



www.nsseme.com/journal.html

Isolacija i detekcija gljiva *Alternaria dauci* (Kühn) Groves et Skolk i *Alternaria radicina* Meier, Drechsler et Eddy iz semena mrkve

Dragana Petrović · Maja Ignjatov · Milka Vujaković ·
Zorica Nikolić · Ksenija Taški-Ajduković · Dušica Jovičić

received / primljeno: 01.11.2010. accepted / prihvaćeno: 07.12.2010.
© 2011 IFVC

Izvod: Mrkva spada u veoma značajnu povrtarsku biljnu vrstu zbog svog sastava i sadržaja vitamina. Gljive koje pripadaju rodu *Alternaria*, naročito *A. dauci* (Kühn) Groves et Skolk, prouzrokovatelj lisne pegavosti i sušenja lista, i *A. radicina* Meier, Drechsler et Eddy, prouzrokovatelj crne truleži korena mrkve, mogu da ugroze celokupnu proizvodnju mrkve. Obe vrste se mogu u visokom procentu naći na semenu, ne samo mrkve, već i peršuna i celera. U cilju njihove detekcije preporučuje se metod filter papira i metod izolacije na hranljivoj podlozi (ISTA Rules). Ispitivanje prisustva *A. dauci* i *A. radicina* vršeno je na 12 uzoraka potencijalno zaraženog semena mrkve poreklom iz Francuske kao dela laboratorijskih kružnih testova. Procenat prisustva *A. dauci* metodom na filter papiru kretao se od 0% do 21%, dok je *A. radicina* bila prisutna od 1% do 30%. Na hranljivoj podlozi procenat prisustva *A. dauci* se kretao od 0% do 23% a *A. radicina* od 1% do 31%.

Gljučne reči: *A. dauci*, *A. radicina*, filter papir metod, metod izolacije na hranljivoj podlozi, mrkva, seme

Uvod

Mrkva (*Daucus carota* L.) spada u veoma značajnu povrtarsku biljnu vrstu zbog svog sastava i sadržaja vitamina. Po sadržaju A vitamina, tj. beta karotina – provitamina A, izdvaja se od svih drugih vrsta povrća zauzimajući prvo mesto. Površine na kojima se gaji, kao i ekonomski značaj, u stalnom su porastu u svetu.

Zabeleženo je da postoji više od deset patogena koji se prenose semenom mrkve (Richardson 1990). Gljive koje pripadaju rodu *Alternaria*, naročito *A. dauci* (Kühn) Groves et Skolk, prouzrokovatelj lisne pegavosti i sušenja lista, i *A. radicina* Meier, Drechsler et Eddy, prouzrokovatelj crne truleži korena mrkve, mogu da ugroze celokupnu proizvodnju mrkve. Obe vrste se mogu u visokom procentu naći na semenu, ne samo mrkve, već i peršuna i celera. Gljiva u vidu micelije ili konidija locirana je na površini perikarpa i semenog omotača (Ivanović & Mijatović 2003). Pored semena kao primarni izvor inokuluma brojni autori

navode biljne ostatke, korove i samonikle biljke mrkve, a vetar i česte padavine doprinose bržem širenju patogena (Strandberg 1977).

Među prouzrokovateljima oboljenja mrkve, *A. dauci* jedna je od najznačajnijih. Ima izuzetan ekonomski značaj i predstavlja vodeću bolest ove biljne vrste (Pryor & Strandberg 2002). Javlja se na listu u vidu brojnih sitnih nekrotičnih pega koje vremenom zahvataju celu lisku, dok je na lisnim drškama uočljiva crtičasta nekroza koja prethodi njihovom sušenju. Crnu trulež mrkve (*A. radicina*) karakteriše pojava crnih ugnutih pega na korenu mrkve, a čest simptom je i sužavanje vrha korena (Bulajić & Krstić 2007).

Sve do 2004. u našoj zemlji nisu izvođena istraživanja o vrstama koje parazitiraju gajene biljke iz fam. *Apiaceae*. Tada je problem koje *Alternaria* vrste izazivaju skrenuo pažnju, pošto je došlo do jake pojave pegavosti i sušenja listova mrkve i peršuna u nekoliko lokaliteta u Srbiji, a uzročnici su bile vrste iz roda *Alternaria* (Bulajić 2007).

Obzirom da su *A. dauci* i *A. radicina* gljive koje se prenose semenom, veoma je važna tačna identifikacija patogena. Pravilna identifikacija prisustva *A. dauci* i *A. radicina* može se obaviti primenom konvencionalnih, ali i savremenih molekularnih metoda detekcije (Konstantinova

D. Petrović (✉) · M. Ignjatov · M. Vujaković · Z. Nikolić · K. Taški-Ajduković · D. Jovičić
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija
e-mail: dragana.petrovic@ifvns.ns.ac.rs

et. al. 2002, Pryor & Gilbertson 2002). U cilju identifikacije *A. dauci* i *A. radicina* preporučuje se metod filter papira i metod izolacije na hranljivoj podlozi (ISTA Rules 2010). Cilj rada je utvrđivanje procentualne zaraženosti semena ispitivanih uzoraka gljivama *A. dauci* i *A. radicina* navedenim metodama.

Materijal i metod

Ispitivanje prisustva *A. dauci* i *A. radicina* na semenu mrkve kao i određivanje procenta zaraženosti semena vršeno je na 12 uzoraka potencijalno zaraženog semena mrkve poreklom iz Francuske, kao deo laboratorijskih kružnih testova koje organizuje ISTA. Za detekciju gljiva korišćen je filter papir metod i metod izolacije na hranljivoj podlozi (ISTA Rules 2010).

Izolacija patogena iz semena mrkve

Filter papir metod (ISTA 7-001a, 7-002a). Za ispitivanje zaraženosti semena mrkve metodom filter papira korišćeno je po 100 semena iz svakog uzorka. Set od tri sterilisana filter papira prečnika 9 cm natapan je u posudi sa sterilnom vodom i tako natopljen postavljen u Petri posudu. U svaku Petri posudu, postavljeno je po deset semena na rastojanju od 20 mm. Inkubacija je vršena na temperaturi od 20°C u mraku tokom tri dana. Nakon isteka tog vremena posude sa uzorcima su izložene temperaturi od -20°C u trajanju od 24 h. Potom su premeštene u termostat na 20°C 6 dana uz smenu svetla (NUV) i mraka svakih 12 h (Gambogi 1987).

Metod hranljive podloge (ISTA 7-001b, 7-002b). Za determinaciju gljive na hranljivoj podlozi preporučuje se Malt agar (MA). Seme je pažljivo isprano u 1% rastvoru NaOCl u trajanju

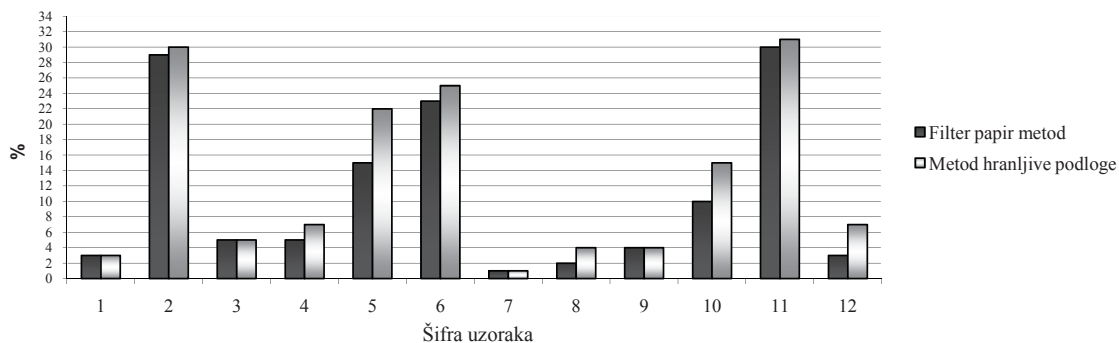
od 10 minuta, isprano u sterilnoj vodi i osušeno na sterilnom filter papiru. Podloga je nakon sterilizacije i hlađenja do 50°C razlivena u Petri posude prečnika 9 cm. U svaku Petri posudu postavljeno je po deset semena na rastojanju od 20 mm. Inkubacija je obavljena na 20°C uz smenu svetla (NUV) i mraka svakih 12 sati u trajanju od 10 dana.

Nakon isteka inkubacionog perioda, svako seme je mikroskopski pregledano na uveličanju od 40 x. Determinacija vrste *A. dauci* i *A. radicina* je izvršena na osnovu podataka koje navode Mathur & Kongsdal (2003) i prema ISTA Rules (2010). Na osnovu utvrđenog procenta zaraze dobijen je uvid u zdravstveno stanje ispitivanih uzoraka mrkve.

Rezultati i diskusija

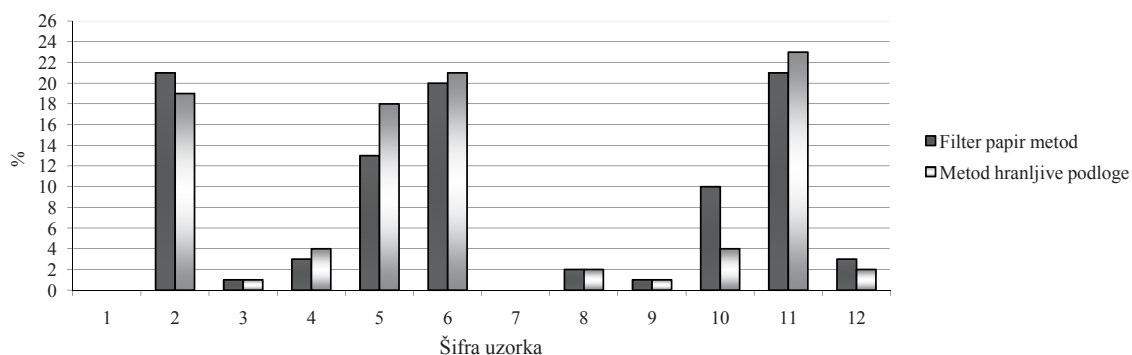
Na osnovu ispitivanja zdravstvenog stanja semena mrkve korišćenjem metode na filter papiru i metode izolacije na hranljivoj podlozi, utvrđeno je prisustvo gljiva *A. dauci* i *A. radicina*. Na svih dvanaest testiranih uzoraka konstatovano je prisustvo bar jednog patogena. Po procentu zaraženosti uzoraka *A. radicina* je bila zastupljenija. Procent zaraze kretao se od 1% do 30% na filter papiru, dok je na hranljivoj podlozi taj procenat iznosio od 1% do 31% (Sl. 1). Na filter papiru *A. dauci* je bila zastupljena od 0% do 21%, a na hranljivoj podlozi od 0% do 23% (Sl. 2).

Na filter papiru *A. dauci* obrazovala je tamnobraon do crnu vazdušastu miceliju. Konidiofore su jednostavne ili blago razgranate, pojedinačne ili u malim grupama. Mikroskopskim pregledom konstatovane su pojedinačne konidije, sužene na jednom kraju, sa repom koji je i do tri puta duži od ostatka tela konidije, veličine 100-450 x



Slika 1. Procenat pojave *A. radicina* u 12 uzoraka semena mrkve utvrđeno metodom filter papira i izolacijom na hranljivu podlogu

Fig 1. The percentage of *A. radicina* in 12 seed samples on carrot by blotter method and agar plate method.



Slika 2. Procenat pojave *A. dauci* u 12 uzoraka semena mrkve metodom filter papira i izolacijom na hranljivu podlogu

Fig. 2. The percentage of *A. dauci* in 12 seed samples on carrot by blotter method and agar plate method

16-25 μm , što je saglasno sa navodima literature koje daju Mathur & Kongsdal (2003) i ISTA rules (2010). Boja konidija je okeržuta ili svetlo mrka (Sl. 3a).

Na hranljivoj podlozi kolonije gljive su maslinastomrke boje koje sa starenjem postaju tamno mrke (Sl. 3b). Gljiva proizvodi mrki pigment u podlozi. Konidije su pojedinačne, a po obliku i

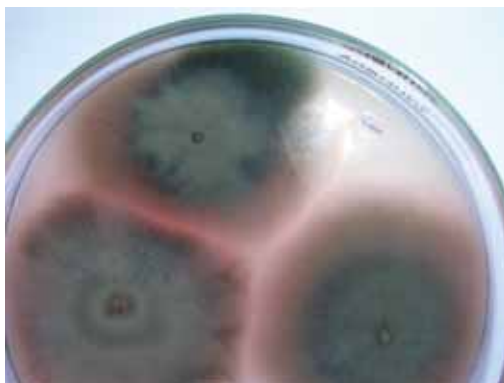
dimenzijama iste kao i konidije konstatovane na filter papiru.

Pored konidija gljive *A. dauci*, mikroskopskim pregledom su uočene i konidiofore, jednostavne ili blago razgranate, u malim grupama. One formiraju na domaćinu površinsku, sivu vazdušastu miceliju. Konidije su takođe pojedinačne ili u kratkim lancima (dve-tri konidije), elipsoidnog ili



Slika 3a. Konidija gljive *A. dauci*

Fig. 3a. Conidia of *A. dauci*



Slika 3b. Micelija gljive *A. dauci* na MA podlozi

Fig. 3b. Mycelium of *A. dauci* on MA medium



Slika 4a. Konidija gljive *A. radicina*

Fig. 4a. Conidia of *A. radicina*



Slika 4b. Micelija gljive *A. radicina* na MA podlozi

Fig. 4b. Mycelium of *A. radicina* on MA medium

buretastog oblika, maslinasto mrke boje, veličine 27-57 μm x 9-27 μm što nam je na osnovu literaturnih podataka koje daju Mathur & Kongsdal (2003) i ISTA rules (2010) ukazivalo na vrstu *A. radicina* (Sl. 4a).

Na hranljivoj podlozi gljiva formira koncentrično raspoređenu koloniju sa bogatom maslinasto sivom micelijom (Sl. 4b). U podlozi se obrazuje plavocрни pigment. Izgled i veličina konidija odgovaraju dimenzijama konidija konstatovanih na filter papiru.

Infekcija semena biljaka fam. *Apiaceae* sa *Alternaria* spp. jedan je od najvažnijih načina za opstanak i širenje ovih gljiva u prirodi (Kwasna 1992, Agrios 2005). Inficirano seme može da dovede do smanjenja klijavosti (Tilkovska 1992) i prinosa i može doprineti prenošenju *Alternaria* spp. u nove proizvodne oblasti (Prior i sar 1997).

Izolacija i identifikacija gljiva sa semena ratarsko povrtarskih biljnih vrsta predstavlja važan segment u proizvodnji semena. Veliki broj patogena izolovan je sa semena korišćenjem metoda izolacije na hranljive podloge (Milošević i sar. 2008, Petrović i sar. 2010, Ignjatov i sar. 2010). Metod filter papira je najčešće korišćen metod u identifikaciji gljiva roda *Alternaria*. Tako su autori Wan & Suaresh (2006) koristili ovaj metod za detekciju *Alternata* spp. U tim istraživanjima od pet testiranih uzoraka semena mrkve *A. alternata* i *A. radicina* su detektovane na svim uzorcima u visokom procentu od 25,8% do 70,5% i od 37,5% do 63,5% dok je *A. dauci* detektovana na četiri uzorka sa nivoom zaraze od 0,5% do 7,7%. Bulajić i sar. (2009) su u Srbiji primenom metode zamrza-

vanja na filter papiru detektovali prisustvo četiri fitopatogene vrste iz roda *Alternaria*: *A. dauci*, *A. radicina*, *A. petroselimi* i *A. alternata* koje su izazvale smanjeno nicanje mrkve, peršuna, paštrnaka i celera. Postoji još nekoliko izveštaja o visokoj infekciji semena mrkve sa *A. radicina* čije su se vrednosti kretale od 0,5% do 82% (Tylkowska 1992); od 0,5% do 7,5% (Wan & Suaresh 2006) i od 0,25% do 30% (Maude 1966). Infekcija sa *A. radicina* bila je detektovana čak i u semenu mrkve tretirane sa iprodionom od 37,5% do 63,5% (Wan & Suaresh 2006). Infekcija semena mrkve gljivom *A. dauci* kreće se od 0,3% do 8% (Tylkowska 1992) i 13,2% (Netzer & Kenneth 1969). Takođe je u nekim slučajevima konstatovana i mešana infekcija *A. radicina* i *A. dauci* (Strandberg 2002). Ovako visok procent zaraze sa *A. dauci* može dovesti do jake epidemije koje mogu smanjiti prinos mrkve od 40% do 60% (Farrar et al. 2004). *A. radicina* takođe ima izuzetan ekonomski značaj, pa su tako u Australiji zabeleženi gubici prinosa čak do 88% (Pryor 2002).

Zaključci

S obzirom da je glavni izvor inokuluma za narednu sezonu zaraženo seme, potrebno je koristiti zdravo seme za setvu. Stoga je potrebno vršiti ispitivanja zdravstvenog stanja semena mrkve i utvrđivanje prisustva ova dva patogena. Na osnovu razvoja micelije i kolonije izolovanih gljiva možemo zaključiti da su metoda filter papira i metoda izolacije na hranljivu podlogu podjednako efikasne u cilju identifikacije gljiva *A. dauci* i *A. radicina*.

Literatura

- Agrios G N (2005): Plant Pathology, Elsevier Academic Press, Burlington, San Diego, London 4-922
- Bulajić A (2007): Identifikacija i taksonomski međudnos vrsta roda *Alternaria* Ness patogenih za povrtarske i začinske biljke familije *Apiaceae* u Srbiji. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd
- Bulajić A, Krstić B (2007): Patogeni mrkve (*Alternaria radicina*, *A. dauci*). Biljni lekar 6: 595-604
- Bulajić A, Đekić I, Lakić N, Krstić B (2009): The presence of *Alternaria* spp. on the seed of apiaceae plants and their influence on seed emergence. Arch. Biol. Sci. 61: 871-881
- Farrar J, Pryor B A, Davis R M (2004): *Alternaria* diseases of carrot. Plant Dis. 88: 776-784
- Gambogi P (1987): Carrot. Leaf blight, damping off. *Daucus carota*, *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko. ISTA Handbook on Seed Health Testing, 2nd Edition, Working Sheet 4: 1-5
- Ignjatov M, Gašić K, Ivanović M, Šević M, Obradović A, Milošević M (2010): Characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* strains pathogens of pepper in Serbia. Pesticidi i fitomedicina 25: 139-149
- International Rules for Seed Testing (2010): Annexe to Chapter 7 Seed Health Testing Methods
- Ivanović M, Mijatović M (2003): Patogene gljive semena povrća. Biljni lekar 6: 595-603
- Konstantinova P, Bonants P J M, van Gent-Pelzer M P E, van der Zouwen P, van den Bulk R (2002): Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. Mycological Res. 106: 23-33
- Kwasna H (1992): Occurrence of *Alternaria* species in Poland. In: J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria Biology, Plant Diseases, and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism*, 3. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 301-336
- Mathurm S B and Kongsdal O (2003): Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. ISTA, Zürich, Switzerland
- Maude R B (1966): Studies on etiology of black rot, *Stemphylum radicum* (Meier, Drechs. and Eddy) Neerg., and leaf blight, *Alternaria dauci* (Kuhn) Groves et Skolko, on carrot crops; and on fungicide control of their seed-borne infection phases. Ann. Appl. Biol. 57: 83-93
- Milošević M, Ignjatov M, Vujaković M, Petrović D, Nikolić Z, Dokić V (2008): Svojstva gljiva roda *Fusarium* sp. i mogućnost dugoročnog čuvanja metodom liofilizacije. Arhiv za poljoprivredne nauke 69: 89-95
- Netzer D, Kenneth R G (1969): Persistence and transmission of *Alternaria dauci* (Kuhn) Groves et Skolko in the semi-arid conditions of Israel. Ann. Appl. Biol. 63: 289-294
- Petrović D, Ignjatov M, Vujaković M, Taški-Ajduković K, Nikolić Z, Milošević M, Jovičić D (2010): Mikopopulacija semena kukuruza (2006-2008). Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res. 47: 561-566
- Pryor B M, Davis R M, Gilbertson R L (1997): Detection of soil-borne *A. radicina* and its occurrence in California carrot fields. Plant Dis. 82: 891-895
- Pryor B M, Gilbertson R L (2002): Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotimcultae* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. Mycologia 94: 49-61
- Pryor B M and Strandberg J O (2002): *Alternaria* leaf blight of carrot. In: R. M. Davis and R. N. Raid (eds.), *Compendium of Umbelliferous Crop Diseases* The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 15-16
- Richardson M J (1990): An Annotated List of Seed-Borne Diseases. Fourth edition. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland
- Strandberg J O (1977): Spore production and dispersal of *Alternaria dauci*. Phytopathol. 67: 1262-1266
- Strandberg J O (2002): A selective medium for the detection of *Alternaria dauci* and *Alternaria radicina*. Phytoparasitica 30: 269
- Tylkowska K (1992): Carrot seed-borne diseases caused by *Alternaria* species. In: J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria Biology, Plant Diseases, and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism*, 3. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 337-352
- Wan G K, Suaresh B M (2006): Detection of *Alternaria* spp. in carrot seeds and effect of the fungus on seed germination and seedling growth of carrot. Plant Pathol. J. 22: 11-15

Isolation and Detection of the Fungi *Alternaria dauci* (Kühn) Groves et Skolk and *Alternaria radicina* Meier, Drechsler et Eddy from Carrot Seeds

Dragana Petrović · Maja Ignjatov · Milka Vujaković ·
Zorica Nikolić · Ksenija Taški-Ajduković · Dušica Jovičić

Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

Summary: Carrot is among the most important vegetable crops because of its composition and vitamin content. The fungi belonging to genus *Alternaria*, especially *A. dauci* (Kühn) Groves et Skolk, causal agent of leaf spot and blight of carrots, and *A. radicina* Meier, Drechsler et Eddy, the agent of black root rot, can jeopardize the entire production of carrots. Both types can be found in a high percentage of seeds, carrots, parsley and celery. The method of detection filter paper (blotter method) and the method of isolation on malt agar were recommended by ISTA Rules. The presence of *A. dauci* (causal agent of leaf spot and blight of carrots) and *A. radicina* was performed on 12 samples of potentially infected carrot seeds originating from France, as part of laboratory ring tests. The presence of *A. dauci* and *A. radicina* using the filter paper method in 12 tested samples ranged from 0% to 21% and from 1% to 30% respectively. On MA medium the respective percentages ranged from 0% to 23% and from 1% to 31%.

Key words: *A. dauci*, *A. radicina*, agar plate method, blotter method, carrot, seed