

MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA *ALTERNARIA ALTERNATA* - PATOGENA PLODOVA KIMA U SRBIJI

DANIJELA RISTIĆ¹, MILICA AĆIMOVIĆ², NENAD TRKULJA¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd
e-mail: ristidaca@yahoo.com

REZIME

Tokom 2013. godine, na oglednom polju u Mošorinu, prikupljeni su uzorci zaraženog semena gajenog kima i analizirani na prisustvo fitopatogenih gljiva. U svim uzorcima semena, ustanovljena je slabija klijavost i visok stepen zaraze fitopatogenim gljivama iz roda *Alternaria*, 100%. Iz zaraženog semena izolovane su monosporijalne kulture, čija je patogenost potvrđena pojavom simptoma na veštački inokulisanim klijancima kima i peršuna, a na osnovu morfoloških svojstava identifikovane su kao *Alternaria alternata*. Molekularna identifikacija obavljena je primenom lančane reakcije polimeraze (PCR, Polymerase Chain Reaction) uz korišćenje prajmera ITS1/ITS4 i amplifikaciju ITS regiona ribozomalne DNK. Sekvence gena odabranih izolata CC1 (KP822948), CC2 (KP822949) i CC3 (KP822950) pokazale su 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 31 izolata *A. alternata* deponovanih u GenBank bazi podataka. Prisustvo većeg broja vrsta gljiva na semenu kima, zahteva dalja ispitivanja njihovih međusobnih odnosa i relativnog značaja.

Cljučne reči: kim, *Alternaria alternata*, molekularna identifikacija, morfološka svojstva, test patogenosti

UVOD

Kim (*Carum carvi* L., fam. Apiaceae Lindl.) je poznata jestiva, začinska i lekovita biljka koja se gaji širom Zapadne Azije, Evrope i Severne Afrike (Bercu and Broască, 2012). Plodovi kima sadrže etarska ulja (karvon, limonen) i zato predstavljaju značajan potencijal za farmaceutsku i kozmetičku industriju (Mačkinité, 2010). Utvrđeno je da ekstrakti plodova kima imaju jaku antibakterijsku i antifungalnu aktivnost i zato se koriste za razvoj biljnih antimikrobnih formulacija (Gupta et al., 2011).

Brojne fitopatogene gljive ugrožavaju gajenje i proizvodnju biljaka iz familije Apiaceae, a među njima poseban značaj imaju gljive iz roda *Alternaria* (Bulajić, 2006). Promene načina gajenja, uvođenje plantažne proizvodnje lekovitih biljaka dodatno su uticale na intenzivniju pojavu

postojećih patogena (Gamliel and Yarden, 1998), posebno onih sa širokim spektrom domaćina, kao što su vrste roda *Alternaria*, koje parazitiraju preko 4000 različitih biljnih vrsta (Pryor, 2003). Prisustvo različitih patogenih gljiva na semenu lekovitog bilja, može biti značajno sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta semena, u pogledu kontaminacije štetnim mikotoksinima (Singh and Dubey, 2012). Bolesti kima intenzivno se proučavaju u mnogim zemljama (Bugarska, Češka, Poljska, Nemačka, Holandija) (Evenhius et al., 1995; Gabler, 2001; Mazur and Nawrocki, 2004; Rodeva and Gabler, 2004; Odstričilová, 2007; Machowicz-Stefaniak, 2009), dok su u Srbiji literaturni podaci o patogenima kima relativno oskudni i pored značajnih šteta koje prouzrokuju.

Tokom ispitivanja zdravstvenog stanja semena kima 2013. godine, ustanovljeno je prisustvo izolata gljiva, preliminarno identifikovanih

kao *Alternaria* spp., koji su ispoljili patogenost na sejancima peršuna. Osnovni cilj sprovedenih istraživanja bio je da se detektovani izolati iz semena kima identifikuju primenom konvencionalnih i molekularnih metoda, amplifikacijom ITS regiona ribozomalne DNK, što predstavlja uvođenje novih perspektiva u proučavanje fitopatogenih gljiva iz semena kima u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka plodova kima i izolacija patogena

U okviru istraživanja tokom 2013. godine na oglednom polju u Mošorinu (Južno-Bački okrug, 45°18' N, 20°09' E, nadmorska visina 111m), izvršen je pregled semena kima u fazi pune zrelosti, radi utvrđivanja prisustva fitopatogenih gljiva iz roda *Alternaria*. Ukupno 400 semena (100 semena x četiri ponavljanja) ispirano je 2 h pod mlazom česmenske vode, površinski sterilisano u 2% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina) u trajanju od 2 min i ispirano dva puta u sterilnoj vodi (Singh et al., 1991). Površinski sterilisano seme nanošeno je na vlažan filter papir, inkubirano u mraku pri 25°C, a pojava pojedinačnih kolonija praćena je tokom naredna tri dana. U cilju dobijanja uniformih i čistih kultura, nakon tri do pet dana razvoja inicijalnih kolonija izvršena je monosporijalna izolacija gljive na podlogu krompir-dekstrozni agar (potato dextrose agar, PDA).

Provera patogenosti

Test provere patogenosti svih dobijenih monosporijalnih izolata *Alternaria* spp. obavljen je veštačkom inokulacijom biljaka kima i peršuna u fazi razvoja 5-6 listova. Inokulacija je obavljena prskanjem suspenzije konidija pripremljene od kultura odabranih izolata starih 10 dana, koje su odgajane na PDA podlozi u mraku, pri temperaturi od 25°C (Strandberg, 1987; Pryor and Gilbertson, 2002). Koncentracija dobijene suspenzije podešena je na 1×10^3 konidija/ml pomoću hemocitometra (Muntanola-Cvetković, 1987). Sa 10 ml tako pripremljene supenzije od svakog izolata inokulisano je po 5 biljaka, a ogled je ponovljen dva puta. Inokulisane biljke su potom održavane u uslovima staklenika. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrивane PVC folijom koja je nakon dva dana uklonjena. Kao negativna kontrola korišćene su bil-

jke kima i peršuna inokulisane sterilnom vodom. Pojava simptoma posmatrana je do dve nedelje po inokulaciji. Sa listova na kojima su se razvili simptomi izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji.

Morfološka svojstva

Morfološka identifikacija obavljena je na osnovu proučavanja makroskopskih i mikroskopskih svojstava odabranih monosporijalnih izolata *Alternaria* spp. prema kriterijumima Muntanola-Cvetković (1987). Proučavanje makroskopskih svojstava obuhvatilo je praćenje intenziteta rasta i izgleda kolonije, boju i lućenje pigmenta. Ispitivanje mikroskopskih svojstava obuhvatilo je utvrđivanje oblika i dimenzija konidija na kulturama starim sedam dana, odgajenim na PDA podlozi u mraku pri 25°C. Sve dimenzije su merene na slučajno odabranim, potpuno formiranim i zrelim konidijama koje su bile odgovarajuće obojenosti, kako to preporučuju Pryor and Gilbertson (2002). Prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivana je dužina i širina konidija.

Molekularna detekcija i identifikacija

Metoda lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *A. alternata* poreklom iz semena kima, kao potvrda identifikacije na osnovu konvencionalnih metoda. Za ova ispitivanja odabrani su izolati CC1, CC2 i CC3 dobijeni iz zaraženog semena kima. Ekstrakcija ukupne DNK obavljena je iz vazdušne micelije sakupljene direktno iz sedam dana starih kolonija odgajenih na PDA podlozi, korišćenjem komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvu proizvođača. PCR reakcija obavljena je sa parom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 (Konstantinova et al., 2002) koji omogućavaju amplifikaciju i kasnije sekvencioniranje ITS regiona (Internal transcribed spacer) ribozomalne DNK Eukariota. PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 25 µl, korišćenjem 12,5 µl 2X PCR Master miksa (Fermentas, Lithuania), 9 µl RNase-free vode, po 1,25 µl svakog prajmera (100 pmol/µl) i 1 µl ekstrahovane ukupne DNK. Kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK. PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min na 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje

od denaturacije 2 min na 94°C, hibridizacije 30 s na 57°C, elongacije 1 min na 72°C, praćeno finalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 10 min.

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1 x TBE puferu, bojenjem Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics) i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine 500-600 bp.

Umnoženi fragmenti izolata CC1, CC2 i CC3, poslani su na prečišćavanje i uslužno sekvencioniranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., a konsenzus nukleotidne sekvence podnete su u GenBank bazu podataka, gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number).

BLAST analizom i višestrukim poređenjem sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al. 1994), obavljena je potvrda identifikacije. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti, nakon trimovanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 5.0. (Tamura et al., 2011).

REZULTATI I DISKUSIJA

Izolacija patogena, provera patogenosti i konvencionalna identifikacija

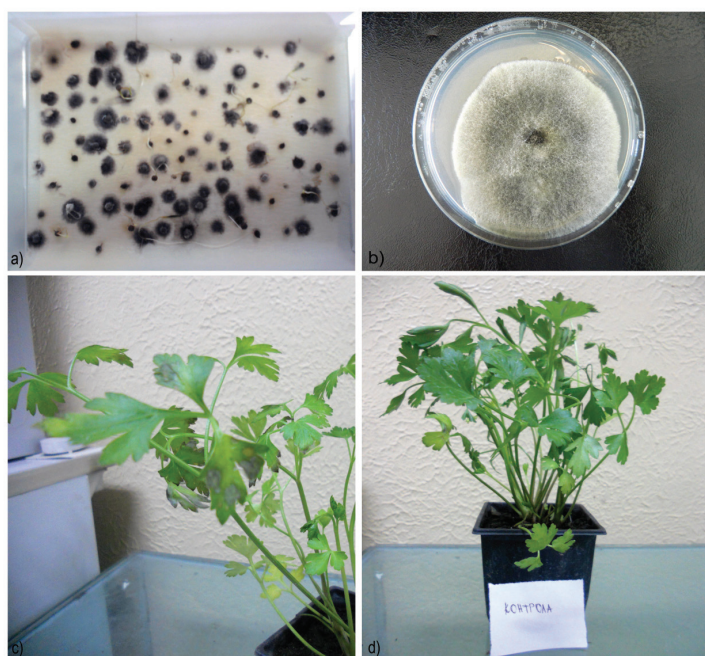
Ispitivanjem zdravstvenog stanja semena kima, prikupljenog sa oglednog polja u Mošorinu 2013. godine, utvrđen je visok stepen zaraze (100%) fitopatogenim gljivama iz roda *Alternaria*. Zaraza semena začinskih biljaka iz familije Apiaceae sa *Alternaria* spp. je jedan od osnovnih načina održavanja i prenošenja ovih gljiva u prirodi (Kwasna, 1992; Agrios, 2005) i o tome postoji dosta literaturnih navoda. Mikropopulacija semena kima je brojna i raznovrsna. U Litvaniji na semenu gajenog kima ukupno je identifikovano 55 vrsta, 2 varijeteta i 39 rodova koji pripadaju razdelu *Ascomycota*, *Basidiomycota* i *Zygomycota* (Mačkinaite, 2011). Tako, Mačkinaite (2010) navodi da je *A. alter-*

nata najzastupljenija vrsta iz roda *Alternaria*, koja je uvek prisutna na semenu kima u visokom procentu, a pojedinih godina i preko 92%. U istraživanjima Bulajić (2006) navodi da seme povrća i začinskog bilja iz familije Apiaceae ispoljava različit stepen zaraze sa fitopatogenim gljivama roda *Alternaria*, i da je svaka zaraza semena veoma značajna. Primenom standardnih metoda iz semena kima izdvojeno je osam monosporijalnih izolata (Slika 1a), koji su po morfološkim svojstvima odgovarali *A. alternata*. U uslovima veštačke inokulacije klijanaca kima i peršuna reprodukovani su simptomi prirodne infekcije. Ispitivani izolati izazvali su pojavu brojnih nekrotičih pega na inokulisanim sejancima. Simptomi su se najčešće pojavljivali 5-7 dana od inokulacije u vidu tamno braon do crnih pega nepravilnih oblika na obodu listova (Slika 1c). Kasnije je došlo do sušenja listova i potpunog propadanja biljaka. Iz svih inokulisanih biljaka kima i peršuna sa simptomima, uspešno je izvršena reizolacija patogena primenom istih metoda kao i pri izolaciji. Na biljkama koje su inokulisane kao negativna kontrola, nije došlo do pojave simptoma (Slika 1d).

Svi ispitivani izolati iz semena kima ispoljavali su zajednička morfološka svojstva koja odgovaraju opisu zbirne vrste *A. alternata*. Za detaljno proučavanje morfoloških svojstava odabrana su tri reprezentativna izolata CC1, CC2 i CC3. Ispitivani izolati formirali su bujne sivomaslinaste kolonije, sa ravnom do blago talasastom ivicom bele boje (Slika 1b), dok se prosečni dnevni porast kretao od 9.5 do 13.8 mm. Ovi izolati nisu lučili pigmente u podlozi. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa opisom kolonije koji Yu (1992) navodi za *A. alternata*. Pojedinačne konidije su različitog oblika pravilno elipsoidne, okruglaste ili izdužene sa kratkim koničnim kljunom. Konidije sva tri izolata bile su prosečnih dimenzija 22.55-28.15 x 9.55-10.75 µm, čija je katenuklacija bila u vidu razgranatih nizova, što u potpunosti odgovara navodima Yu (1992) i Pryor (2003) za vrstu *A. alternata*.

Molekularna detekcija i identifikacija

Molekularna metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i sekvencioniranje umnoženih fragmenata DNK, uspešno su primenjeni za detekciju i identifikaciju ispitivanih izolata *A. alternata*. Primenom para univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona ribo-



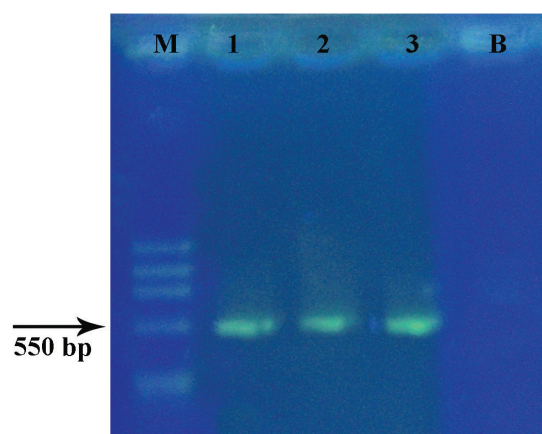
Slika 1. *Alternaria alternata*: a) izolacija patogena iz semena na filter papir; b) izgled kolonije na PDA podlozi; c) veštački zaraženi klijanci peršuna; d) negativna kontrola.

Figure 1. *Alternaria alternata*: a) isolation of the pathogen from seed on filter paper; b) colony appearance on PDA media; c) artificially inoculated parsley seedlings; d) negative control.

zomalne DNK Eukariota i poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih izolata (CC1, CC2 i CC3), sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je prisustvo fragmenata očekivane veličine oko 550 bp (Slika 2). Do amplifikacije nije došlo kod uzorka koji je predstavljao negativnu kontrolu (PCR smeša sa RNase-free vodom).

Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenih amplifikacijom iz micelije uzorka CC1, CC2 i CC3, korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4, konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi KP822948, KP822949 i KP822950. BLAST analiza sekvenci fragmenata dužine 510 bp, pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama 31 izolata vrste *A. alternata* deponovanih u GenBank bazi podataka, među kojima su sekvence pod pristupnim brojevima KF293886, KF293963, KF293964 poreklom iz Kine i KJ526174, KJ526175 poreklom iz Turske.

Molekularne metode kao savremen pristup u identifikaciji biljnih patogena imaju veliku prednost u primeni za preciznu identifikaciju, karakterizaciju, utvrđivanje strukture populacije, određivanje puteva introdukcije i drugih brojnih



Slika 2. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4. Kolone: M- MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1- izolat CC1; 2- izolat CC2; 3- izolat CC3; B- negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom).

Figure 2. Electrophoretic analysis of PCR products obtained using primer pair ITS1/ITS4. Lanes: M- Mass-Ruler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1- isolate CC1; 2- isolate CC2; 3- isolate CC3; B- negative control (PCR mix with RNase-free water).

aspekata filogeografije i epidemiologije različitih patogena. Zbog visoke osetljivosti i specifičnosti, ove metode predstavljaju značajno poboljšanje u dijagnostici oboljenja koje prouzrokuju fitopatogene gljive. Sekvencioniranje većeg broja izolata i uključivanje dodatnih delova genoma doprineće boljem poznavanju strukture populacije *A. alternata*, a takođe predstaviće uvod u bližu genetičku karakterizaciju i služiće za brzo i lako razlikovanje morfološki sličnih vrsta unutar roda *Alternaria* patogena za kim u Srbiji.

U cilju smanjenja šteta od fitopatogenih gljiva roda *Alternaria* i toksičnih metabolita koje luče, moraju se preduzeti naporu u očuvanju zdravstvenog stanja semena kima, najpre poboljšanjem uslova gajenja, skladištenja i transporta. Stalne mikološke i toksikološke kontrole sve više su neophodne kako bi se smanjio rizik od upotrebe zaraženog semena kima, kao setvenog materijala ili ploda korišćenog za ishranu.

ZAHVALNICA

Ova istraživanja finansirana su u okviru Projekta TR 31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Agrios, G. N. (2005): Plant pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press, Burlington, San Diego, London, pp. 1-922.
- Bercu, R. and Broască, L. (2013): Comparative histoanatomical aspects of the fruit of some Apiaceae Lindl. Fruit used for therapeutic purposes. *Annals of RSCB*, 17: 265-270.
- Bulajić, A. (2006): Identifikacija i taksonomski međuodnos vrsta roda *Alternaria* Ness patogenih za povrtarske i začinske biljke familije Apiaceae u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, str. 1-134.
- Evenhuijs, A., Verdam, B., Gerlagh, M., et al. (1995): Studies on major diseases of caraway (*Carum carvi*) in the Netherlands. *Industrial Crops and Products*, 4: 53-61.
- Gabler, J. (2001): Approaches to resistance breeding of annual caraway (*Carum carvi* L. var. *annum*) to umbel browning. *Beitrag zur Zuchtungs-forschung der BAZ*, 1: 21-25.
- Gamliel, A., Yarden, O. (1998): Diversification of Diseases Affecting Herb Crops in Israel. Accompanies the Increase in Herb Crop Production. *Phytoparasitica*, 26: 53-58.
- Gupta, A., Dubey, M., Parmar, M., Mahajan, S., Sharma, R. (2011): Evaluation of Antimicrobial activity of *Carum Carvi* (Seeds) extract against *E. coli* and *Aspergillus niger*. *Drug Invention Today*, 3: 211-213.
- 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 Research*, 106: 23-33.
- Kwasna, H. (1992): Occurrence of *Alternaria* Species in Poland. In *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism - Volume 3*, ed. by Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 301-336.
- Machowicz-Stefaniak, Z. (2009): The occurrence and biotic activity of *Phomopsis diachenii* Sacc. *Acta Agrobotanica*, 62: 125-135.
- Mačkinaitė, R. (2010): Fungy diversity on wild and cultivated common caraway (*Carum carvi* L.) seeds. *Žemdirbystė=Agriculture*, 97: 73-84.
- Mačkinaitė, R. (2011): Internal mycobiota of wild and cultivated common caraway (*Carum carvi* L.) seeds. *Žemdirbystė Agriculture*, 98: 183-194.
- Mazur, S. and Nawrocki, J. (2004): Fungal diseases threat on caraway plantations in the south region of Poland. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 7: 201-203.
- Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija, Niro Književne novine, Beograd, pp. 13-320.
- Odstričilová, L. (2007): Changes in the occurrence of mycoflora on caraway seeds after fungicide application. *Plant Protection Science*, 43: 146-150.
- Pryor, B. (2003): *Alternaria* online. University of Arizona. <http://ag.arizona.edu/PLP/alternaria/online/>
- Pryor, B. M., Gilbertson, R. L. (2002): Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. *Mycologia*, 94: 49-61.