

GLIVE IZ RODU *Colletotrichum*, POVZROČITELJICE ANTRAKNOZE NA SADNEM DREVJU IN JAGODIČEVJU V SLOVENIJI

Alenka MUNDA¹, Barbara GERIČ STARE²

^{1,2} Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

Glive iz rodu *Colletotrichum* sodijo med gospodarsko najpomembnejše škodljive organizme na kmetijskih rastlinah, pa tudi na okrasnem drevju ter grmičevju. Zmožnost, da povzročijo latentno okužbo, jih uvršča tudi med pomembne povzročiteljice skladiščnih bolezni. Bolezenska znamenja, ki jih povzročajo, imenujemo antraknoza in se kažejo kot uleknjene, bolj ali manj okrogle temne pege, na katerih se razvijejo trosišča (acervuli) in oranžni skupki trosov. Za razumevanje etiologije bolezni, ki jih povzročajo glive iz rodu *Colletotrichum*, je pomembna zanesljiva identifikacija vrste povzročiteljev, pa tudi prepoznavanje populacij znotraj posameznih vrst. Standardne metode za identifikacijo vrst temeljijo na morfoloških karakteristikah kot so barva kolonije, velikost in oblika konidijev, obstojnost set, hitrost priraščanja micelija pri različnih temperaturah in navzočnost spolnega stadija. Te metode ne zadoščajo za zanesljivo identifikacijo vrst zaradi velike variabilnosti in nestabilnosti morfoloških značilnosti pri obravnavanih glivah. Nadgraditi jih je potrebno z molekularnimi metodami. S slednjimi so v populaciji glive *C. acutatum*, ki velja za najpomembnejšo povzročiteljico antraknoze na sadnem drevju in jagodičevju, identificirali osem molekularnih skupin (A1 do A8) in tri opisali kot samostojne vrste: *C. simmondsii*, *C. fioriniae* in *C. acutatum sensu stricto*. V naši raziskavi antraknoze na sadnem drevju in jagodičju smo se osredotočili na bolezni, ki jih glive iz rodu *Colletotrichum* povzročajo na treh izbranih sadnih vrstah: domačem orehu, ameriški borovnici in jagodnjaku. V letih 2008 - 2010 smo zbrali 86 vzorcev, pri katerih smo analizirali pojav gliv iz tega rodu. Z morfološkimi in molekularnimi metodami smo ugotovili, da sedem izolatov pripada vrsti *C. simmondsii*, 26 izolatov vrsti *C. fioriniae*, 53 izolatov pa molekularni skupini A4, ki za zdaj še ni opisana kot samostojna vrsta.

Ključne besede: antraknoza, *Colletotrichum*, Slovenija

ABSTRACT

SPECIES OF *Colletotrichum* CAUSING ANTHRACNOSE OF FRUIT TREES AND SMALL FRUIT IN SLOVENIA

Species belonging to the genus *Colletotrichum* cause economically important diseases on agricultural plants, ornamental trees and shrubs. Their ability to cause latent infections classifies them also as important agents of storage diseases. Symptoms of the diseases, referred to as anthracnose, include dark brown, round, depressed lesions on which acervuli and orange masses of spores are abundantly produced. Reliable pathogen identification and definition of genetic population structure are very important for understanding the etiology of the diseases caused by members of the genus *Colletotrichum*. Identification of *Colletotrichum* species was traditionally based on morphological and cultural characters such

¹ dr., Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, Slovenija

² dr., prav tam

as colony colour and growth rate, size and shape of conidia, presence of setae and occurrence of perithecia. These characteristics were too variable and unstable for reliable species identification and were supplemented with molecular methods. Based on molecular characters, eight molecular groups (A1 to A8) were identified within the population of *C. acutatum*, the major causative agent of anthracnose on fruit trees and small fruits. Three molecular groups were subsequently confirmed as separate species: *C. simmondsii*, *C. fioriniae* and *C. acutatum sensu stricto*. Our research on anthracnose of fruit trees and small fruits in Slovenia was focused on *Colletotrichum* induced diseases of European walnut, high-bush blueberries and strawberries. 86 samples of anthracnose were collected in the years 2008 – 2010. *Colletotrichum* species were isolated and identified using morphological and molecular methods. Seven isolates were identified as *C. simmondsii*, 26 isolates as *C. fioriniae*, while 53 isolates belonged to the molecular group A4 yet undescribed as an autonomous species.

Key words: anthracnose, *Colletotrichum*, Slovenia

1 UVOD

Rod *Colletotrichum* vključuje številne gospodarsko pomembne patogene glive. Bolezenska znamenja, ki jih povzročajo, imenujemo antraknoza in se kažejo kot uleknjene, bolj ali manj okrogle temne pege, na katerih se razvijejo trosišča (acervuli) z oranžnimi skupki trosov. Prizadenejo številne kmetijske rastline, pa tudi gozdno in okrasno drevje ter grmičevje. Okužijo vse nadzemne dele rastlin, do okužbe pa lahko pride med vso rastno dobo. Zmožnost, da povzročijo latentno okužbo te glive uvršča tudi med pomembne povzročiteljice skladiščnih bolezni.

Rod *Colletotrichum* je taksonomsko zelo kompleksen. Opravljenih je bilo več temeljitih revizij (von Arx, 1957; Sutton, 1980; Hyde *et al.*, 2009), vendar število vrst in njihov status še nista dorečena. Na osnovi taksonomskih in filogenetskih raziskav, opravljenih v zadnjih letih, predvidevajo, da rod *Colletotrichum* obsega 66 vrst (Hyde *et al.*, 2009). Zaradi taksonomske negotovosti je identifikacija povzročiteljev bolezni težavna in zahteva uporabo tako molekularnih kot morfoloških tehnik. Razumevanje etiologije bolezni, ki jih povzročajo glive iz rodu *Colletotrichum*, otežuje tudi spoznanje, da patogene glive tega rodu na svojih gostiteljih pogosto žive tudi kot endofiti, epifiti ali saprofiti (Freeman *et al.*, 2001).

Do nedavnega je veljala za najpomembnejšo povzročiteljico antraknoze na sadnem drevju in jagodičevju gliva *C. acutatum*. Prvič je bila najdena v Avstraliji leta 1965. Kasneje so jo zasledili tako rekoč po vsem svetu in na več kot štiridesetih gostiteljih. Povzroča različne bolezni: črno pegavost jagod pri jagodnjaku, sušenje poganjkov in sadno gnilobo pri ameriški borovnici, sušenje poganjkov, defoliacijo in propadanje plodov pri mandlju, gnitje plodov pri jablani, oljki, češnji in citrusih ter druge bolezni. Zaradi velikega gospodarskega pomena so jo v Evropski zvezi uvrstili med karantenske škodljive organizme, pred nekaj leti pa umaknili s seznama zaradi njene vsesplošne razširjenosti v naravnem okolju. V številnih raziskavah ugotavljajo, da je vrsta *C. acutatum* zelo heterogena in je najverjetneje kompleks več različnih vrst. V populaciji glive so identificirali osem molekularnih skupin in jih poimenovali A1 do A8 (Sreenivasaprasad in Talhinas, 2005). Than *et al.* (2008) ter Shivas in Tan (2009) so v taksonomski reviziji vrste *C. acutatum* dve molekularni skupini opisali kot novi vrsti, *C. simmondsii* in *C. fioriniae*, ter opravili epitetifikacijo vrste *C. acutatum sensu stricto*.

V raziskavi antraknoze pri sadnem drevju in jagodičju v Sloveniji smo se osredotočili na bolezni, ki jih glive iz rodu *Colletotrichum* povzročajo pri treh izbranih sadnih vrstah: domačem orehu, ameriški borovnici in jagodnjaku. Antraknoza na domačem orehu je nova bolezen, ki jo opažemo šele v zadnjih letih, bolezen na borovnici in jagodnjaku pa so pri nas

znane že dlje časa in so gospodarsko zelo pomembne. Namen raziskave je bil identificirati povzročitelje bolezni ter raziskati njihovo ekologijo in virulentnost.

2 MATERIAL IN METODE

V letih 2008-2010 smo zbrali 86 vzorcev rastlin z bolezenskimi znamenji, pri katerih smo analizirali pojav gliv iz rodu *Colletotrichum*. Med vzorci so prevladovali primerki jagodnjaka, ameriške borovnice in oreha, vključili pa smo tudi posamezne vzorce iz drugih sadnih vrst ter okrasnih in samoniklih rastlin. Iz okuženega rastlinskega materiala smo izolirali glive po standardnem postopku: obolele rastlinske dele smo površinsko razkužili, izrezali tkivo na robu med zdravim in okuženim in ga prenesli na gojišče PDA z dodanim antibiotikom. Za identifikacijo izolatov smo uporabili mikroskopsko morfološke in molekularne tehnike. Izmerili smo dolžino in širino petdesetih trosov, prirast kolonije na gojišču PDA pri temperaturi 25° C in v temi ter barvo kolonije na zgornji in spodnji strani gojišča. Iz micelija, namnoženega v tekočem gojišču, smo izolirali DNA s komercialnim kompletom BioSprint 15 DNA Plant Kit (Qiagen) in robota KingFisher mL (Thermo). ITS predel ribosomalne DNA smo v verižni reakciji s polimerazo (PCR) namnožili z začetnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4 (White *et al.*, 1990). Dobljenim produktom smo določili nukleotidno zaporedje (Macrogen). Zaporedja smo uredili in primerjali s programskim orodjem BioEdit v. 7.0.5.2 (Hall, 1999). Podobnost zaporedij z drugimi znanimi zaporedji v javnih bazah smo določili z orodjem BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Preverili smo virulentnost izbranih izolatov na različnih sadnih vrstah. Inokulum smo pripravili iz deset dni starih kultur, ki smo jih prelili s sterilno destilirano vodo in postrgali trose s površine kolonije. Testne rastline smo inokulirali s suspenzijo trosov v koncentraciji 1×10^6 konidijev / ml, medtem ko smo kontrolne rastline inokulirali s sterilno destilirano vodo. Po okužbi smo rastline inkubirali pri sobni temperaturi (22-25° C) in 100% relativni zračni vlagi. Jakost okužbe smo ocenili na podlagi velikosti nekroze in jakosti sporulacije oz. pojava micelija na mestu okužbe.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V naši študiji smo na podlagi morfoloških in molekularnih značilnosti določili pripadnost 86 izolatov iz rodu *Colletotrichum*: sedem jih je pripadalo vrsti *C. simmondsii*, 26 vrsti *C. fioriniae*, 53 pa molekularni skupini A4.

Morfološke in ekološke značilnosti ugotovljenih vrst:

- *Colletotrichum simmondsii* R.G. Shivas & Y.P. Tan
Trosi merijo 11,5-13,6 x 3,7-4 µm, so eliptični, brezbarvni, večina je na konceh priostrena. Micelij je bujen, kolonija zgoraj siva, na spodnji strani pa blede rožnata. Gliva povzroča gnitje plodov pri papaji, ličiju, jagodnjaku, mangu, paradižniku, ameriški borovnici, oljki, vinski trti, znana je tudi kot endofit pri kiviju (Shivas in Tan, 2009). Pri nas smo jo ugotovili le na jagodnjaku, kjer povzroča črno pegavost jagod.
- *Colletotrichum fioriniae* (Marcelino & S. Gouli) R.G. Shivas & Y.P. Tan
Trosi merijo 10,7-14,2 x 3,6-4,3 µm, so eliptični, brezbarvni, gladki, na konceh priostreni. Micelij je bujen, kolonija zgoraj siva, na spodnji strani rožnata do izrazito karminsko rdeča pogosto ima izrazite črne pege. Podobno, vendar bolj intenzivno karminsko rdečo barvo imajo izolati vrste *C. acutatum sensu stricto*, ki pa jih v naši raziskavi nismo našli. Po tujih podatkih gliva *C. fioriniae* okuži avokado, mango in akacijo (Shivas in Tan, 2009). Znano je tudi njeno entomopatogeno delovanje; izolirana je bila iz kaparja *Fiorinia externa* (Marcelino *et al.*, 2008). Pri nas so njeni gostitelji domači oreh, ameriška borovnica, gozdna borovnica,

rododendron in druge okrasne vresovke, jablana ter hruška. Povzročča gnilobo plodov, ožige na poganjkih in listih. Kot endofit se pojavlja pri 28 rastlinskih vrstah (Shivas in Tan, 2009).

- Molekularna skupina A4

Trosi merijo 12,7-17,9 x 3,9 -5 µm, so eliptični, brezbarvni, na konceh priostreni. Micelij je manj bujen, kolonija zgoraj blede siva, na spodnji strani blede do intenzivno oranžno obarvana, značilna je obilna sporulacija in variabilnost v barvi. Po tujih podatkih glive iz te skupine okužijo oljko, jagodnjak, nešpljo in rododendron ter kot endofiti živijo na lipah (Sreenivasaprasad in Talhinhos, 2005; Shivas in Tan, 2009). Pri nas smo predstavnike te skupine izolirali iz domačega oreha, leske, gozdne borovnice, mahovnice, kivija in kakija. Povzročajo gnitje plodov in ožige na listih.

Pri vseh 86 izolatih smo določili zaporedje rDNA. Pripadnost vrsti oz. molekularni skupini smo določili na podlagi filogenetskega drevesa, ki je vključevalo zaporedja referenčnih izolatov.

S testi patogenosti smo preverili virulentnost izoliranih gliv na različnih sadnih rastlinah. Čeprav so bile opazne individualne razlike v virulentnosti posameznih izolatov na različnih gostiteljih, pa se vrsti in molekularna skupina niso statistično značilno razlikovale po virulentnosti, ocenjeni na podlagi velikosti nekroze. Umetne okužbe so standardni postopek za preverjanje virulentnosti izolatov, pri katerem uporabljamo visoko koncentracijo inokuluma in optimalne razmere za okužbo in razvoj bolezni. Zanesljivo pokažejo zmožnost izolatov za okužbo, kaže pa, da niso relevantne za ocenjevanje specializacije izolatov na posamezne gostitelje.

4 SKLEPI

V raziskavi antraknoze pri sadnem drevju in jagodičju v Sloveniji smo ugotovili, da bolezen povzročajo tri glive iz rodu *Colletotrichum*: *C. simmondsii*, *C. fioirinae* in molekularna skupina A4, ki formalno še ni opisana kot samostojna vrsta. Najbolj pogosta povzročiteljica antraknoze je bila molekularna skupina A4. Večina povzročiteljev antraknoze na domačem orehu, ki smo ji v raziskavi posvetili posebno pozornost, je pripadala tej skupini. Vrsta *C. fioirinae* je prevladovala med izolati iz ameriških borovnic. Izolirali smo jo še iz domačega oreha in drugih sadnih vrst (jablana, hruška, leska) ter različnih okrasnih rastlin. Z vidika vrstne sestave gostiteljskih rastlin je bila ta gliva bolj heterogena kot drugi dve. Vrsta *C. simmondsii* je glavna povzročiteljica črne pegavosti jagod. V naših razmerah ta gliva okuži le jagodnjak; na drugih sadnih vrstah je nismo ugotovili.

5 ZAHVALA

Ciljni raziskovalni projekt V4-0528 Antraknoza pri sadnem drevju in jagodičju: značilnosti povzročiteljev, epidemiologija bolezni in možnosti okolju sprejemljivejših načinov varstva sta financirala ARRS in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS.

6 LITERATURA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-402.
- Arx, J.A. von 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Zeitschrift*, 29: 414-468.
- Freeman, S., Horowitz, S., Sharon, A. 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology*, 91: 986-992.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser, 41: 95-8.
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., et al. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity, 39: 147-182.
- Marcelino, J.A.P., Giordano, R., Gouli, S., Gouli, V., Parker, B.L., Skinner, M., TeBeest, D., Cesnik, R. 2008. *Colletotrichum acutatum* var. *fioriniae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *fioriniae* var. nov.) infection of a scale insect. Mycologia, 100: 353-374.
- Shivas, R.G., Tan, Y.P. 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et. stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. Fungal Diversity, 39: 111-122.
- Sreenivasaprasad, S., Talhinas, P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular and plant pathology, 6: 361–378.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. V: Bailey J.A., Jeger M.J. (ur.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford: 1-26.
- Than, P.P., Shivas, R.G., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T.S., Taylor, P.W.J., Hyde, K.D. 2008. Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. Fungal Diversity, 28: 97-108.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: Innis, Gelfand, Sninsky, White (ur). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Academic Press: 315-322.