

Utvrđivanje prisustva *Colletotrichum acutatum* u latentno zaraženom lišću i lisnim drškama jagode

Nataša Duduk¹, Mirko Ivanović¹ i Bojan Duduk²

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 11080 Beograd, Nemanjina 6, Srbija
(natasadukic@yahoo.com)

²Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, 11080 Beograd, Banatska 31b, Srbija

REZIME

Colletotrichum acutatum je najznačajniji prouzročivač antraknoznog propadanja plodova jagode. Pored nekrotrofnog načina parazitiranja, deo svog životnog ciklusa može da provede kao epifit i to u vidu latentnih zaraza. Prisustvo gljive na asimptomatičnom biljnom tkivu smatra se jednim od glavnih načina širenja ovog ekonomski štetnog patogena u svetu. Ispitivanja latentne zaraze *C. acutatum* urađena su na veštački inokulisanim jagodama. Iniciranje sporulacije gljive na asimptomatičnim lisnim drškama i lišću urađeno je izlaganjem biljnog tkiva delovanju herbicida parakvata, kao i niskim temperaturama, koji na različite načine izazivaju propadanje biljnog tkiva. Izlaganju asimptomatičnih biljnih delova delovanju parakvata (0,25%), prethodila je površinska sterilizacija 0,5% NaOCl. Postupak smrzavanja urađen je izlaganjem biljnih delova temperaturi od -20°C u trajanju od 2 h. Posle smrzavanja jedna grupa je isprana Tween 20 (18 µl/l), a druga grupa je površinski sterilisana 0,0525% NaOCl uz dodatak Tween 20 (18 µl/l). Posle šest dana inkubacije, pojava acervula i konidija detektovana je u 93,33% do 100% lisnih delova izloženih delovanju parakvata ili postupcima smrzavanja. U inokulisanim biljnim delovima koji nisu izlagani delovanju herbicida ili niskih temperatura, sporulacija je detektovana kod 3,33% testiranih lisnih drški, odnosno 6,67% lišća.

Ključne reči: *Colletotrichum acutatum*; jagoda; latentna zaraza; parakvat; smrzavanje

UVOD

Antraknoza jagode, čiji su prouzročivači gljive iz roda *Colletotrichum* ekonomski su štetna oboljenja jagode širom sveta. Antraknozu jagode mogu izazvati *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (teleomorf *Glomerella acutata* Guerber Correll), *C. fraga-*

riae Brooks i *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. (teleomorf *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Shrenk) (Smith i Black, 1990; Peres i sar., 2005). U Evropi se *C. acutatum* izdvaja kao najznačajniji prouzročivač antraknoze jagode, dok je pojava *C. gloeosporioides* ređa, a za sada *C. fragariae* još uvek nije utvrđen (Denoyes i Baundry, 1995). Ispitivanjima propadanja



Slika 1. *C. acutatum*: antraknoza ploda jagode
Figure 1. *C. acutatum*: anthracnose fruit rot

jagode u Srbiji tokom 2004. godine utvrđena je pojava antraknoze jagode, čiji su prouzrokovatori bili *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (Ivanović i sar., 2005).

C. acutatum je najznačajniji prouzročivač antraknoze plodova jagode, izazivajući pojavu ulegnutih pega koje se šire i spajaju, dovodeći do truleži i potpunog propadanja plodova (fruit rot) (Slika 1). Osim na plodovima, patogen izaziva i pojavu tamnih pega na cvetovima, lišću, lisnim drškama, a u toplijim krajevima i propadanje korena jagode (Peres i sar., 2005). Zbog izrazite destruktivnosti *C. acutatum* se nalazi na A2 listi karantinski štetnih organizama za Srbiju (Službeni glasnik RS, 2008).

Pored pojave karakterističnih simptoma, gljiva može biti prisutna na jagodi i bez vidljivih simptoma oboljenja, u vidu latentne zaraze. *C. acutatum* se u latentnoj zarazi može održati više od nekoliko nedelja na asimptomatičnom lišću jagode (Leandro i sar., 2003) i korovskim biljkama (Freeman i sar., 2001), što predstavlja značajan izvor inokuluma za jagodu. Pojava latentnih zaraza na sadnom materijalu jagode smatra se jednim od glavnih načina širenja ovog patogena u svetu (Sreenivasaprasad i sar., 1996; OEEP/EPP0, 2004).

U cilju sprečavanja unošenja i širenja ovog ekonomski važnog patogena u našu zemlju, kao i razvijanja pogodnih i puzdanih metoda detekcije, ispitivani su različiti postupci utvrđivanja prisustva gljive u asimptomatičnom tkivu jagode.

MATERIJAL I METODE

Veštačke inokulacije jagode

Za utvrđivanje latentne zaraze jagode korišćene su jagode sorte Medlin. Inokulacija jagoda je urađena izola-

tom GG JUP poreklom iz Srbije (Ivanović i sar., 2005). Gljiva je gajena na krompir dekstroznoj podlozi na temperaturi od 25°C i konstantnom osvetljenju. Posle sedam dana, suspenzija spora za inokulaciju pripremljena je dodavanjem 9 ml sterilne destilovane vode u petri-kutiju. Micelija gljive je struganjem skalpelom skinuta sa podloge, profiltrirana i koncentracija spora je određena hemocitometrom. Za inokulaciju korišćena je suspenzija konidija koncentracije 5×10^4 konidija/ml. Inokulacija je urađena prskanjem biljaka jagode, zasađenih u plastične saksije prečnika 15 cm, suspenzijom spora, ručnom prskalicom do početka slivanja sa biljnih delova. Biljke su držane u vlažnim uslovima (pod plastičnim kesama) 72 h, posle čega su gajene u uslovima staklenika. Prisustvo gljive na asimptomatičnim biljnim delovima: lisnim drškama i lišću jagode, ispitivano je 14 dana posle inokulacije.

Iniciranje sporulacije gljive i detekcija prisustva patogena u biljnom materijalu

Iniciranje sporulacije gljive na asimptomatičnim lisnim drškama i lišću rađeno je primenom herbicida parakvata i smrzavanjem biljnog tkiva. Za svaki tretman korišćeno je po 30 listova i 30 lisnih drški, podeljenih u po tri ponavljanja od 10. Lišće i lisne drške ispitivane su posebno.

Inokulisane asimptomatične lisne drške i lišće isprani su radi odstranjivanja nečistoće, površinski sterilisane 4 min. 0,5% rastvorom natrijum-hipohlorita (NaOCl) i isprane dva puta u sterilnoj destilovanoj vodi. Biljni materijal je zatim potopljen 1 minut u 0,25% rastvor parakvata (Gramoxone, Syngenta) i potom ispran u destilovanoj vodi. Tretirane lisne drške i lišće jagode inkubirane su u vlažnim uslovima, na 25°C pri konstantnom svetlu 6 dana.

Iniciranje sporulacije gljive urađeno je i postupkom smrzavanja. Inokulisane lisne drške, odnosno lišće jagode, izloženi su temperaturi -20°C u trajanju od 2 h. Jedna grupa (Ia) isprana je sterilnom destilovanom vodom uz dodatak Tween 20 (18 µl/l) 1 minut, a druga grupa (Ib) je površinski sterilisana sa 0,0525% NaOCl uz dodatak Tween 20 (18 µl/l) u trajanju 1 minut. Biljni materijal je potom osušen i postavljen u vlažne uslove. Lisne drške i lišće su inkubirane kao i kod postupka izlaganja parakvatu. Kontrolna grupa (K) inokulisanih lisnih drški i lišća, isprana sterilnom destilovanom vodom uz dodatak Tween 20 (18 µl/l) 1 minut, osušena je i inkubirana pod navedenim uslovima. Sporulacija, prisustvo acervula i konidija na biljnim delovima jago-

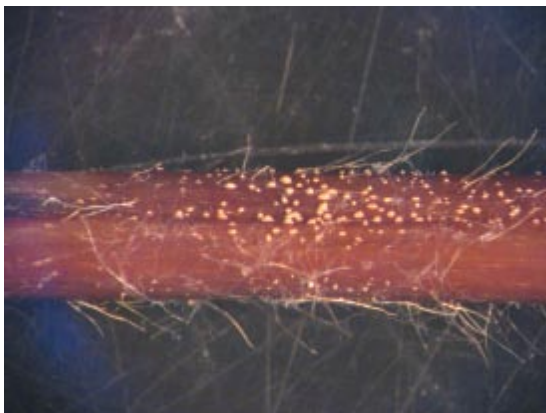
de posmatrano je mikroskopiranjem pod svetlosnim mikroskopom.

Broj lisnih drški i liski na kojima je utvrđeno prisustvo spora *C. acutatum* u svakom tretmanu prikazan je procentualno. Dobijeni podaci (%/100), su transformisani kroz arkus sinus kvadratni koren (arcsine square root) i analizirani primenom One-Way ANOVA (STATGRAPHICS Centurion, StatPoint, 2005). Višestruko poređenje sredina urađeno je F testom i određivanjem najmanje značajne razlike (LSD) između različitih metoda iniciranja sporulacije gljive.

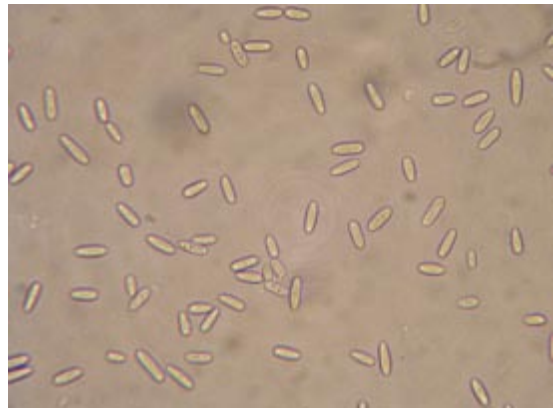
REZULTATI

Prisustvo *C. acutatum* na asimptomatičnim lisnim drškama jagode

Nakon tretiranja parakvatom i smrzavanja, na inokulisanim lisnim drškama uočena je sporulacija gljive pojavom acervula i mase konidija žuto-narandžaste boje (Slika 2). Mikroskopiranjem acervula ustanovljena je pojava konidija zašiljenih na jednom kraju i veličina koje su odgovarale konidijama *C. acutatum* (Slika 3). Sporulacija je zabeležena kod 100% lisnih drški tretiranih parakvatom, 96,67% lisnih drški tretiranih smrzavanjem (Ia) i 96,67% tretiranih smrzavanjem i potom sterilisanih 0,0525% NaOCl (Ib). Kod inokulisanih lisnih drški koje nisu tretirane nijednom od navedenih metoda, pojava acervula i mase konidija zabeležena je kod 3,33% lisnih drški. Statističkom analizom utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih metoda iniciranja sporulacije gljive u asimptomatičnim lisnim drškama sa verovat-



Slika 2. Sporulacija *C. acutatum* na lisnim drškama jagode
Figure 2. Sporulation of *C. acutatum* on strawberry petioles



Slika 3. Konidije *C. acutatum*
Figure 3. *C. acutatum* conidia

noćom od 95%. Višestrukim poređenjem sredina tretmana i određivanjem najmanje značajne razlike ustanovljeno je da nema statistički značajnog variranja između tretmana sa parakvatom i ostale dve primenjene metoda stimulanja sporulacije bazirane na smrzavanju biljnog tkiva. Značajno variranje ustanovljeno je samo u odnosu na kontrolnu grupu inokulisanih lisnih drški koje nisu tretirane nijednim od navedenih postupaka (Tabela 1).

Prisustvo *C. acutatum* na asimptomatičnom lišću jagode

U ispitivanom asimptomatičnom lišću sakupljenom sa inokulisanih biljaka, primenom parakvat testa i dva postupka smrzavanja, posle inkubacije uočena je pojava acervula (Slika 4) i konidija *C. acutatum*. Pojava acervula i konidija zabeležena je kod 96,67% listova tretiranih parakvatom, 93,33% listova tretiranih smrzavanjem (Ia) i 96,67% tretiranih smrzavanjem i potom sterilisanih 0,0525% NaOCl (Ib). Kod kontrolne grupe inokulisanih listova, koji nisu tretirani nijednom od navedenih metoda, sporulacija je zabeležena kod 6,67%. Statističkom analizom dobijenih rezultata utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između primenjenih postupaka stimulacije sporulacije gljive u asimptomatičnom lišću jagode. Na osnovu statističke analize najmanje značajnih razlika utvrđeno je da nema razlike (sa verovatnoćom od 95%) između stimulanja sporulacije primenom parakvata i smrzavanja. Statistički značajna razlika ustanovljena je samo u odnosu na kontrolnu grupu listova koji nisu tretirani nijednim od navedenih postupaka (Tabela 1).

Tabela 1. Procenat detekcije *C. acutatum* na inokulisanim asimptomatičnim lisnim drškama i lišću jagode primenom različitih postupaka iniciranja sporulacije gljive**Table 1.** Frequency of detection of *C. acutatum* on inoculated symptomless strawberry petioles and leaves using different methods of initiation of fungus sporulation

Tretman – Treatment*	Lisne drške – Petioles	Lišće – Leaves
Parakvat	100a**	96,67a
Ia	96,67a	93,33a
Ib	96,67a	96,67a
K	3,33b	6,67b

*Parakvat – 0,5% NaOCl 4 min., ispiranje, 0,25% parakvat 1 min., ispiranje; Ia – smrzavanje (-20°C) 2h, ispiranje Tween 20 (18 µ/l) 1 min., sušenje; Ib – smrzavanje(-20°C) 2h, 0,05% NaOCl sa Tween 20 (18 µ/l) 1 min., sušenje; K – ispiranje Tween 20 (18 µ/l) 1 min., sušenje

*Paraquat – 0.5% NaOCl 4 min, rinse, 0.25% paraquat 1 min, rinse; Ia – freeze (-20°C) 2h, rinse Tween 20 (18 µ/l) 1 min, drying; Ib – freeze (-20°C) 2h, 0.05% NaOCl with Tween 20 (18 µ/l) 1 min, drying; K – rinse Tween 20 (18 µ/l) 1 min, drying

**Srednje vrednosti označene istim slovom nemaju statistički značajnu razliku na osnovu F testa praćenog utvrđivanjem najmanje značajne razlike ($P \leq 0,05$)

*Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to a F protected least significant difference test ($P \leq 0,05$)

**Slika 4.** Sporulacija *C. acutatum* na lišću jagode**Figure 4.** Sporulation of *C. acutatum* on strawberry leaves

DISKUSIJA

Zbog ekonomskog značaja koji *C. acutatum* ima u proizvodnji jagode, kontrola unošenja i širenja ovog patogena je veoma značajna. Posebnu pažnju treba usmeriti na pregled sadnog materijala koji se koristi za podizanje zasada, s obzirom na rasprostranjenost oboljenja i u zemljama iz kojih se sadni materijal uvozi.

C. acutatum može biti prisutna na biljnom tkivu jagode i bez vidljivih simptoma zaraze. Latentna zaraza utvrđena je na skoro svim biljnim delovima jagode, uključujući lisne drške, lišće i stolone (Leandro i sar., 2001; Peres i sar., 2005). *C. acutatum* se održava na asimptomatičnim biljkama sekundarnim konidijama i apresorijama (Leandro i sar., 2001). Freeman i sar.

(2001) uvdili su epifitni i endofitni razvoj gljive u veštački inokulisanim biljkama. Latentna zaraza predstavlja vid prilagođavanja gljive na preživljavanje u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine. U latentnoj formi *C. acutatum* se može održavati ne samo u jagodi, nego i na drugim biljkama koje nisu njeni prirodni domaćini (Freeman i sar., 2001). Latentna zaraza smatra se jednim od najviših stepena parazitiranja, s obzirom da biljka domaćin i patogen egzistiraju zajedno, a da pri tome patogen izaziva jako male promene svoga domaćina. Gljive roda *Colletotrichum* se odlikuju sposobnošću da na biljkama izazivaju latentnu zarazu, i ova osobina je više uslovljena patogenom nego domaćinom (Sinclair, 1991).

Pojava karakterističnih simptoma na jagodi nastaje prelaskom gljive na nekrotrofnu fazu parazitiranja, i to je uslovljeno većim brojem faktora, kao što su temperatura, vlažnost i uticaj biljke domaćina (Leandro i sar., 2003, 2003a; Peres i sar., 2005). Nastankom povoljnih uslova spoljašnje sredine gljiva ostvaruje sekundarne zaraze i zaražava ostale delove biljke, posebno plodove na kojima dovodi do pojave antraknoznih pega i propadanja.

Za utvrđivanje latentne zaraze fitopatogenih gljiva mogu se koristiti različite metode. Primena herbicida, koji dovode do izumiranja biljnog tkiva, podstiče sporulaciju patogena na asimptomatičnom biljnom tkivu. Parakvat je prvi put primenjen za utvrđivanje latentne zaraze mahuna i stabla soje patogenima *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis phaseoli* i *Cercospora kikuchii* (Cerkauskas i sar., 1980). Iniciranje sporulacije prime-

nom parakvata primenjeno je za utvrđivanje *Alternaria alternata* na jabuci, kao i drugih patogena koji izazivaju oboljenja tokom čuvanja i skladištenja jabuke (Biggs, 1995). Iniciranje sporulacije *C. acutatum* na jagodi primenom parakvata je metoda za utvrđivanja prisustva gljive u asimptomatičnim lisnim drškama (OEPP0/EPP0, 2004). Preliminarna ispitivanja iniciranja sporulacije primenom parakvata potvrdila su prisustvo patogena na veštački inokulisanim asimptomatičnim lisnim drškama jagode (Duduk i Ivanović, 2008). Ovom metodom ustanovljeno je da se gljive iz roda *Colletotrichum* mogu održavati i na korovskim biljkama u latentnoj zarazi (Sinclair, 1991; Freeman i sar., 2001).

U sprovedenim ispitivanjima parakvat tretman korišćen je kao referentni postupak za utvrđivanje prisustva gljive na veštački inokulisanim jagodama. Njegovom primenom utvrđeno je prisustvo *C. acutatum* u 96,67% ispitivanih lisnih drški. Takođe, iako je u preporukama o pregledu sadnog materijala jagode utvrđivanje latentne zaraze zasnovano na iniciranju sporulacije na lisnim drškama (OEPP0/EPP0, 2004), *C. acutatum* može biti prisutan u latentnoj zarazi i na lišću jagode. Latentna zaraza lišća jagode ima veliki značaj u epidemiologiji oboljenja i smatra se važnim izvorom infekcija za plodove (Leandro i sar., 2001). Iz tog razloga ispitivano je prisustvo patogena i u asimptomatičnom inokulisanom lišću jagode, tretiranjem parakvatom. Primenom parakvata *C. acutatum* je detektovan na 96,67% inokulisanih asimptomatičnih listova.

Izrazita toksičnost parakvata otvorila je potrebu za razvijanjem novih postupaka koji će izazivanjem propadanja biljnog tkiva podstaknuti sporulaciju prisutnih gljiva. Tako se postupak smrzavanja biljnog tkiva pokazao kao veoma efikasan za detekciju latentnih zaraza *Monilinia fructicola* na zelenim plodovima koštice voća (Luo i Michailides, 2001). Za utvrđivanje latentne zaraze *C. acutatum*, smrzavanje je korišćeno na asimptomatičnom lišću jagode u cilju praćenja održavanja patogena i epidemioloških istraživanja oboljenja prouzrokovanog gljivom (Leandro i sar., 2001). Mertely i Legard (2004) ispitivali su mogućnost primene smrzavanja u cilju detekcije latentne zaraze lisnih drški jagode gljivama roda *Colletotrichum*.

U cilju ispitivanja i drugih metoda za detekciju *C. acutatum* na asimptomatičnim biljnom tkivu jagode, u ovom radu primenjena su dva postupka smrzavanja. Primenom smrzavanja lisnih drški i površinske sterilizacije (Ib), kao i smrzavanja bez sterilizacije (Ia), prisustvo patogena detektovano je u 96,67%. U odnosu na lisne drške tretirane parakvatom nije zabeležena stati-

stička razlika između parakvata i primenjena dva postupka smrzavanja. Pojava acervula i konidija na lisnim drškama tretiranim smrzavanjem uočena je već posle 5 dana, ali u tretmanu Ia, iako je prisustvo *C. acutatum* detektovano u visokom procentu, zabeležena je pojava jake sporulacije i saprofitnih gljiva. Pojava saprofitnih gljiva može značajno da maskira sporulaciju *C. acutatum*, tako da se postupak Ib u kojem smrzavanje prati površinska sterilizacija NaOCl pokazao kao pogodniji postupak primene niskih temperatura u cilju iniciranja sporulacije patogena u latentnoj zarazi. I u ispitivanjima Mertely i Legard (2004) pored parakvat testa, smrzavanje praćeno sterilizacijom se pokazalo kao najpogodniji postupak detekcije latentne zaraze lisnih drški *C. acutatum*.

Kod ispitivanja latentne zaraze lišća jagode u tretmanu Ib detektovana je zaraza kod 96,67%, a u tretmanu Ia 93,33%. Poređenjem sa lišćem tretiranim parakvatom nije ustanovljena statistička razlika između primenjena tri postupka iniciranja sporulacije latentne zaraze lišća *C. acutatum*. Kao i kod lisnih drški u tretmanu smrzavanja bez sterilizacije zabeleženo je prisustvo velikog broja saprofitnih mikroorganizama.

U inokulisanim biljnim delovima koji nisu izlagani delovanju herbicida ili niskih temperatura, prisustvo gljive je detektovano u najmanjem broju lisnih drški, odnosno lišća. Ovo pokazuje da postupci koji dovode do propadanja biljnog tkiva mogu da izazovu prestanak latentnog načina parazitiranja gljive i da iniciraju njenu sporulaciju, kao vid održavanja u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine.

Primenom različitih postupka stimulisavanja sporulacije na asimptomatičnim biljnim delovima jagode, pokazalo se da pored primene parakvata i postupci smrzavanja predstavljaju pogodne postupke za detekciju latentne zaraze jagode prouzrokovačem antraknoze *C. acutatum*. Smrzavanje predstavlja alternativni metod primeni parakvata (Mertely i Legard, 2004), ali senzitivost njegove primene još uvek nije utvrđena. Pouzdanost primene parakvata postiže se testiranjem velikog broja uzoraka (300), da bi se sa pouzdanošću od 95% utvrdilo postojanje 1% zaraze (OEPP0/EPP0, 2004). Najosetljivija metoda detekcije *C. acutatum* je primena PCR (Sreenivasaprasad i sar., 1996; Parikka i Lemmetty, 2004). Perez-Hernandez i sar. (2008) utvrdili su da se primenom nested PCR metode može utvrditi 1fg DNA micelije *C. acutatum* i 1,5 konidija/ml. Kao najpogodniji metod utvrđivanja prisustva patogena na asimptomatičnom lišću utvrđen je postupak označen kao FISA, koji obuhvata smrzavanje biljnog

materijala, inkubiranje 2 dana na 27°C, ispiranje 0,05% rastvorom Tween 20 i izlaganje ultrazvuku. U ovako pripremljenim uzorcima primenom nested PCR reakcije utvrđena je visoka senzitivnost, kojom se u 50 nezaraženih listova može utvrditi jedan zaražen.

LITERATURA

- Biggs, A.R.:** Detection of latent infection in apple fruit with paraquat. *Plant Dis.*, 79: 1061-1067, 1995.
- Cerkauskas, R.F. and Sinclair, J.B.:** Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. *Phytopathology*, 70: 1036-1038, 1980.
- Denoyes, B. and Baundry, A.:** Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology*, 85: 53-57, 1995.
- Duduk, N. i Ivanović, M.:** Latentna zaraza jagode prouzrokovana antraknozom – *Colletotrichum acutatum*. Knjiga abstrakata XIII kongresa voćara i vinogradara Srbije sa međunarodnim učešćem, Novi Sad, 2008, str. 154.
- Freeman, S., Horowitz, S. and Sharon, A.:** Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Plant Dis.*, 91: 986-992, 2001.
- Ivanović, M., Ivanović, M., Duduk, B., Trkulja, V. i Stojanović, G.:** Antraknoza – nova bolest jagode u Srbiji. Zbornik rezimea VII savetovanja o zaštiti bilja, Soko Banja, 2005, str. 119-120.
- Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, S.N. and Dixon, P.M.:** Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*, 91: 659-664, 2001.
- Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, S.N. and Dixon, P.M.:** Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*, 95: 513-520, 2003.
- Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, S.N. and Dixon, P.M.:** Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. *Phytopathology*, 93: 1285-1291, 2003a.
- Luo, Y. and Michailides, T.J.:** Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology*, 91: 864-872, 2001.
- Mertely, J.C. and Legard, D.E.:** Detection, isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Dis.*, 88: 407-412, 2004.
- OEEP/EPPO:** Diagnostic protocols for regulated pests PM7/25. *Glomerella acutata*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34: 193-199, 2004.
- Parikka, P. and Lemmetty, A.:** Tracing latent infection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry by PCR. *Eur. J. Plant Pathol.*, 110: 393-398, 2004.
- Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E. and Correll, J.C.:** Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.*, 89: 784-796, 2005.
- Perez-Hernandez, O., Nam, M.H., Gleason, M.L. and Kim, H.G.:** Development of a nested polymerase chain reaction assay for detection of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Plant Dis.*, 92: 1655-1661, 2008.
- Sinclair, J.B.:** Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Dis.*, 75: 220-224, 1991.
- Službeni glasnik RS:** Pravilnik o utvrđivanju lista karantinskih štetnih organizama, 11, 2008.
- Smith, B.J. and Black, L.L.:** Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.*, 74: 69-76, 1990.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E. and Mills, P.R.:** PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol.*, 45: 650-655, 1996.

Detection of *Colletotrichum acutatum* Latent Infections in Strawberry Petioles and Leaves

SUMMARY

Colletotrichum acutatum is the most significant agent of anthracnose strawberry fruit rot. Besides being a necrotrophic pest, it can spend a part of its life cycle as an epiphyte, in a form of latent infection. The presence of the fungi on symptomless plant tissue is con-

sidered one of the main ways of distribution of this economically harmful pathogen in the world. Investigation of latent *C. acutatum* infection was carried out on artificially inoculated strawberries. The initiation of fungi sporulation on symptomless petioles and leaves was carried out by exposing them to the herbicide paraquat (0.25%) and low temperatures, which caused plant tissue decay in different ways. Surface sterilization with 0.5% NaOCl precedes the exposure of plant material to paraquat. The freezing procedure was carried out by exposure of plant material to the temperature of -20°C for 2h. After the freezing, one group was rinsed in Tween 20 (18 µl/l), and another group underwent surface sterilization in 0.0525% NaOCl with an addition of Tween 20 (18 µl/l). After 6 days of incubation, the appearance of acervuli and conidia was detected in 93.33 to 100% plant parts exposed to paraquat treatment and freezing procedure. In inoculated parts which were not exposed to herbicides or low temperatures, the presence of acervuli was detected in 3.33% tested petioles and 6.67% leaves.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; Strawberry; Latent infection; Paraquat; Freezing