

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA GLIVE *Phoma exigua* var. *foveata* (Foister) Boerema, POVZROČITELJICE GANGRENE KROMPIRJEVIH GOMOLJEV

Alenka MUNDA¹

Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

Gangrena krompirjevih gomoljev je ena najnevarnejših skladiščnih boleznih krompirja. Razširjena je v številnih evropskih državah. Njen gospodarski pomen je večji v severnih deželah, kjer povzroči velike izgube pridelka zaradi gnitja uskladiščenih gomoljev. Poglavitna povzročiteljica bolezni je gliva *Phoma exigua* var. *foveata*. Okuži predvsem krompir, le redko tudi druge gostitelje. Na lupini okuženih gomoljev se pojavijo uglobljene nekrotične pege, najpogosteje okrog oči, lenticel in na poškodovanih mestih. V hladnih in suhih razmerah gomolji v notranjosti zgnijejo. Podobna bolezenska znamenja povzroča tudi gliva *Phoma exigua* var. *exigua*. Slednja je zelo razširjena talna gliva, ima številne gostitelje in je manj patogena kot var. *foveata*. Obe varieteti sta si po morfologiji zelo podobni in ju ne moremo zanesljivo razlikovati po značilnostih piknidijev in piknospor. Za njuno identifikacijo so poleg analize morfoloških značilnosti potrebni še biokemični testi.

Ključne besede: gangrena krompirjevih gomoljev, identifikacija, *Phoma exigua* var. *foveata*

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Phoma exigua* var. *foveata* (Foister) Boerema - THE CAUSATIVE AGENT OF POTATO GANGRENE

Gangrene is an important storage disease of potato tubers. It causes significant losses due to the internal decay of the tissue. Gangrene has been reported from many European countries, being of the greatest economic importance in northern temperate countries. The disease is primarily caused by *Phoma exigua* var. *foveata*, although it can be caused by either of the two varieties of *Phoma exigua* Desm., i.e. var. *foveata* or var. *exigua* respectively. *P. exigua* var. *exigua* is a common soil inhabitant. It has a wide host range and is less pathogenic than var. *foveata*. *P. exigua* var. *foveata* affects mainly potato and causes sunken lesions in tuber skin which typically develop at wound sites, eyes or lenticels. Internal rotting of tubers can be extensive and rapid, especially in cool and dry environment. The two varieties of *P. exigua* causing potato gangrene have similar morphology and can not be readily distinguished by morphological characteristics of pycnidia and pycnidiospores. Different biochemical tests are used to differentiate between them.

Key words: gangrene, identification, potato, *Phoma exigua* var. *foveata*

1 UVOD

Spomladi leta 2002 smo prejeli v pregled inšpekcijski vzorec semenskega krompirja z bolezenskimi znamenji, ki so spominjala na gangreno krompirjevih gomoljev. Okuženi gomolji so imeli na površini temne plitve vdrtine, meso v notranjosti gomolja je bilo gnilo, pojavljale so se votline različnih velikosti in oblik, ki so bile ostro omejene od zdravega tkiva.

Gangrena krompirjevih gomoljev je nevarna skladiščna bolezen krompirja. Prvič so jo ugotovili na Škotskem leta 1936. Razširjena je v številnih srednje- in severnoevropskih državah. Njen gospodarski pomen je večji v severnih deželah, kjer povzroči velike izgube

¹ dr., univ. dipl. inž. agr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

pridelka zaradi gnitja uskladiščenih gomoljev. Pri nas je bolezen sicer znana, vendar se redko pojavi.

Bolezen se razširja predvsem s semenskimi gomolji, ki so na videz zdravi, a imajo skrito (latentno) okužbo. Med rastno dobo so bolezenska znamenja neizrazita. Opaznejša postanejo šele proti koncu rasti, ko se na spodnjem delu stebela, zlasti pri stiku stebela in listnih pecljev, pojavijo rjave pege in na njih skupine piknidijev. Gomolji se okužijo skozi lenticеле in rane, vendar gliva vse do spravila ostane v latentnem stanju v peridermu. Njen nadaljnji razvoj spodbudijo mehanske poškodbe, ki nastanejo med spravilom in dodelavo, ter skladiščenje v hladnem in suhem okolju (2 – 6 °C) (Croke, Logan, 1982). V takih razmerah nastanejo na lupini temne pege, po velikosti in obliki podobne odtisu palca. Najbolj pogoste so ob lenticelah, očeh in ranah.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Izolacija povzročitelja bolezni

Krompirjeve gomolje smo površinsko razkužili, na meji med zdravim in gnilim mesom izrezali majhne koščke okuženega tkiva in jih brez razkuževanja prenesli na gojišče. Uporabili smo tri standardna trdna gojišča: krompirjev dekstrozni agar (PDA), sladni (MA) in ovseni agar (OA). Izolate smo prvi teden gojili v temi, pri temperaturi 22⁰ C, nato pa menjaje na svetlobi in temi. Koščke micelija smo prenesli še v petrijevke s sterilno destilirano vodo. Tako so se trosišča oblikovala hitreje, laže pa smo tudi opazovali njihove morfološke značilnosti.

2.2 Identifikacija povzročitelja bolezni

2.2.1 Analiza morfoloških značilnosti

Opazovali in merili smo naslednje morfološke značilnosti: velikost, obliko in barvo trosišč (piknidijev), število ustij (ostiolum), njihovo obliko in položaj na trosišču, obliko konidiogenih celic, velikost in obliko trosov, premer kolonije po sedmih dneh rasti na ovsenem agarju, v temi in pri temperaturi 22⁰ C, barvo micelija, navzočnost klamidospore, obliko roba kolonije.

2.2.2 Biokemični testi

Opravili smo dva testa:

- Test z NaOH (Logan, Khan, 1969): kapljico koncentriranega NaOH smo dali na rob kolonije na sladnem agarju ter po 10 in 60 minutah opazovali spremembo barve kolonije. S testom odkrijemo t. i. metabolit E, ki pri dodatku NaOH oksidira v pigmenta α in β . Oksidacija metabolita E je postopna in jo spremlja barvna reakcija: sprva se micelij obarva zeleno (pigment α) in nato rdeče (pigment β).
- Amonijev test (Logan, Khan, 1969): micelij glive na sladnem agarju smo za nekaj sekund izpostavili amonijevim hlapom in po desetih minutah opazovali spremembo barve gojišča. S testom odkrijemo antrakinsonske pigmente, ki v amonijevih hlapih spremenijo barvo iz rumeno zelene v rdečo.

2.2.3 Paritveni test

Izolate iz krompirjevih gomoljev z znamenji gangrene smo presadili skupaj z referenčnim izolatom glive *P. exigua* var. *exigua* na gojišče iz sladnega agarja, v sredino petrijevke s premerom 9 cm, 1 – 2 cm narazen. Referenčni izolat glive *P. exigua* var. *exigua* smo dobili iz Central Science Laboratory (CSL) v Veliki Britaniji. Po desetih dneh smo ocenili, ali sta izolata kompatibilna (se zrasteta v enotno kolonijo) ali inkompatibilna (med njima nastane izrazita pregrada).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Morfološke značilnosti izolirane glive

Na ovsenem agarju je micelij belo siv s svetlejším robom, s starostjo postane temneje siv, prirašča enakomerno, brez izrazitih prirastnih con, do 70 mm na teden. Kolonija je enotnega videza, rob ni valovit. Klamidospor ni. Pri starejših kulturah so na spodnji strani opazni rumeno rjavi kristali. Pod zračnim micelijem se po dveh tednih razvijejo piknidiji. So rjavi do črni, unilokularni, različnih oblik in velikosti (premer 90 – 200 μm) in deloma vrasli v agar. So okrogli in brez izrastkov, posamični ali v skupinah, imajo neizrazito ustje (ostiolum), ki je nameščeno centralno. Trosi (piknospore) so brezbarvni, različnih velikosti (5 - 10 x 2,5- 3,5 μm), večinoma ovalni, enocelični, izjemoma tudi dvocelični. Delež predeljenih trosov je zelo različen in odvisen od razmer v okolju; v laboratorijskih razmerah so trosi večinoma enocelični. Pri nekaterih trosih opazimo dve ali več drobnih oljnih kapljic. Trosi se izločijo skozi ustje piknidija v nitasti želatinasti gmoti umazano bele barve.

Na osnovi morfoloških značilnosti, zastopanosti antrakinonskih barvil in inkompatibilnosti z referenčnim izolatom glive *P. exigua* var. *exigua* (na stičišču kolonij se je oblikovala izrazita, rahlo vijolična razmejitvena pregrada), smo sklepali, da izolati pripadajo vrsti *P. exigua* var. *foveata*.

3.2 Povzročitelji gangrene krompirjevih gomoljev

Glivo, ki povzroča gangreno krompirjevih gomoljev, je leta 1940 opisal Foister in jo imenoval *Phoma foveata*. Kasneje se je uveljavilo tudi ime *Phoma solanicola* f. *foveata* (Foister) Malcolmson. Boerema je leta 1967 ugotovil, da gliva ni samostojna vrsta, marveč različica vrste *Phoma exigua* Desm. in jo je poimenoval *Phoma exigua* var. *foveata* (Foister) Boerema.

Po novejših taksonomskih raziskavah je rod *Phoma* razdeljen v več sekcij. Gliva *P. exigua* sodi v sekcijo *Phyllostictoides* in je njena tipska vrsta (Aa et al., 2000). Obravnavajo jo kot zbirna vrsto s številnimi varietetami, ki so specializirane na različne gostitelje (Boerema, Höweler, 1967). Od srede 19. stoletja so glivo večkrat na novo opisali, zlasti kadar so odkrili novega gostitelja. Tako je danes znanih več kot 250 sinonimov, ki so jih na osnovi Saccardovega sistema uvrstili v rodove *Phyllosticta*, *Ascochyta* in *Phoma* (Aa et al., 2000; Boerema, Höweler, 1967). Na krompirju se pojavljata dve varieteti glive *P. exigua*: *exigua* in *foveata* (Boerema, 1976). Obe povzročata gangreno krompirjevih gomoljev, razlikujeta pa se po virulentnosti in ekoloških lastnosti in sta med seboj tudi inkompatibilni. Varieteta *exigua* zajeda številne rastlinske vrste in kot gniloživka naseljuje in razkraja odmrle rastlinske dele. Ima številne gostitelje (znanih je več kot 200 rastlinskih vrst iz 74 rodov) pri katerih povzroča različna bolezenska znamenja, od listne pegavosti, nekroz na stebli in koreninah, gnitja korenin in gomoljev do propadanja celih rastlin (Boerema, Höweler, 1967). Okuži oslabele rastline, najpogosteje skozi rane. Na krompirju povzroča manj izrazita bolezenska znamenja in manjši obseg gnilobe kot varieteta *foveata*. Slednja okuži skoraj izključno krompir, le izjemoma naseljuje tudi plevele, ki rastejo na krompirišču, npr. *Chenopodium* sp. (Fox, Dashwood, 1972). Razlikovanje med varietetama ni zgolj akademskega pomena, saj je varieteta *foveata* veliko pogostejša in nevarnejša povzročiteljica gangrene krompirjevih gomoljev in je bila zato do nedavnega uvrščena na listo karantenskih škodljivih organizmov.

Razpredelnica 1: Morfološke značilnosti vrst *P. exigua* var. *exigua* in *P. exigua* var. *foveata*

<i>Phoma exigua</i>	barva kolonije	rob kolonije	prirast micelija (7 dni, OA, 22 ⁰ C)	velikost trosov (µm)
var. <i>exigua</i>	spremenljiva, belo siva do črna	valovit	20 - 85 mm	2,5 - 12 x 1,5 - 5
var. <i>foveata</i>	belo siva	raven	55 - 75 mm	5,5 - 10 x 2,5 - 3,5

Po morfoloških značilnostih piknidijev in piknospor ne moremo razlikovati med varietetama *exigua* in *foveata*. Tudi oblika in barva čiste kulture ne zadoščata za njuno identifikacijo, saj sta zelo spremenljivi in odvisni od gojitvenih razmer. Za zanesljivo identifikacijo moramo opraviti biokemične teste, s katerimi odkrijemo specifične metabolite. Boerema in Höweler (1967) sta ugotovila, da večina varietet glive *P. exigua*, pa tudi nekatere druge vrste rodu *Phoma*, tvorijo t. i. metabolit E. Ta ima baktericidne in fungicidne lastnosti in ga imenujejo tudi antibiotik E (Logan, O'Neill, 1970). Varieteta *exigua* ga ima vedno, pri varieteti *foveata* pa se pojavi redko, pogosteje pri izolatih, ki so bolj virulentni (Logan, Woodward, 1971). V našem primeru metabolita E nismo odkrili. Med pomembnimi diagnostičnimi značilnostmi glive *P. exigua* var. *foveata* je tudi izločanje pigmentov iz skupine antrakinonov (pahibazin, krizofanol, emodin, fomarini in drugi) (Bick, Rhee, 1966). Teh pri vrsti *P. exigua* var. *exigua* ne najdemo. Antrakinonska barvila v kislem okolju obarvajo gojišče rumeno zeleno, v bazičnem pa rdeče. Pri starejših kolonijah se izločijo v obliki rumeno rjavih kristalov. Pigmente iz skupine antrakinonov lahko odkrijemo tudi s tankoplastno kromatografijo (Mosch, Mooi, 1975). Pri tem uporabimo ekstrakt iz čiste kulture glive ali kar iz gnilih gomoljev, kar je pri diagnostičnem delu še posebej pomembno, saj omogoča hitro in zanesljivo identifikacijo povzročitelja bolezni.

3.3 Razlikovanje od drugih povzročiteljev gnitja krompirjevih gomoljev

Bolezenska znamenja, ki so značilna za gangreno krompirjevih gomoljev, so na prvi pogled podobna poškodbam, ki jih povzročajo glive iz rodu *Fusarium*. Tudi pri teh se na površini gomoljev pojavljajo vdrtine, za razliko od gangrene pa je kožica nagubana v značilnih koncentričnih gubah, na katerih so skupki micelija in trosov. Okuženo tkivo v notranjosti gomolja je rjavo, pojavljajo se votline, ki jih obrašča micelij z značilnimi trosi.

V toplejših območjih lahko povzroči gnitje gomoljev pri krompirju tudi gliva *Macrophomina phaseoli*. Po okužbi se pojavijo črni madeži okrog lenticel in oči. Okuženo meso je sivorjavo in črno obrobljeno na prehodu do zdravega tkiva, votline v notranjosti gomolja pa zapolnjujejo črn micelij in sklerociji.

Pravega povzročitelja bolezni lahko zanesljivo prepoznamo le z laboratorijskim pregledom.

4 LITERATURA

- Aa, H. A. van der, Boerema, G. H., Gruyter, J. de, 2000. Contributions towards a monograph of *Phoma* (*Coelomyces*) VI -1. Section *Phyllostictoides*: Characteristics and nomenclature of its type species *Phoma exigua*. *Persoonia*, 17: 435-456.
- Bick, I R. C., Rhee, C., 1966. Anthraquinone pigments from *Phoma foveata* Foister. *Biochemical Journal*, 98: 112 - 116.

- Boerema, G. H., 1967. The *Phoma* organisms causing gangrene of potatoes. Neth. J. Pl. Path., 73: 190 - 192.
- Boerema, G. H., 1976. The *Phoma* species studied in culture by Dr. R. W. G. Dennis. Trans. Br. Mycol. Soc., 67: 289 - 319.
- Boerema, G. H., Höweler, L. H., 1967. *Phoma exigua* Desm. and its varieties. Persoonia, 5: 15 – 28.
- Croke, F., Logan, C., 1982. The effect of humidity on potato gangrene development in naturally contaminated tubers. Plant Pathology, 31, 61 - 64.
- Foister, C. E., 1940. Descriptions of new fungi causing economic diseases in Scotland. Transactions and Proceedings of the Botanical society of Edinburgh, 33, 65 - 68.
- Fox, R. A., Dashwood, E. P., 1972. Potato gangrene. Scottish Agriculture, 51: 372 - 376.
- Logan, C., Khan, A. A., 1969. Comparative studies of *Phoma* spp. associated with potato gangrene in Northern Ireland. Trans. Br. Mycol. Soc., 52: 9 - 17.
- Logan, C., O'Neill, R., 1970. Production of an antibiotic by *Phoma exigua*. Transactions of the British Mycological Society, 55, 67 - 75.
- Logan, C., Woodward, J. R., 1971. Pathogenicity differences within *Phoma exigua* var. *foveata*. Record of Agricultural Research, 19, 27 – 31.
- Mosch, W. H. M., Mooi, J. C., 1975. A chemical method to identify tuber rot in potato caused by *Phoma exigua* var. *foveata*. Neth. J. Pl. Path., 81: 86 - 88.