

Zaštita bilja
Vol. 65 (3), N°289, 105-110, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (3), N°289, 105-110, 2014, Belgrade

UDK: 631.563:635.25
632.482.123.1
Naučni rad
Scientific paper

PENICILLIUM POLONICUM - PROUZROKOVAČ PROPADANJA LUKOVICA CRNOG LUKA U SKLADIŠTU

MARINA LAZAREVIĆ¹, NATAŠA DUDUK², MILJAN VASIĆ², IVANA VICO²

¹PSS Institut Tamiš d.o.o., Pančevo

²Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd

e-mail: natasadukic@yahoo.com

REZIME

Penicillium polonicum je ekonomski važna gljiva sa širokim krugom domaćina, uključujući žitarice, kikiriki, lukove, sušeno meso, citrusne, jabuke i krtole jama. U januaru 2013. godine, u skladištu na teritoriji Stare Pazove prikupljeni su uzorci lukovica crnog luka cv. Meranto sa karakterističnim simptomima plave truleži. Iz obolelih lukovica dobijeni su izolati gljive čija je patogenost potvrđena inokulacijom zdravih lukovica. Na diferencijalnim podlogama izolati su formirali dobro razvijene, guste kolonije, plavozelene boje sa belim obodom, karakterističnog mirisa. Izolati nisu rasli na 37°C, dok je porast zabeležen na 5°C. Utvrđeno je da su izolati stvarali ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne. Konidiofore izolata su bile terverticilate, stipe septirane, tankih i glatkih zidova, a fjalide cilindrične. Konidije su bile loptaste do elipsoidne, glatke i formirale su se u dugim lancima. Sekvence dobijenih amplicona veličine oko 800 bp dela gena za β-tubulin su u MegaBLAST analizi pokazali najvišu sličnost od 99% sa sekvencama istog regiona vrste *P. polonicum*. Na osnovu morfoloških i molekularnih osobina kao prouzrokovalac propadanja lukovica crnog luka u skladištu identifikovana je gljiva *P. polonicum*.

Ključne reči: plava trulež, *Allium cepa*, identifikacija

UVOD

Crni luk (*Allium cepa* L.) je dvogodišnja biljka iz familije *Alliaceae*, koja je zahvaljujući svojim povoljnim osobinama odavno našla mesto u ljudskoj ishrani (Miladinović i sar., 1997; Đević i sar., 2004). Prema svetskoj godišnjoj proizvodnji od 47 miliona tona, proizvodnja crnog luka je na trećem mestu, odmah iza paradajza i kupusa (Đević i sar., 2004). U našoj zemlji je proizvodnja crnog luka široko rasprostranjena i glavni proizvodni centri su severni Banat i Bačka, Podrinje, okolina Prizrena, Pirota i Beograda (Miladinović i sar., 1997).

Kao najčešći prouzrokovalci propadanja i truljenja lukovica u skladištu, navode se sledeće vrste fitopatogenih gljiva: *Aspergillus niger*, *A. alliaceus*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Botrytis allii*, *B. cinerea*, *Rhizopus microsporus*, *R. stolonifer*, *Colletotrichum circinans*, *C. dematium* f. sp. *circinans* i *Penicillium* spp. (Schwartz and Mohan, 2008; Pitt and Hocking, 2009). Više vrsta iz roda

Penicillium mogu prouzrokovati plavu trulež ili plesnivost crnog luka, uključujući *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. hirsutum*, *P. funiculosum* i *P. oxalicum* (Schwartz and Mohan, 2008).

Penicillium polonicum K. Zaleski je ekonomski važna aerobna gljiva sa širokim krugom domaćina, uključujući žitarice, kikiriki, lukove, sušeno meso, citrusne, jabuke i krtole jama (Frisvad and Samson, 2004; Andersen and Thrane, 2006; Kim et al., 2008). Ova vrsta stvara sekundarne metabolite, među kojima su štetni mikotoksini: penicilinska kiselina, verukozidin i nefrotoksični glikopeptidi (Frisvad and Samson, 2004).

S obzirom da su u Srbiji, zabeležene lukovice sa simptomima plave truleži, koje su izazvale ekonomske gubitke (Duduk et al., 2014), cilj ovog rada bio je identifikacija uzročnika propadanja luka u skladištu na osnovu morfoloških i molekularnih osobina u cilju potvrde njegovog prisustva u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje i izolacija

U januaru 2013. godine, lukovice crnog luka (cv. Meranto) sa simptomima truleži prikupljene su iz skladišta u Staroj Pazovi. Izolacija je urađena prenošenjem isečaka tkiva iz unutrašnjosti trulih lukovica ili direktnim nanošenjem spora u Petri kutuje sa krompir dekstroznim agarom (KDA). Nakon 7 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, razvijene kolonije su presejane u čiste kulture iz kojih su metodom iscrpljivanja dobijene monosporijalne kulture.

Provera patogenosti

Patogenost dobijenih izolata proverena je veštačkom inokulacijom po deset zdravih lukovica crnog luka sorte Meranto. Lukovice su oprane deterdžentom, isprane sterilnom vodom i zatim površinski sterilisane alkoholom. Pripremljene lukovice su postavljene u sterilisane posude u kojima je bio navlaženi filter papir. Na lukovicama su napravljene povrede (5x10 mm) u koje je uneto po 50 μ l suspenzije konidija, koncentracije 10^5 konidija/ml, dobijenih iz 10 dana starih kultura odgajanih na KDA. U povrede na kontrolnim lukovicama unešeno je 50 μ l sterilne destilovane vode. Inokulisane i kontrolne lukovice su inkubirane pri visokoj relativnoj vlažnosti i temperaturi od 22°C. Iz simptomatičnih lukovica reizolovana je gljiva radi potvrđivanja Kohovih postulata.

Morfološke karakteristike

Kod odabranih izolata iz lukovica crnog luka (L1a i L4p) ispitivane su makroskopske i mikroskopske morfološke odlike. Makroskopske odlike kolonije su praćene na KDA podlozi i na tri diferencijalne podloge: Čapekov agar sa kvaščevim ekstraktom (CYA), sladni agar (MEA) i kvaščev agar sa saharozom (YES). Podloge su zasejavane suspenzijom spora iz 10 dana starih kultura. Suspenzija spora je dobijena nalivanjem kultura sterilnom vodom u koju je dodat Tween 20 (Sigma) do koncentracije 0,01%. Po 5 μ l suspenzije konidija je naneto na tri mesta na podlozi. Inokulisane podloge su inkubirane 7 dana na 25°C. Na CYA podlozi porast i izgled kolonija praćen je i na temperaturama 5°C i 37°C. Eksperiment je izveden u 3 ponavljanja za svaku podlogu i temperaturu.

Mikroskopske odlike (izgled penicilla, stipa i fialida, oblik, veličina i način formiranja konidija) su posmatrane u kulturama starim 10 dana odgajenim na KDA podlozi. Mikroskopski preparati pravljeni su po metodi Pitt and Hocking (2009) i posmatrani

pod svetlosnim mikroskopom (Leica DMLS). Mereno je po 50 konidija po izolatu.

Ehrlich-ov test

Ehrlich-ovim testom, korišćenjem filter papir metode (Lund, 1995) ispitivana je proizvodnja ciklopiazonske kiseline i drugih alkaloida dobijenih izolata. Iz izolata gajenih 7 dana na CYA podlozi isečeni su fragmenti kolonije prečnika 10 mm na koje je postavljen filter papir natopljen Ehrlich-ovim reagensom (2g 4-dimetil aminobenzaldehid + 85 ml 96% etanola + 15ml 10 NHCl). Nakon 2 minuta praćena je promena boje na filter papiru.

DNA ekstrakcija, amplifikacija gena za β -tubulin i sekvenciranje

Ekstrakcija nukleinskih kiselina dobijenih izolata urađena je po CTAB metodi koju su opisali Day and Shattock (1997) iz kultura starih 10 dana, odgajenih na KDA podlozi. Molekularna identifikacija je izvršena na osnovu gena za β -tubulin, korišćenjem prajmera Bt-LEV-Up4 i Bt-LEV-Lo1 (De Jong et al., 2001) metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). Uslovi izvođenja PCR metode obuhvatili su početnu denaturaciju na 94°C 3 min, 30 ciklusa (94°C 60 s, 60°C 60 s, 72°C 60 s) i završno izduživanje na 72°C 10 min.

Po 5 μ l amplifikovanog produkta ispitivanih izolata i kontrole vizuelizovano je u 1,5% agaroznom gelu. Korišćen je GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Gel je obojen vodenim rastvorom etidijumbromida (0,5 μ g/ml) i posmatran na transiluminatoru. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 800 bp.

Dobijeni Bt-LEV-Up4/Bt-LEV-Lo1 amplikoni su direktno sekvencirani u oba smera pomoću prajmera korišćenih u amplifikaciji. Sekvence su spojene korišćenjem kompjuterskog programa Pregap4 u okviru Staden paketa (Staden et al., 2000). Nukleotidne sekvence dela gena za β -tubulin su deponovane u GenBank bazu podataka. Poređenje sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama u NCBI bazi podataka urađena je korišćenjem MegaBlast algoritma.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Na prikupljenim lukovicama crnog luka sorte Meranto su se ispoljavali simptomi truleži. Tkivo je bilo mekano, svetlo smeđe do sive boje. Prisustvo sporulacije plavozelene boje uočavalo se na površini zaraženih lukovica, posebno u predelu stabla, kao i u unutrašnjosti lukovica, između razmekšalih listova (Slika 1).



Slika 1. Plavozelena trulež lukovica crnog luka cv. Meranto.

Figure 1. Onion bulb cv. Meranto with blue mold symptoms.

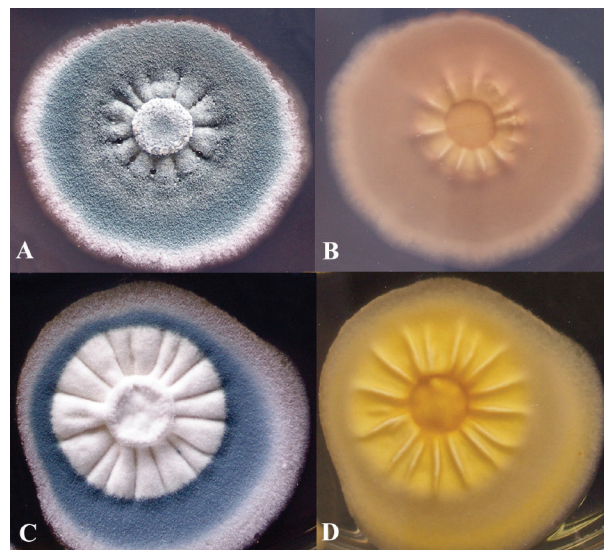


Slika 2. Plavozelena trulež na veštački inokulisanim lukovicama crnog luka cv. Meranto.

Figure 2. Blue mold on artificially inoculated onion bulbs cv. Meranto.

Provera patogenosti

Na inokulisanim lukovicama, nakon 30 dana inkubacije, razvili su se tipični simptomi plave truleži, dok su kontrolne lukovice ostale bez simptoma. Oko mesta inokulacije uočena je sporulacija gljive karakteri-



Slika 3. Makroskopske osobine izolata na CYA (A lice, B naličje kolonije) i YES podlozi (C lice, D naličje kolonije) posle 7 dana inkubacije na 25°C.

Figure 3. Colony morphology on CYA (A front, B reverse) and YES (C front, D reverse) medium after 7 day of incubation at 25°C.



Slika 4. Izgled konidiofora i konidija ispitivanih izolata.

Figure 4. Conidiophores and conidia of tested isolates.

stične plavozelene boje. Tkivo lukovica ispod spoljašnjih ljuspi je bilo meko, vodenasto i svetlo smeđe do sive boje na poprečnom preseku (Slika 2). Reizolacijom iz inokulisanih lukovica dobijene su kulture koje su po svojim morfološkim osobinama bile iste kao i izolovana gljiva, čime su zadovoljeni Kohovi postulati.

Morfološke i biohemijske karakteristike

Izolati L1a i L4p su na podlogama formirali belu miceliju, u okviru koje je došlo do obilne sporulacije plavozelene boje. Nakon 7 dana inkubacije na 25°C, kolonije izolata su na KDA, CYA, MEA, kao i YES podlozi bile dobro razvijene, guste, plavozele- ne boje sa belim obodom, karakterističnog mirisa. Na KDA i MEA podlozi izolati su formirali somotaste kolonije, dok su na CYA i YES podlozi kolonije bile radijalno naborane. Na CYA podlozi je uočeno formiranje providnog eksudata u kulturi. Naličje kolonija na CYA i YES podlozi je bilo krem do žuto-braon boje (Slika 3). Prečnik kolonije na KDA podlozi je iznosio $29,89 \pm 0,96$ mm za izolat L1a, a $26 \pm 0,37$ mm za izolat L4p; na CYA podlozi $32,56 \pm 0,53$ mm za izolat L1a i $30,11 \pm 2,42$ mm za izolat L4p; i na KDA podlozi $33,86 \pm 1,59$ mm za izolat L1a i $31,17 \pm 1,83$ mm za izolat L4p. Primećeno je da izolati na CYA podlozi ne rastu na 37°C, dok je porast zabeležen na 5°C.

Konidiofore izolata su bile terverticilate, stipe septirane, tankih i glatkih zidova, a fialide cilindrične. Konidije su loptaste do elipsoidne, glatke i formirale su se u dugim lancima. Dimenzije konidija izolata L1a su iznosile $2,87$ – $(3,58)$ – $4,39 \times 2,53$ – $(3,16)$ – $3,79$ μm , a izolata L4p $2,72$ – $(3,26)$ – $3,82 \times 2,36$ – $(2,95)$ – $3,42$ μm .

Utvrđeno je da izolati iz lukovica crnog luka u Ehrlich-ovom testu na filter papiru daju pozitivnu reakciju, pojavom ljubičastog prstena, što govori da stvaraju ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne.

Molekularna analiza

PCR produkti veličine oko 800 bp dobijeni su u oba analizirana izolata korišćenjem Bt-LEV-Up4 i Bt-LEV-Lo1 prajmera. Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije. Nakon sekvenciranja PCR produkata izolata L1a i L4p, dobijene nukleotidne sekvence su deponovane u NCBI bazu podataka pod pristupnim brojevima KJ570971 za izolat L1a i KJ570972 za izolat L4p. MegaBLAST analizom utvrđeno je da su dobijene sekvence dela gena za β -tubulin ispoljile najveću sličnost od 99% sa sekvencama istog regiona vrste *P. polonicum*.

DISKUSIJA

Crni luk se odlikuje izrazitom nutritivnom vrednošću i vrlo je značajna povrtarska kultura, kako u svetu tako i kod nas. Koristi se u svežem stanju kao salata, kivan ili u smeši sa suvim povrćem

kao začinski dodatak jelima. Lukovice crnog luka se mogu čuvati posle vađenja i mnogi faktori mogu da utiču na dužinu njihovog čuvanja. Uspešnost skladištenja lukovica crnog luka zavisi od osobina sorte, temperature i relativne vlažnosti vazduha u skladišnom prostoru, kao i od zdravstvenog stanja i mehaničkih oštećenja (Đević i sar., 2004). Biljne bolesti mogu smanjiti prinose lukovica crnog luka u toku vegetacije, ali je njihov značaj mnogo veći za vreme čuvanja (Pitt and Hocking, 2009).

Tokom 2013. godine, zabeleženi su učestali simptomi truleži lukovica crnog luka u skladištu u Staroj Pazovi, odakle su sakupljene simptomatične lukovice u cilju utvrđivanja etiologije propadanja. Dobijeni patogeni izolati gljive su okarakterisani na različitim podlogama. Na osnovu izgleda i boje kolonija, prisustva plodonosnih tela, eksudacije, mirisa i odlika naličja kolonija, kao i mikroskopskih odlika reproduktivnih organa, izgleda penicilla, stipa i oblika i veličine konidija, a poređenjem sa literarnim podacima izolati su identifikovani kao *P. polonicum* (Frisvad and Samson, 2004). Utvrđeno je da izolati stvaraju ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne, što je takođe karakteristika *P. polonicum* (Frisvad and Samson, 2004). Molekularna analiza izolata zasnovana na delu gena za β -tubulin, potvrdila je pripadnost izolata iz crnog luka vrsti *P. polonicum*.

P. polonicum je na luku opisan u Danskoj (Frisvad and Samson, 2004), ali nema podataka o njegovoj zastupljenosti i ekonomskom značaju u toku čuvanja lukovica crnog luka. Istraživanja sprovedena u našoj zemlji potvrdila su destruktivne simptome koje *P. polonicum* izaziva na lukovicama crnog luka. Pored toga, *P. polonicum* spada u grupu mikotoksigenih gljiva i zabeleženo je da više od 91% izolata stvara potencijalno neurotoksični verukozidin (Lund and Frisvad, 1994). Nefrotoksini koje luči *P. polonicum* dovode se u vezu i sa balkanskom endemskom nefropatijom (Mantle, 2002; Frisvad and Samson, 2004). Prisustvo ove gljive upućuje na značajnost ispitivanja zastupljenosti ove vrste, kao i drugih toksigenih vrsta roda *Penicillium* u uslovi- ma skladištenja lukovica crnog luka. Širok krug domaćina, koji obuhvata različite biljne i animalne proizvode (Nunez et al., 2000; Frisvad and Samson, 2004; Andersen and Thrane, 2006; Kim et al., 2008), govori o potencijalnoj opasnosti od kontaminacije mikotoksinima koje *P. polonicum* stvara.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat projekta III46008 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

LITERATURA

- Andersen, B. and Thrane, U. (2006): Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. *Advances in Food Mycology*, 571: 137-152.
- Day, J. P. and Shattock, R. C. (1997): Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 379-391.
- De Jong S. N., Lévesque C. A., Verkley G. J. M., Abeln E. C. A., Rahe J. E., Braun P. G. (2001): Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. *Mycol. Res.*, 105: 658-669.
- Dević, M., Kosi, F., Dimitrijević, A. (2004): *Uslovi i značaj skladištenja crnog luka*. Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi, 8: 35-38.
- Duduk, N., Vasić, M., Vico, I. (2014): First report of *Penicillium polonicum* causing blue mold on stored onion (*Allium cepa*) in Serbia. *Plant Disease*, 98: 1440.
- Frisvad, J. C. and Samson, R. A. (2004): Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.*, 49: 1-173.
- Kim, W. K., Hwang, Y. S. and Yu, S. H. (2008): Two species of *Penicillium* associated with blue mold of yam in Korea. *Mycobiology*, 36: 217-221.
- Lund, F. and Frisvad, J. C. (1994): Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycol. Res.*, 98: 481-492.
- Lund, F. (1995): Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 228-231.
- Mantle P. G. (2002): Experimental mycotoxic nephropathies and Balkan endemic nephropathy. *Facta Univ. Ser. Medicine and Biology*, 9: 64-65.
- Miladinović, Ž., Damjanović, M., Brkić, S., Marković, Ž., Stevanović, D., Sretenović-Rajičić, T., Zečević, B., Đorđević, R., Čorokalo, D., Stanković, Lj., Zdravković, M., Zdravković, J., Marinković, N., Mijatović, M., Obradović, A., Starčević, M., Milić, B., Todorović, V. (1997): *Gajenje povrća, Školska knjiga, Beograd*, 345-347.
- Nunez, F., Diaz, M. C., Rodriguez, M., Aranda, E., Martin, A., Asensio, M. A. (2000): Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Protection*, 63: 231-236.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (2009): *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York.
- Schwartz, H. F. and Mohan, K. S. (2008): *Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests*. Second Edition, APS Press, USA 47-55.
- Staden, R., Beal, K. F., Bonfield, J. K. (2000): The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology*, 132: 115-130.

(Primljeno: 01.10.2014.)
(Prihvaćeno: 29.10.2014.)

PENICILLIUM POLONICUM – CAUSAL AGENT OF ONION BULB DECAY IN STORAGE

MARINA LAZAREVIĆ¹, NATAŠA DUDUK², MILJAN VASIĆ², IVANA VICO^{2†}

¹PSS Institute Tamiš d.o.o., Pančevo

²University of Belgrade – Faculty of Agriculture, Belgrade
e-mail: natasadukic@yahoo.com

SUMMARY

Penicillium polonicum is an economically important fungal species with a wide host range which includes cereals, peanuts, onions, dried meats, citrus, apple, and yam tubers. Onion bulbs cv. Meranto with blue mold symptoms have been collected, in a storage facility in Stara Pazova during 2013. Fungal isolates were obtained from decayed bulbs and their pathogenicity was proven after wound inoculation of healthy onion bulbs. On differential media the isolates formed velutinous, green blue colonies with a white margin and a characteristic odor. The isolates grew at 5 C while no growth was observed at 37 C. Isolates produced cyclopiazonic acid and other alkaloids. Conidiophores of isolates were terverticillate, stipes were septate with smooth to finely roughened walls, and phialides were ampulliform. Conidia were globose to subglobose, smooth-walled, and borne in columns. The nucleotide sequences of amplified products (č800 bp) for partial β -tubulin gene showed in MegaBLAST search analysis a 99% similarity with several sequences of *P. polonicum*. Based on morphological and molecular features isolates obtained from stored onion were identified as *P. polonicum*.

Key words: blue mold, *Allium cepa*, identification

(Received: 01.10.2014.)

(Accepted: 29.10.2014.)