliki broj gajenih vrsta može biti zaražen gljivama roda *Colletotrichum*, najveće ekonomske štete nastaju pri pojavi oboljenja posle berbe (postharvest). Mnoge vrste izazivaju latentne zaraze na svojim domaćinima. Sazrevanjem plodova patogen prelazi iz latentne faze u fazu nekrotrofa pri čemu dolazi do ispoljavanja tipičnih simptoma oboljenja. Pored ekonomskih šteta koje patogeni izazivaju u uslovima skladištenja, zaraženi plodovi predstavljaju jedan od značajnih puteva introdukcije patogena u različite delove sveta.

Na banani se javljaju dve vrste iz roda *Colletotrichum*, *C. musae* i *C. gloeosporioides* (Agrios, 2005). *C. musae* je patogen banane (Lim i sar., 2002; Photita i sar., 2005), dok je *C. gloeosporioides* važan polifagni patogen u našoj zemlji (Ivanović i Ivanović, 2001). Cilj ovog rada bio je ispitivanje etiologije antraknozno propadanja plodova banane koji se u našoj zemlji nalaze u prometu i moguće introdukcije novih patogena ili novih sojeva patogena u našu zemlju.

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena

Patogen je izolovan iz ploda banane sa simptomima antraknoze pronađene u prometu na tržištu. Izolacija patogena urađena je po standardnom postupku. Fragmenti tkiva, uzeti sa prelaza zaraženog i zdravog dela ploda, površinski su sterilisani 2% rastvorom natrijum-hipohlorita (NaOCl) u trajanju od dva minuta, zatim su dva puta isprani u sterilnoj destilovanoj vodi, a višak tečnosti je odstranjen sterilnim filterpapirom. Fragmenti su postavljeni na sterilnu krompir-dekstroznu podlogu (PDA) i inkubirani sedam dana na 25°C.

Provera patogenosti i reizolacija

Provera patogenosti dobijenih izolata urađena je nanošenjem fragmenta micelije, razvijene na PDA podlozi, na prethodno površinski sterilizovane i povredne zdrave plodove banane i jabuke. Inokulisani plodovi su inkubirani u vlažnim uslovima na 25°C, a pojava simptoma praćena je svakodnevno. Sa veštački inokulisanih plodova urađena je reizolacija patogena na PDA podlogu.

Makroskopske i mikroskopske osobine

U kulturama gajenim na PDA podlozi proučene su makroskopske osobine, izgled kolonije i način porasta na PDA. Mikroskopske osobine izolata određene su posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom.

Serološka analiza

Za serološko dokazivanje prouzrokovачa oboljenja korišćen je ELISA dijagnostički kit za detekciju konidija *C. acutatum* (Adgen Neogen Europe Ltd, Scotland, UK). Iz kulture gljive, na mestima gde je uočena sporulacija, sterilnim skalpelom sastrugana je micelija sa površine od 0,5 cm² i prebačena u sterilne mikrotube sa 1 ml sterilne destilovane vode. Dobijena suspenzija spora korišćena je za testiranje. Za detekciju su korišćena monoklonalna antitela i konjugovana antitela primenom PTA-ELISA testa po protokolu proizvođača. Po dodavanju supstrata p-nitrofenilfosfata (1 mg/ml), reakcija je očitavana nakon jednog sata merenjem apsorpcije na 405 nm. Pozitivnim su smatrani uzorci u kojima su srednje vrednosti apsorpcije dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativnih kontrola.

Molekularna analiza

Ekstrakcija nukleinskih kiselina iz dobijene kulture urađena je po postupku koji su opisali Day i Shattock (1997). Za molekularnu analizu korišćena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR). Za detekciju su korišćeni CaInt2 i CgInt prajmeri koji omogućavaju detekciju *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* u odvojenim reakcijama u kombinaciji sa univerzalnim prajmerom ITS4. Svaka reakciona PCR smeša, ukupne zapremine 25 µl, sadržala je 1 x PCR master mix (Fermentas, Litvanija) (0,625 U Taq polimeraze, 2 mM MgCl₂, po 0,2 mM svakog dNTP), po 1 µl svakog prajmera (20 mM) i po 1 µl ekstrahovane DNA. Kao negativna kontrola je korišćena reakciona PCR smeša bez dodatne DNA. Uslovi izvođenja PCR metode bili su sledeći: početna denaturacija 2 minuta na temperaturi od 94°C, 30 ciklusa, 30 sekundi na temperaturi od 94°C; 30 sekundi na temperaturi od 55°C; 30 sekundi na temperaturi od 72°C; finalno izduživanje 10 minuta na temperaturi od 72°C. Vizuelizacija PCR produkata urađena je u 1,5% agaroznom gelu koji je obojen etidiumbromidom i posmatran pod UV iluminatorom. Pojava ampikona očekivanih veličina oko 490 bp sa prajmerima CaInt2 i ITS4 smatrana je pozitivnom detekcijom za

C. acutatum i oko 450 bp sa prajmerima CgInt i ITS4 pozitivnom reakcijom za *C. gloeosporioides*.

Referentni i ostali izolati

U analizama su korišćeni izolati *C. gloeosporioides*: AVO 37 4B (avokado, Izrael), CG14 i CG15 (*Annona muricata*, Kolumbija) i CG1 (jabuka, Republika Srpska) i izolati *C. acutatum*: TUT 137 A (jagoda, Izrael), CA13 (*Annona muricata*, Kolumbija), GG-JUP, CA4, CA5, CA6, CA7, CA8 i CA9 (jagoda, Srbija).

REZULTATI

Simptomi na plodu banane

Na banani je uočena pojava nekroze kore koja se širila uzdužno na plodu. Nekrotirano tkivo je pucalo, a nekroza je zahvatala i unutrašnjost ploda. U okviru nekrotičnih zona uočena je pojava beličaste micelije, kao i sporulacije u vidu sitnih narandžastih kapljica (Slika 1). Zaraženo tkivo je bilo razmekšano.

Patogenost izolata

Na inokulisanom plodu banane, nakon inkubacije od sedam dana, uočena je pojava simptoma truleži koji su odgovarali simptomima primarne zaraze, dok na plodu jabuke nije bilo simptoma.

Makroskopske i mikroskopske osobine

Na PDA podlozi izolat gljive iz banane imao je koloniju bele boje sa intenzivnim uniformnim rastom, koja je ispunjavala petri-kutiju za 5-6 dana pri temperaturi od 25°C. Svetlo narandžasta masa spora se formira po celoj površini kolonije (Slika 2). Konidije pato-



Slika 1. Simptomi na plodu banane

gena su hijalinske, jednoćelijske, cilindričnog ili elipsoidnog oblika, dužine 12,3-17,2(-22) μm i širine 4,9-6,1 μm sa jasno izraženim uljanim kapljicama u sredini (Slika 3).

Antigene osobine konidija

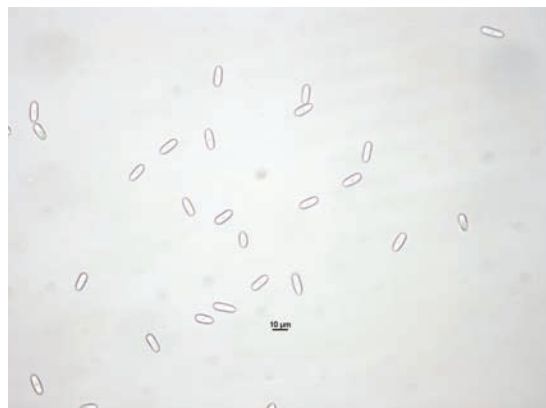
Primenom antiseruma i konjugata specifičnih za detekciju konidija *C. acutatum* pozitivne serološke reakcije detektovane su kod ispitivanog izolata iz banane, kao i kod pozitivnih kontrola za *C. acutatum*. Do serološke reakcije nije došlo sa negativnom kontrolom, kao ni sa testiranim izolatima *C. gloeosporioides*.

Molekularna detekcija

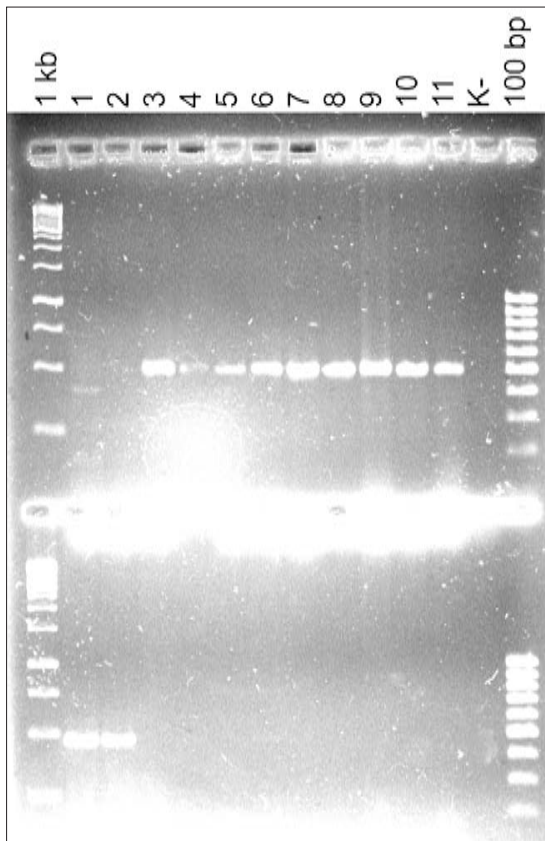
Primenom prajmera CgInt i ITS4, PCR produkti očekivane veličina oko 450 bp detektovani su u ispitivanom izolatu iz banane, kao i kod svih testiranih izolata *C. gloeosporioides*. Kod negativne kontrole i testiranih izolata *C. acutatum* nije došlo do pojave amplicona



Slika 2. Kolonija izolata iz banane na PDA podlozi



Slika 3. Konidije izolata iz banane



Slika 4. Vizualizacija amplikona dobijenih korišćenjem a) CaInt2/ITS4 i b) CgInt/ITS4 prajmera u 1,5% agaroznom gelu. 1 kb-marker sa veličinama fragmenata u bp od gornjeg ka donjem: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 i 250; 1 - referentni izolat *C. gloeosporioides* (AVO 37 4B), 2 - izolat sa banane, 3-11 - izolati *C. acutatum* (TUT 137 A, CA13, GG-JUP, CA4, CA5, CA6, CA7, CA8 i CA9), K - negativna kontrola (voda); 100 bp - marker sa veličinama fragmenata u bp od gornjeg ka donjem: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 i 200

PCR testom. Primenom prajmera CaInt2 i ITS4, PCR produkti veličine 490 bp detektovani su samo kod izolata *C. acutatum*, ali ne i kod negativne kontrole i kod izolata *C. gloeosporioides*. Rezultati PCR testa odabranih izolata prikazani su na slici 4.

DISKUSIJA

Antraknozna oboljenja su široko zastupljena na voću svuda u svetu (Freeman i sar., 1998). Kao prouzrokovaci antraknoze na voćkama u našoj zemlji utvrđene su *C. gloeosporioides* na višnji, trešnji, jabuci (Ivanović i

Ivanović, 2001), na jagodi *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (Ivanović i sar., 2005) i krušci *Colletotrichum* sp. (Živković i sar., 2008). Takođe, *C. gloeosporioides* je i značajan patogen kantariona u polju (Ivanović i sar., 2006). Iako se banane ne gaje u našoj zemlji, često se u prometu mogu naći plodovi banane sa simptomima nekrotičnog propadanja, koje može biti prouzrokovano gljivama *C. musae* i *C. gloeosporioides* (Agrios, 2005). Istraživanja u okviru ovog rada imala su za cilj utvrđivanje etiologije ovog propadanja i moguće introdukcije novih patogena ili novih sojeva patogena u našu zemlju. Etiološka ispitivanja obuhvatila su simptomatologiju, izolaciju, proveru patogenosti i ispitivanje makroskopskih, mikroskopskih, antigenih i osobina genoma patogena.

Pojava udubljenih nekrotičnih pega na plodu banane koje se šire i u okviru kojih je zabeležena sporulacija patogena u vidu svetlo narandžastih kapljica su simptomi koji odgovaraju antraknoznom oboljenju (Freeman i sar., 1998; Peres i sar., 2002). Ispitivanjima makroskopskih osobina dobijenog izolata iz banane uočena je kolonija bele boje i intenzivnog porasta. U okviru kolonije zabeležena je jaka sporulacija. Konidije patogena su bile cilindrične ili elipsoidne, veličine 12,3-17,2(-22) x 4,9-6,1 μm . Proverom patogenosti potvrđeno je da je dobijeni izolat patogen za bananu, a nije za jabuku.

C. acutatum formira konidije, koje su po obliku fuziformne ili elipsoidne. Na jednom ili na oba kraja su zašiljene, ali mogu biti i zaobljene na oba kraja. Konidije su dužine 8-16(-20) μm i širine 2,5-5,3 μm (Smith i Black, 1990; Gunnell i Gubler, 1992; OEPP/EPPO, 2004). *C. gloeosporioides* formira cilindrične konidije. Najčešće zaobljene na oba kraja. Konidije su dužine 9,6-21 μm i širine 3,4-5,4(-8,2) μm (Smith i Black, 1990; Gunnell i Gubler, 1992; Peres i sar., 2002). *C. musae* formira elipsoidne ili cilindrične konidije. Konidije su dužine 10-20 μm i širine 3-10 μm (Sutton i Waterson, 1970; Lim i sar., 2002; Photita i sar., 2004).

Po nekim literaturnim podacima *C. musae* je patogen za jabuku (Lim i sar., 2002), dok po drugim autorima jabuka ne spada u krug domaćina *C. musae* (Sutton i Waterson, 1970).

Zabeležene osobine kolonije izolata iz banane, kolonija bele boje i posebno značajno brži porast u odnosu na sve druge izolate *C. gloeosporioides* i *C. acutatum*, su poređenjem sa literaturnim podacima najviše odgovarale opisima kolonije *C. musae* (Peres i sar., 2002; Photita i sar., 2005), dok se na osnovu veličine i oblika konidija nije moglo sa sigurnošću utvrditi o kojoj se vrsti radi. Na osnovu morfoloških osobina izolovane gljive nije se mogla definitivno uraditi identifikacija.

Za specifičnu detekciju *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* razvijene su serološke i molekularne metode, jer su ove dve gljive morfološki veoma slične i zbog preklapanja njihovih prirodnih domaćina i izrazite varijabilnosti izolata u kulturi, teško ih je razdvojiti primenom standardnih metoda (Wharton i Diegues-Uribeondo, 2004).

Primenom prajmera CaInt2/ITS4 specifičnih za detekciju *C. acutatum* pozitivna reakcija dobijena je samo kod testiranih izolata *C. acutatum*, ali ne i kod izolata *C. gloeosporioides* i izolata iz banane. Primenom prajmera CgInt/ITS4 specifičnih za *C. gloeosporioides*, pozitivna reakcija utvrđena je kod izolata *C. gloeosporioides* i izolata iz banane. Ovi prajmeri široko su korišćeni za identifikaciju *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* i smatraju se specifičnim za vrste (Sreenivasaprasad i sar., 1996; Freeman i sar., 2002; Talhinhos i sar., 2002; Ivanović i sar., 2007).

Za detekciju *C. acutatum*, koji je i karantinski patogen za jagodu u našoj zemlji (A2 karantinska lista), koriste se i serološke metode zasnovane na antigenim osobinama konidija patogena (OEPPO/EPPO, 2004). Primenom monoklonalnih antitela specifičnih za detekciju konidija *C. acutatum* pozitivne serološke reakcije detektovane su kod izolata *C. acutatum*, ali i izolata iz banane.

Klasične metode identifikacije patogena zasnovane na morfološkim osobinama, izgledu kolonije i obliku konidija, nisu uvek sigurne, posebno kod patogena koji izazivaju isti tip oboljenja i koji su srodni. Zbog toga se uvođenje molekularnih metoda, zasnovanih na korišćenju specifičnih regiona patogena, sve češće koristi sa ciljem brze, pravilne i tačne identifikacije patogena.

Iako morfološke osobine izolata iz banane ne odgovaraju *C. acutatum* i nije došlo do amplifikacije korišćenjem prajmera specifičnog za *C. acutatum*, pozitivna serološka reakcija govori o postojanju antigenog mesta za korišćena monoklonalna antitela za *C. acutatum*. Razlog može biti heterologa reakcija korišćenog antiseruma ili varijabilnost izolata roda *Colletotrichum* prouzrokovana antraknoze banane.

Positivna reakcija korišćenjem prajmera specifičnih za *C. gloeosporioides* ukazuje na sličnost u sekvenci ITS regiona ove gljive i ispitivanog izolata iz banane. Mada u literaturi nije zabeleženo da se korišćenjem CgInt prajmera specifičnog za *C. gloeosporioides* može amplifikovati i *C. musae*, ovi rezultati ne isključuju mogućnost da je izolat iz banane *C. musae*, jer je filogenetskom analizom ITS regiona utvrđeno da su ove dve gljive veoma bliske (Photita i sar., 2005). Poznato je da ITS region

nema dovoljno informativnih mesta za razlikovanje bliskih vrsta (Photita i sar., 2005), a PCR primenom jednog specifičnog prajmera (CgInt) i jednog univerzalnog zasniva se na analizi 17 bp ITS regiona. Stoga, nije isključeno da je primenom specifičnih prajmera (CgInt i CaInt2 u paru sa ITS4) moguće razlikovati *C. gloeosporioides* od *C. acutatum*, ali ne i od njemu bliskog *C. musae*.

Biljka domaćin, zabeleženi simptomi i osobine kolonije izolata iz banane najviše odgovaraju *C. musae*. Na osnovu dobijenih rezultata morfoloških, antigenih i genetskih osobina, izolat iz banana označen je kao *Colletotrichum* sp., a za tačnu identifikaciju prouzrokovana antraknoze ploda banane do nivoa vrste neophodno je sprovesti dalje analize.

LITERATURA

Agrios, G.N.: Plant Pathology. Academic press, San Diego, USA, 2005.

Day, J.P. and Shattock, R.C.: Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. European Journal of Plant Pathology, 103: 379-391, 1997.

Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E.: Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Disease, 82: 596-605, 1998.

Freeman, S., Shalev, Z. and Katan, J.: Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic in strawberry. Plant Disease, 86: 965-970, 2002.

Gunnel, P.S. and Gubler, W.D.: Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Mycologia, 84(2): 157-165, 1992.

Ivanović, M., Duduk, B. i Nastovski, N.: Bolesti kantariona i njihovo suzbijanje. U: Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) i druge vrste roda *Hypericum* (Radanović D., Nastovski T., Menković N., priredivači), Institut za proučavanje lekovitog bilja „Josif Pančić“, Beograd, 2006, str. 91-102.

Ivanović, M. i Ivanović, D.: Mikoze i pseudomikoze biljaka. De-eM-Ve, Beograd, 2001.

Ivanović, M., Ivanović, M., Duduk, B., Trkulja, V. i Stojanović, G.: Antraknoza – nova bolest jagode u Srbiji. Zbornik rezimea VII savetovanja o zaštiti bilja, Soko Banja, 2005, str. 119-120.

Lim, J., Lim, T.H. and Cha, B.: Isolation and identification of *Colletotrichum musae* from imported bananas. The Plant Pathology Journal, 18(3): 161-164, 2002.

OEEP/EPPO: Diagnostic protocols for regulated pests PM7/25. *Glomerella acutata*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34: 193-199, 2004.

Peres, N.A.A., Kuramae, E.E., Dias, M.S.C. and de Souza, N.L.: Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. Journal of Phytopathology, 150: 128-134, 2002.

Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde K.D.: Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? Fungal Diversity, 16: 131-140, 2005.

Smith, B.J. and Black, L.L.: Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease, 74: 69-76, 1990.

Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E. and Mills, P.R.: PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology, 45: 650-655, 1996.

Sutton, B.C. and Waterson, J.M.: *Colletotrichum musae*. C.M.I. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1970, No. 222.

Talhinbas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. and Oliveira, H.: Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. Phytopathology, 92: 986-996, 2002.

Wharton, P.S. and Diegues-Uribeondo, J.: The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardin Botanico da Madrid, 61(1): 3-22, 2004.

Živković, S., Stojanović, S., Gavrilović, V., Ivanović, Ž. i Balaž, J.: Antraknoza ploda kruške. Knjiga abstrakata XIII kongresa voćara i vinogradara Srbije, Novi Sad, 2008, str.148.

Morphological, Serological and Molecular Analyses of Anthracnose-Causing Agent on Banana Fruit

SUMMARY

Two species of the genus *Colletotrichum*, *C. musae* and *C. gloeosporoides*, occur as infecting species of banana. The study focused on examining the etiology of anthracnose on banana fruits sold on the domestic market. An isolate was obtained from a diseased banana fruit on PDA medium, forming a white colony with intensive and uniformed growth. It was not possible to identify the isolated fungus based on its morphological characteristics. Positive serological reaction in an ELISA test with monoclonal antibodies for *C. acutatum* indicated an antigen site for the used monoclonal antibodies. Positive reaction when *C. gloeosporioides*-specific primers were applied indicated a similarity in the ITS sequence of the fungus and the examined isolate from banana fruit. Although there are no available data in literature that *C. gloeosporioides*-specific CgInt primer can be used for amplification of the phylogenetically related *C. musae*, our results do not exclude that the isolate could be *C. musae*. The host plant, symptoms observed and colony characteristics of the fungus isolated from the banana fruit mostly correspond to *C. musae*. Based on morphological, antigen and genetic characteristics, the isolate from banana was determined as *Colletotrichum* sp., while species identification of the anthracnose-causing agent on banana requires additional analysis.

Keywords: Banana; Anthracnose; *Colletotrichum gloeosporoides*; *Colletotrichum musae*; Identification