

Metode Deteksi Cendawan Penyebab Infeksi Laten pada Buah Jeruk Impor (*Detection Methods of Fungal Latent Infection on Imported Citrus Fruits*)

Nurholis, Sinaga, MS, dan Tondok, ET

Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor, Jln. Kamper Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

E-mail: nurholiskarantina@gmail.com

Naskah diterima tanggal 13 Maret 2015 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 18 September 2015

ABSTRAK. Infeksi laten adalah hubungan parasitik patogen yang bersifat dorman dalam tanaman inang, yang dapat berubah menjadi patogen yang aktif. Patogen infeksi laten pada buah jeruk impor berpotensi tinggi sebagai sumber inokulum yang dapat menyebabkan epidemik penyakit tumbuhan di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah menetapkan metode yang akurat, cepat, dan dapat diaplikasikan untuk mendeteksi keberadaan cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk impor. Penelitian dilaksanakan berdasarkan studi kasus buah jeruk impor asal Argentina melalui pintu pemasukan Pelabuhan Tanjung Perak, Surabaya. Perlakuan deteksi cendawan telah dilakukan pada bagian kalik, kulit, biji, dan karpel dari buah jeruk menggunakan metode konvensional dan molekuler. Deteksi secara konvensional terdiri atas *direct agar plating technique* (DAPT), kombinasi *senescence stimulating technique* (SST) dan DAPT, serta *overnight freezing incubation technique* (ONFIT). Deteksi secara molekuler menggunakan pasangan primer universal ITS1F dan ITS4. Tiap perlakuan menggunakan tiga ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk berhasil dideteksi menggunakan metode konvensional dan molekuler. Metode DAPT berhasil mendeteksi *Alternaria citri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, dan *Fusarium incarnatum* pada hari ketiga setelah inkubasi. Cendawan yang sama juga ditemukan melalui metode kombinasi SST dan DAPT pada hari kedua setelah inkubasi. Menggunakan metode ONFIT berhasil menemukan *A. citri*, *C. gloeosporioides*, *F. incarnatum*, *C. boninense*, dan *Guignardia mangiferae* pada hari ketiga setelah inkubasi. Temuan kelima spesies cendawan tersebut adalah hasil identifikasi secara konvensional melalui karakter morfologi yang diperkuat oleh teknik identifikasi secara molekuler. Keberadaan DNA cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk juga berhasil dideteksi secara langsung melalui metode molekuler. Hasil sikuen mengidentifikasi cendawan tersebut adalah *Alternaria* sp. dan *Fusarium* sp. ONFIT adalah metode yang relatif cepat, akurat, dan dapat diaplikasikan untuk mendeteksi organisme pengganggu tumbuhan karantina (OPTK) pada buah jeruk impor sehingga direkomendasikan sebagai metode alternatif dalam tindakan pemeriksaan karantina pada buah jeruk di tiap-tiap pintu pemasukan.

Katakunci: Jeruk; Cendawan patogen; Identifikasi konvensional; Molekuler; PCR

ABSTRACT. Latent infection is a quiescent or dormant parasitic relationship of pathogens on their host, which can change into an active one. The latent infection pathogens on imported citrus fruits have high potential as the source of inoculum for plant disease epidemic in Indonesia. The objectives of this study are to provide some methods that accurate, fast and applicable to detect the latent pathogens on imported citrus fruits. Detections of the fungal latent infection have been done to the case study of imported citrus fruits from Argentina through entry point of Tanjung Perak Sea Port, Surabaya. Detection treatments of fungi were done on calyx, peel, seed, and carpel of citrus fruits using conventional and molecular methods. Conventional detections have been performed through direct agar plating technique (DAPT), senescence stimulating technique, and overnight freezing incubation technique (ONFIT). A pair of universal primer ITS1F and ITS4 has been used in molecular detection. The treatments used three replications. The result of the study showed that fungal latent infection on imported citrus fruits were successfully detected by conventional and molecular methods. Through DAPT methods, have been detected *Alternaria citri*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium incarnatum* at the third days after incubation. The same species were obtained by combination methods of SST and DAPT at the second days after incubation. Moreover, through the ONFIT methods have been found *A. citri*, *C. gloeosporioides*, *F. incarnatum*, *C. boninense*, and *Guignardia mangiferae* at the third days after incubation. The five species of the fungal latent infection were conventionally identified by morphological characters and confirmed by molecular identification techniques. The universal primers were able to amplify the fungal DNA on fresh citrus fruits. Sequencing of DNA showed that the fungi were *Alternaria* sp. and *Fusarium* sp. ONFIT was a fast, accurate and applicable method to detect quarantine pest on imported citrus, so that could be recommended as alternative method in action of quarantine checking on imported citrus in each entry point.

Keywords: Citrus; Fungal pathogen; Conventional identification; Molecular; PCR

Kebutuhan buah-buahan Indonesia pada tahun 2013 adalah sebesar 15,49 juta ton, sementara produksi dalam negeri hanya mencapai 13,85 juta ton (Badan Pusat Statistik 2013). Hal ini berarti terjadi kekurangan produksi buah-buahan sebesar 1,64 juta ton. Kecenderungan kekurangan produksi buah-buahan

ini juga terjadi pada buah jeruk (Lesmana 2009). Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia No. 03 tahun 2012 tentang rekomendasi impor produk hortikultura dalam pertimbangannya menyebutkan bahwa dalam rangka mencukupi kebutuhan produk hortikultura di dalam negeri, dilakukan impor produk

hortikultura, dengan memperhatikan keseimbangan antara kebutuhan dan pasokan produk hortikultura yang belum tercukupi dari pasokan di dalam negeri.

Ketentuan kuota sebagaimana diatur dalam Permentan No. 03 tahun 2012 tersebut tidak sesuai dengan Persetujuan Umum mengenai Tarif dan Perdagangan (GATT) (Republik Indonesia 1994). GATT melarang pengaturan kuota di dalam perdagangan bebas, namun *sanitary and phytosanitary* (SPS) *agreement* menyebutkan untuk menjamin kualitas produk pertanian yang dilalulintaskan dan melindungi tumbuh-tumbuhan atau pertanian di negaranya, setiap negara anggota berhak mengambil tindakan yang berkaitan dengan fitosanitari, tetapi harus tetap didasarkan pada prinsip atau kaidah dan bukti ilmiah yang cukup (Roberts 2005). Pemahaman kualitas dalam produk pertanian yang diimpor ke dalam suatu negara adalah produk tersebut harus *zero tolerance* (bebas) dari organisme pengganggu tumbuhan karantina (OPTK) (Sikdar *et al.* 2014). Oleh karena itu, untuk memastikan produk pertanian yang diimpor tersebut berkualitas bebas dari OPTK harus dilakukan deteksi dini yang cepat, akurat, dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah di setiap pintu pemasukan (Faisal *et al.* 2011).

Perdagangan bebas menyebabkan semakin derasnya mobilitas manusia dan produk pertanian masuk atau keluar dari suatu negara. Dari sudut pandang perkarantina dan perlindungan tanaman, hal ini harus diwaspadai karena keduanya berpeluang sebagai media pembawa OPTK (Kementerian Pertanian 2011). Cendawan merupakan salah satu patogen yang banyak dilaporkan menyebabkan kerusakan pada buah-buahan terutama pascapanen dan juga dapat bersifat laten yang tidak menunjukkan gejala penyakit (Johnston *et al.* 2005). Schaad *et al.* (2003) mengungkapkan deteksi cendawan pada buah yang diimpor sulit dilakukan bila cendawan tersebut menginfeksi secara laten. Kesulitan pendeteksian ini terjadi karena infeksi laten tidak menyebabkan timbulnya gejala penyakit pada buah-buahan sehingga cendawan laten ini sulit untuk diisolasi dari bagian gejala (Sinclair 1991). Pada perdagangan internasional, buah-buahan biasanya dipanen sebelum matang dan disimpan pada suhu rendah selama transportasi dan pemasaran (Chauhan *et al.* 2012). Keadaan belum matang inilah yang menyebabkan patogen berada pada kondisi laten dalam jaringan inang dan ketika buah menjadi matang, patogen kembali aktif sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada buah (Bukar *et al.* 2009). Hal ini yang menjadi dasar kekhawatiran ketika buah dimasukkan ke Indonesia patogen masih berada pada posisi laten, namun pada saat di tempat penyimpanan patogen

mampu berkembang dan menjadi sumber inokulum sehingga dapat memberikan ancaman terhadap pertanian di Indonesia. Oleh karena itu, sudah sangat diperlukan metode yang dapat mendeteksi cendawan penyebab infeksi laten pada buah-buahan impor.

Michailides *et al.* (2010) melaporkan bahwa metode *direct agar plating technique* (DAPT) mampu mendeteksi pertumbuhan cendawan *Monilinia* spp. dalam waktu inkubasi 4 sampai 7 hari pada suhu 25°C. Luo & Michailides (2001) mampu mendeteksi *Monilinia fructicola* yang terinfeksi laten pada stadia pembungaan tanaman dalam 5 sampai 7 hari setelah inkubasi (HSI). Selain itu, *M. fructicola*, *M. laxa*, (penyebab busuk cokelat pada buah-buahan), *Botrytis cinerea* (penyebab busuk pada buah anggur) dan *Alternaria* (penyebab penyakit hawar pada kacang-kacangan) dapat terdeteksi dalam 5 sampai 7 hari menggunakan metode *overnight freezing incubation technique* (ONFIT) (Michailides *et al.* 2010). Penggunaan metode deteksi secara molekuler dilaporkan mampu mendeteksi cendawan penyebab infeksi laten relatif lebih cepat dibandingkan metode konvensional. Sikdar *et al.* (2014) melaporkan *Phacidiopycnis washingtonensis* dan *Sphaeropsis pyriputrescens* dalam buah apel dapat terdeteksi dalam waktu 6 jam menggunakan metode *real time* PCR.

Tujuan penelitian ini adalah menetapkan metode yang akurat, cepat, dan dapat diaplikasikan untuk mendeteksi keberadaan cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk impor. Hipotesis penelitian ini adalah tersedianya metode yang cepat dan akurat serta dapat diaplikasikan untuk mendeteksi cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk impor.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan sejak bulan Juli sampai dengan Desember 2014 di Laboratorium Mikologi, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor dan Laboratorium Uji Karantina Tumbuhan Balai Besar Karantina Pertanian (BBKP) Surabaya.

Pada penelitian ini diuji dua tipe metode untuk mendeteksi infeksi laten, yaitu metode konvensional dan metode molekuler. Metode konvensional terdiri atas DAPT, kombinasi *senescence stimulating technique* (SST) dan DAPT, ONFIT. Metode molekuler menggunakan pasangan primer universal ITS1F dan ITS4. Metode deteksi dilakukan berdasarkan studi kasus impor jeruk dari Argentina. Tiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali ulangan dan tiap ulangan terdiri atas lima buah jeruk. Sampel pengujian

diperoleh dari buah jeruk yang dimasukkan melalui Pelabuhan Tanjung Perak, Surabaya dengan nomor registrasi pemasukan: 2014.2.04.01.S01.I.020852.

Kontainer bermuatan 1.600 kotak buah jeruk maka berdasarkan prosedur *International Standard for Phytosanitary Measures* (ISPM) No. 31, sampel buah jeruk yang diambil sebanyak 29 kotak secara acak dari dalam kontainer. Kotak tersebut kemudian dicampur dan diambil buah jeruk secara acak sesuai kebutuhan perlakuan.

Deteksi Konvensional

Direct agar plating technique (DAPT)

Media *acidified potato dextrose agar* (APDA) dibuat dengan menambahkan 25% asam laktat sebanyak 0,625 ml ke PDA. Buah jeruk dicuci menggunakan air mengalir, kemudian permukaan buah disterilisasi menggunakan larutan *sodium hypochlorite* (NaOCl) 5% selama dua menit. Selanjutnya buah dibilas dua kali dengan akuades steril. Buah jeruk dipotong-potong dengan ukuran 3mm × 3mm × 3mm kubik secara aseptik untuk mendapatkan bagian kalik, kulit, karpel, dan biji buah. Potongan bagian buah dikeringanginkan di atas kertas bloter steril, kemudian ditempatkan pada media APDA dan diinkubasi pada 25°C selama 5 sampai 7 hari.

Overnight freezing incubation technique (ONFIT)

Peralatan yang akan digunakan seperti rak plastik, plastik berlubang, dan plastik wadah didesinfeksi terlebih dahulu dengan NaOCl 5% selama 5 menit. Jeruk dimasukkan ke dalam plastik berlubang dan diikat pada bagian atasnya, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 10 detik, selanjutnya direndam dalam larutan NaOCl 5% yang mengandung *tween* 20 selama 4 menit. Sampel yang telah dikeringanginkan disusun di atas rak dalam wadah plastik dan ditutup rapat. Kelembaban di dalam wadah dijaga dengan menambahkan air (kelembaban di atas 70%). Buah dibekukan di dalam freezer -20°C selama 15 jam, selanjutnya wadah ditempatkan pada suhu ruang.

Kombinasi *senescence stimulating technique* (SST) dan DAPT

Permukaan buah dicuci dengan air bersih mengalir, selanjutnya disterilisasi permukaan menggunakan NaOCl 5% selama 2 menit. Buah dibilas dua kali dengan akuades steril, lalu dikeringanginkan pada kertas bloter steril. Selanjutnya buah direndam dalam larutan etrel (*2-chloroethyl phosphonic acid*) 1.500 ppm selama 5 menit, lalu dikeringanginkan selama 30 menit agar etrel diserap oleh buah. Selanjutnya, buah dipotong-potong untuk mendapatkan bagian kalik,

kulit, karpel, dan biji buah, kemudian potongan buah ditempatkan pada media APDA.

Identifikasi Konvensional

Identifikasi dilakukan melalui karakter morfologi dengan mengamati bentuk, ukuran, dan warna konidia serta mengamati tipe miselia, selanjutnya disesuaikan dengan kunci identifikasi cendawan untuk mengidentifikasi sampai ke level spesies.

Kuantifikasi Cendawan Temuan

Koloni cendawan yang tumbuh pada masing-masing bagian buah jeruk dilakukan perhitungan jumlah koloni berdasarkan perbedaan morfotipe. Hal ini untuk mengetahui jumlah keberadaan cendawan laten pada masing-masing bagian buah jeruk yang diuji. Dari perhitungan koloni tersebut kemudian dihitung persentase kejadian masing-masing morfotipe dengan rumus (Kaiser *et al.* 2005):

$$\text{Persentase kejadian (\%)} = \frac{\sum \text{satu jenis morfotipe}}{\sum \text{seluruh jenis morfotipe}} \times 100\%$$

Deteksi Molekuler

Ekstraksi DNA total buah jeruk

DNA total diekstrak dari buah jeruk yang tidak bergejala penyakit dengan mengambil sebanyak 0,1 g bagian kulit (sampel 1), biji (sampel 2), kalik (sampel 3), dan karpel (sampel 4). Sebelum ekstraksi, permukaan buah jeruk disterilisasi permukaan menggunakan NaOCl 5% selama 2 menit lalu dibilas dua kali dengan akuades steril, kemudian dikeringanginkan selama 10 menit. Ekstraksi DNA total dilakukan berdasarkan *Thermo Scientific "GeneJET Plant Genomic DNA Purification" mini kit* #K0791, #K0792 dengan tahapan ekstraksi sesuai dengan arahan protokol. DNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan.

Amplifikasi rDNA cendawan

Amplifikasi rDNA area ITS cendawan dilakukan dengan *Thermalcycler* menggunakan pasangan primer universal ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes & Bruns 1993) dan ITS4 (CCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.* 1990) dengan ukuran produk amplifikasi sekitar 600 pb. Amplifikasi DNA target cendawan dilakukan dalam volume 50 µl yang mengandung 20 µl PCR *master mix*, 2 µl primer ITS1F, 2 µl primer ITS4, 4 µl DNA hasil ekstraksi, dan 22 µl ddH₂O. Amplifikasi DNA dilaksanakan melalui tahap denaturasi utas ganda DNA pada 94°C selama 35 detik, tahap penempelan primer ke DNA target pada 51°C selama 1 menit, tahap pemanjangan DNA pada 72°C selama 2 menit selama 35 siklus. Visualisasi hasil amplifikasi DNA dilakukan pada gel agarosa 1,2%.

Identifikasi Molekuler

Hasil positif amplifikasi DNA cendawan dari buah jeruk

Identifikasi spesies terhadap hasil positif amplifikasi DNA cendawan dari buah jeruk dilakukan melalui teknik perunutan basa nukleotida. DNA target cendawan yang berhasil di amplifikasi, selanjutnya dikirim ke *First Base*, Malaysia untuk dirunut sikuennya. Sikuen area ITS 1 dan ITS4 DNA masing-masing cendawan temuan dibandingkan dengan sikuen DNA cendawan yang sama asal negara lain yang tersimpan dalam *GenBank* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Homologi area ITS1 dan ITS4 DNA cendawan dilakukan menggunakan program *BioEdit* menggunakan formulasi *ClustalW* dengan pilihan *sequence identity matrix*.

Isolat biakan setiap cendawan temuan

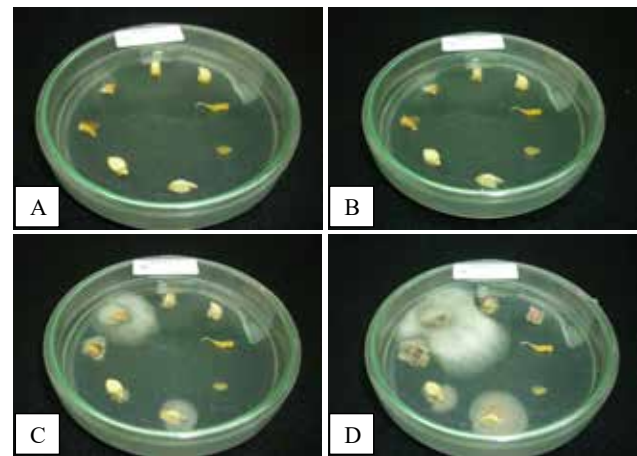
Ekstraksi, amplifikasi, dan perunutan basa nukleotida DNA cendawan dilakukan dari isolat biakan murni masing-masing cendawan temuan. Isolat diidentifikasi secara molekuler menggunakan *DNeasy Plant Kit Qiagen* sesuai dengan protokol. Teknik ekstraksi, amplifikasi dan perunutan basa nukleotida DNA sama seperti pada langkah identifikasi pada hasil positif amplifikasi DNA cendawan dari buah jeruk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi Konvensional

Dari deteksi cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk impor asal Argentina diperoleh beberapa koloni cendawan pada setiap metode uji. Berdasarkan morfologi warna koloni dan tipe miselium, dari metode deteksi DAPT diperoleh tiga morfotipe yang berbeda, yaitu koloni cendawan berwarna hijau, cokelat, dan merah muda dengan persentase kejadian berturut-turut sebesar 37,5%, 32,5% dan 30%. Persentase kejadian merupakan jumlah kemunculan patogen yang

dinyatakan dalam satuan persen (Kaiser *et al.* 2005). Ketiga morfotipe tersebut memiliki tipe miselium aerial (Tabel 1). Cendawan mulai terdeteksi pada hari ketiga setelah inkubasi (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil deteksi cendawan laten menggunakan metode *direct agar plating technique* (DAPT). (A) 1 hari setelah inkubasi (HSI), (B) 2 HSI, (C) 3 HSI, dan (D) 4 HSI. (*Detection results of latent fungi by using direct agar plating technique (DAPT). (A) 1 days after incubation (DAI), (B) 2 DAI, (C) 3 DAI, and (D) 4 DAI*)

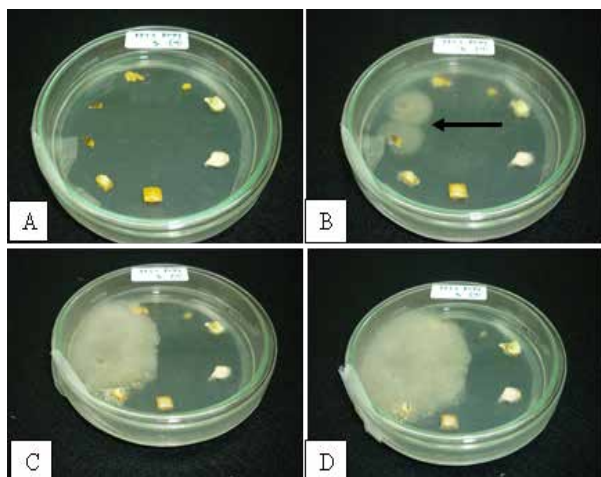
Berdasarkan morfologi warna koloni dan tipe miselium, dari metode kombinasi SST dan DAPT diperoleh tiga morfotipe yang berbeda, yaitu koloni cendawan berwarna cokelat, merah muda, dan hijau dengan persentase kejadian berturut-turut sebesar 51,28%, 25,64%, dan 23,08%. Ketiga morfotipe tersebut memiliki tipe miselium aerial (Tabel 2). Cendawan mulai terdeteksi pada hari kedua setelah inkubasi (Gambar 2).

Buah jeruk sehat dibekukan dalam *freezer* semalaman melalui metode ONFIT. Melalui metode

Tabel 1. Morfotipe isolat cendawan temuan hasil deteksi dengan metode *direct agar plating technique* (DAPT) (*Isolates morphotype of detected fungi by using direct agar plating technique (DAPT)*)

Morfotipe (<i>Morphotype</i>)*	Jumlah isolat pada bagian** (<i>Number of isolates in section**</i>)				Jumlah (<i>Amount</i>)	Frekuensi (<i>Frequency</i>), %
	Kalik (<i>Calyx</i>)	Kulit (<i>Peel</i>)	Biji (<i>Seed</i>)	Karpel (<i>Carpel</i>)		
KHU	11 (73,33)	4 (26,67)			15	37,5
KMM	1 (6,67)	9 (60)	2 (22,22)		12	30
KCT	3 (20)	2 (13,33)	7 (77,78)	1 (100)	13	32,5
Total	15	15	9	1	40	100

*Isolat cendawan temuan dibedakan atas tiga morfotipe: KHU, koloni hijau; KMM, koloni merah muda, KCT, koloni cokelat. **Angka dalam kurung menunjukkan persentase jumlah isolat. (*Isolates of detected fungi were divided into three morphotype: KHU, green colony, KMM, pink colony, KCT, brown colony. ** Digits in parenthesis showed the percentage of isolates*)



Gambar 2. Hasil deteksi cendawan laten menggunakan metode kombinasi *senescence stimulating technique* (SST) dan DAPT. (A) 1 hari setelah inkubasi (HSI), (B) 2 HSI, (C) 3 HSI, dan (D) 4 HSI. [Detection results of latent fungi by using combination of *senescence stimulating technique* (SST) and DAPT. (A) 1 day after incubation (DAI), (B) 2 DAI, (C) 3 DAI, and (D) 4 DAI]

ini diperoleh lima morfotipe miselia cendawan berbeda yang tumbuh pada permukaan buah jeruk, yaitu koloni berwarna hijau, merah muda, coklat, putih, dan hitam dengan persentase kejadian berturut-turut adalah 17,86%; 25%; 19,64%; 17,86% dan 19,64%. Persentase kejadian tertinggi terdapat pada morfotipe KMM (Tabel 3). Cendawan mulai terdeteksi pada hari ketiga setelah inkubasi (Gambar 3).

Deteksi Molekuler

Deteksi molekuler pada buah jeruk menunjukkan bahwa cendawan terdeteksi pada bagian kalik, kulit, dan biji menggunakan primer universal ITS1F dan ITS4 yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA pada gel agarosa 1,2%. Cendawan dalam buah jeruk

terdeteksi dalam waktu 6 jam menggunakan primer ini sesuai dengan ukuran target sekitar 600 pb. Pada bagian karpel tidak terdeteksi cendawan (Gambar 4). Area ITS rDNA telah banyak dilaporkan dapat mengidentifikasi cendawan patogen tanaman (Lacomis *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2004, Zhao *et al.* 2007).

Hasil sikuen dari ekstraksi DNA buah jeruk secara langsung menunjukkan bahwa pada bagian kalik teridentifikasi *Alternaria* sp., pada bagian kulit dan biji ditemukan *Fusarium* sp. Penentuan spesies *Fusarium* sp. merupakan hasil *BLAST* berdasarkan nomor aksesori GenBank HQ630965.1 dengan homologi 85% dan spesies *Alternaria* sp. didasarkan pada nomor aksesori GenBank GU584948.1 dengan homologi 90%. Menurut Sikdar *et al.* (2014) tangkai dan kalik merupakan bagian buah apel yang banyak terinfeksi laten oleh *Phacidiopycnis washingtonensis* dan *Sphaeropsis pyriputrescens*. Metode molekuler lebih sedikit mendeteksi cendawan terinfeksi laten dibandingkan dengan metode konvensional (Tabel 5). Hal ini terjadi karena konsentrasi DNA cendawan dalam buah jumlahnya sedikit sehingga tidak mampu teramplifikasi oleh primer. Sikdar *et al.* (2014) menjelaskan bahwa DNA cendawan pada buah yang menunjukkan gejala penyakit dapat dideteksi pada konsentrasi minimal 5 ng. Hal ini yang menyebabkan PCR tidak dapat mendeteksi keberadaan cendawan dalam buah yang tidak bergejala. Sebaiknya digunakan real time PCR karena mampu mendeteksi DNA dibawah konsentrasi kurang dari 5 ng.

Hasil Identifikasi Cendawan Temuan

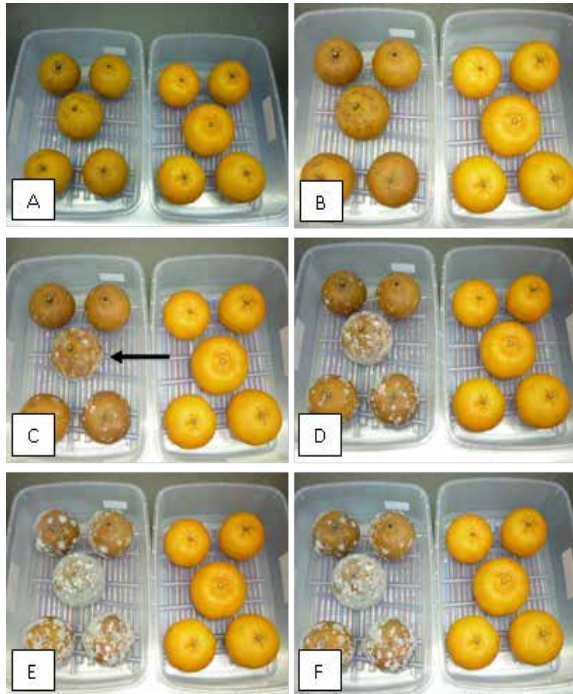
Sebanyak lima morfotipe cendawan berbeda berhasil dideteksi menggunakan berbagai metode uji baik konvensional maupun molekuler (Tabel 4). Kelima morfotipe cendawan tersebut juga berhasil diidentifikasi secara teknik konvensional dan molekuler (Tabel 5). Identifikasi secara konvensional dilakukan dengan mengamati karakter morfologi dari masing-masing cendawan, seperti pengukuran

Tabel 2. Morfotipe isolat cendawan temuan hasil deteksi dengan metode kombinasi *senescence stimulating technique* (SST) dan DAPT [Isolates morphotype of detected fungi by using combination of *senescence stimulating technique* (SST) and DAPT]

Morfotipe (Morphotype)*	Jumlah isolat pada bagian (Number of isolates in section)**				Jumlah (Amount)	Frekuensi (Frequency) (%)
	Kalik (Calyx)	Kulit (Peel)	Biji (Seed)	Karpel (Carpel)		
KHU	6 (40)		1 (10)	2 (100)	9	23,08
KMM	2 (13,33)	8 (66,67)			10	25,64
KCT	7 (46,67)	4 (33,33)	9 (90)		20	51,28
Total	15	12	10	2	39	100

*Isolat cendawan temuan dibedakan atas tiga morfotipe: KHU= koloni hijau, KMM= koloni merah muda, KCT= koloni coklat. **Angka dalam kurung menunjukkan persentase jumlah isolat. (*Isolates of detected fungi were divided into three morphotype, KHU= green colony, KMM= pink colony, KCT= brown colony. ** digits in parenthesis showed the percentage of isolates)

konidia, panjang konidiofor, bentuk konidia, dan tipe miselia yang tumbuh pada media. Selanjutnya diidentifikasi menggunakan berbagai literatur kunci identifikasi cendawan. Hasil identifikasi konvensional menunjukkan bahwa kelima morfotipe cendawan temuan tersebut adalah lima spesies yang berbeda



Gambar 3. Hasil deteksi cendawan laten menggunakan metode *overnight freezing incubation technique* (ONFIT), kontainer kiri adalah perlakuan, kontainer kanan adalah kontrol. (A) 1 hari setelah inkubasi (HSI), (B) 2 HSI, (C) 3 HSI, (D) 4 HSI, (E) 5 HSI, dan (F) 6 HSI [Detection results of latent fungi by using overnight freezing incubation technique (ONFIT), left container is treatment, right container is control. (A) 1 Day After Incubation (DAI), (B) 2 DAI, (C) 3 DAI, (D) 4 DAI, (E) 5 DAI, and (F) 6 DAI]

berdasarkan perbedaan karakter morfologi. Identifikasi secara molekuler dilakukan dengan mengamplifikasi DNA kelima morfotipe cendawan menggunakan primer universal, selanjutnya dilakukan perunut basa nukleotida DNA. Hasil identifikasi molekuler juga menunjukkan bahwa kelima morfotipe cendawan temuan tersebut adalah lima spesies yang berbeda sesuai dengan hasil identifikasi secara konvensional.

Hasil identifikasi tiga morfotipe cendawan menggunakan metode DAPT berturut-turut (KHU, KCT, dan KMM) adalah *A. citri*, *C. gloeosporioides*, dan *F. incarnatum*. Cendawan tersebut menempati lokasi yang berbeda-beda pada bagian buah jeruk. Cendawan yang paling dominan ditemukan pada bagian kalik, kulit, biji, dan karpel masing-masing adalah *A. citri*, *F. incarnatum*, *C. gloeosporioides*, dan *C. gloeosporioides* (Tabel 1). Michailides *et al.* (2010) juga menyebutkan bahwa metode DAPT ini dapat mengisolasi patogen yang menginfeksi laten pada bagian kalik dan kulit berbagai jenis buah. Menurut Brown (1986), perbedaan lokasi cendawan pada bagian buah disebabkan oleh ketersediaan nutrisi dan virulensi patogen di dalam buah.

Temuan ketiga spesies cendawan penyebab infeksi laten sangat berpotensi menimbulkan kerusakan buah di tempat penyimpanan. Menurut Michailides & Elmer (2000) patogen sudah memulai infeksi pada tahap pembungaan tanaman atau pada saat buah masih muda di lapangan. Di California, petani buah kiwi telah menggunakan metode DAPT untuk menentukan pemakaian fungisida pada buah-buahan di lapangan sebelum masa panen. Selain itu, metode DAPT ini dapat dimanfaatkan oleh bagian pengepakan dan pengapalan untuk menyortir buah yang terinfeksi laten. Informasi keberadaan patogen laten dalam buah-buahan dapat mengurangi penyebaran penyakit di tempat penyimpanan sekaligus dapat merencanakan waktu pemasaran (Michailides *et al.* 2010).

Hasil identifikasi tiga morfotipe cendawan (KCT, KMM, dan KHU) menggunakan metode kombinasi SST dan DAPT berturut-turut adalah *C. gloeosporioides*, *F. incarnatum*, dan *A. citri*.

Tabel 3. Morfotipe isolat cendawan temuan hasil deteksi dengan metode *overnight freezing incubation technique* (ONFIT) [Isolates morphotype of detected fungi by using overnight freezing incubation technique (ONFIT)]

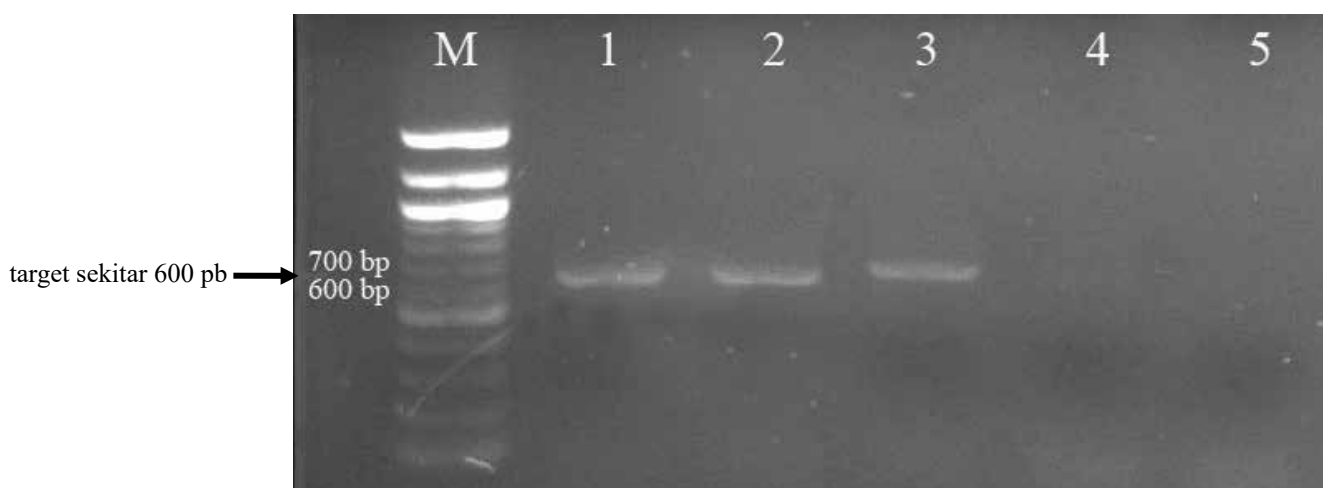
Morfotipe (Morphotype)	Jumlah isolate (Number of isolates)	Frekuensi (Frequency), %
Koloni berwarna hijau (Green colony) (KHU)	10	17,86
Koloni berwarna merah muda (Pink colony) (KMM)	14	25
Koloni berwarna coklat (Brown colony) (KCT)	11	19,64
Koloni berwarna putih (White colony) (KPH)	10	17,86
Koloni berwarna hitam (Black colony) (KHM)	11	19,64
Total	56	100

Cendawan tersebut menempati lokasi yang berbeda-beda pada bagian buah jeruk. Cendawan yang paling dominan ditemukan pada bagian kalik, kulit, biji, dan karpel masing-masing adalah *C. gloeosporioides*, *F. incarnatum*, *C. gloeosporioides*, dan *A. citri* (Tabel 2). Cendawan *C. gloeosporioides* paling banyak terdeteksi melalui metode ini. Menurut Brown (1986), *C. gloeosporioides* dan *A. citri* sering ditemukan bersifat laten pada buah jeruk. El-Kazzaz *et al.* (1983) melaporkan *C. gloeosporioides* mulai mengkoloni buah ketika buah sudah mengalami fase *senescence* (pengusangan). Penyebab pengusangan buah adalah karena pengaruh etilen. Etilen dapat mempercepat masa pengusangan buah sehingga menyebabkan penurunan ketegaran jaringan dalam buah. Kondisi ini mempermudah cendawan mengkolonisasi lebih lanjut (Govrin & Levine 2000, Cohn *et al.* 2001). Cristescu *et al.* (2008) melaporkan aplikasi etilen mampu mempercepat masa pengusangan sehingga dapat mengaktifkan perkecambahan konidia *B. cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Gloeosporium perennans*, *Diplodia natalonis*, dan *P. citri*.

Hasil identifikasi lima morfotipe cendawan (KHU, KMM, KCT, KPH, dan KHM) menggunakan metode ONFIT berturut-turut adalah *A. citri*, *F. incarnatum*, *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, dan *G. mangiferae*. Metode ONFIT dapat mendeteksi cendawan lebih banyak dibandingkan dengan metode lainnya (Tabel 5). Menurut Michailides *et al.* (2010) hal ini dapat terjadi karena metode ONFIT bekerja langsung merusak jaringan buah sehingga memudahkan patogen penyebab infeksi laten untuk mendapatkan nutrisi dari buah tersebut. Sebelumnya, Cerkauskas &

Sinclair (1980) melaporkan bahwa jaringan tanaman dapat dirusak menggunakan herbisida berbahan aktif *paraquat* sehingga dapat mengaktifkan patogen laten pada tanaman kedelai. Herbisida tersebut bersifat toksik sehingga perlu dicari alternatif lain yang lebih aman. ONFIT merupakan metode yang aman karena tidak menggunakan pestisida berbahaya. Luo & Michailides (2003) menjelaskan penggunaan metode ONFIT pada tahap awal pembentukan buah dapat digunakan untuk menentukan tingkat keparahan penyakit busuk cokelat *Monilinia* sp. pada buah plum di lapangan pada saat panen. Jumlah inokulum cendawan yang tinggi di lapangan adalah faktor yang mempercepat pertumbuhan cendawan pada metode ONFIT.

Metode konvensional yang paling akurat dan cepat dalam mendeteksi cendawan terinfeksi laten pada buah jeruk impor asal Argentina adalah metode ONFIT (Tabel 5). Melalui metode ini berhasil diperoleh lima spesies cendawan penyebab infeksi laten yang tumbuh pada permukaan buah jeruk mulai hari ketiga setelah inkubasi. Metode ONFIT yang dilakukan sebelumnya dapat memunculkan cendawan *M. fructicola* pada buah plum mulai dari hari kelima setelah inkubasi pada suhu pembekuan -16°C (Michailides *et al.* 2010). Setelah dilakukan pengembangan metode ONFIT pada buah jeruk dengan melakukan pembekuan pada suhu -20°C terbukti mampu mendeteksi kemunculan cendawan mulai hari ketiga setelah inkubasi. Hasil pengembangan metode ini, tekstur buah jeruk masih terlihat utuh sehingga masih memudahkan dalam hal pengamatan cendawan. Luo & Michailides (2003) menyebutkan semakin rendah suhu pembekuan dapat menyebabkan buah mudah rusak sehingga menyulitkan proses identifikasi cendawan. Kecepatan deteksi



Gambar 4. Hasil amplifikasi DNA cendawan pada buah jeruk impor dengan primer universal ITS1F dan ITS4. Marker 1 kb (M), sampel pada kulit (1), sampel pada biji (2), sampel pada kalik (3), sampel pada karpel (4), dan kontrol negatif (5) [Amplification result of fungal DNA from citrus by using universal primer ITS1F and ITS4. Marker 1 kb (M), sample from peel (1), sample from seed (2), sample from calyx (3), sample from carpel (4), and negative control (5)]

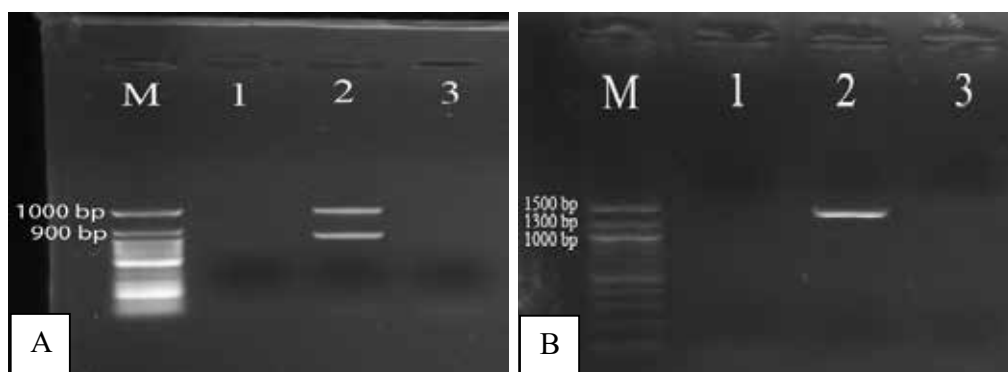
Tabel 4. Identifikasi isolat cendawan temuan secara konvensional dan molekuler (*Isolate identification of detected fungi by using conventional and molecular method*)

Isolat (<i>Isolate</i>)	Identifikasi isolat (<i>Isolate identification</i>)					
	Konvensional (<i>Conventional</i>)			Molekuler (<i>Molecular</i>)		
	Spesies (<i>Species</i>)	Referensi (<i>Reference</i>)	Spesies (<i>Species</i>)	Homologi (<i>Homology</i>) (%)	Asal (<i>Origin</i>)	No. aksesori genbank (<i>Genbank accession number</i>)
KHU	<i>Alternaria citri</i>	Ellies 1971	<i>Alternaria citri</i>	100	Jepang	AB267479.1
KCT	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Weir <i>et al.</i> 2012	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100	USA	JX010153.1
KMM	<i>Fusarium incarnatum</i>	Seta <i>et al.</i> 2004	<i>Fusarium incarnatum</i>	99	Italia	KJ562367.1
KPH	<i>Colletotrichum boninense</i>	Damm <i>et al.</i> 2012	<i>Colletotrichum boninense</i>	100	Brazil	JX258784.1
KHM	<i>Guignardia mangiferae</i>	EPP0 2009	<i>Guignardia mangiferae</i>	98	Jepang	AB731125.1

Tabel 5. Spesies cendawan temuan hasil deteksi dengan metode konvensional dan molekuler (*Fungal species of detected fungi by using conventional and molecular method*)

No.	Metode (<i>Method</i>)	Spesies cendawan temuan (<i>Detected fungi species</i>)	Jumlah (<i>Amount</i>)	Waktu deteksi (<i>Detection time</i>)*
1.	Direct agar plating technique (DAPT)	<i>Alternaria citri</i> , <i>Fusarium incarnatum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3	3 HSI
2.	Overnight freezing incubation technique (ONFIT)	<i>Alternaria citri</i> , <i>Fusarium incarnatum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Colletotrichum boninense</i> , <i>Guignardia mangiferae</i>	5	3 HSI
3.	Kombinasi senescence stimulating technique (SST) & DAPT	<i>Alternaria citri</i> , <i>Fusarium incarnatum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3	2 HSI
4.	Molekuler	<i>Alternaria sp.</i> dan <i>Fusarium sp.</i> ***	2	6 jam**

*HSI: Hari setelah inkubasi, **deteksi dengan primer ITS1F dan ITS4, ***setelah disekuon. (*HSI/DAI= Day after incubation, **detection by ITS1F and ITS4 primer, ***after sequencing)



Gambar 5. Visualisasi hasil amplifikasi DNA target dengan primer spesifik *A. citri* pada gel agarosa 1,2%, Amplifikasi DNA *A. citri* dengan primer PG20 dan Pro2 (A), marker 1 kb (M), kontrol negatif (1), *A. citri* (2), dan *A. alternata* (3). Amplifikasi DNA *A. citri* dengan primer UCREAF1 dan UCREAR3 (B), marker 1 kb (M), kontrol negatif (1), *A. citri* (2), dan *A. alternata* (3) [Visualization of amplification results of target DNA by using specific primer of *A. citri* in 1,2% gel agaros. Amplification of *A. citri* DNA with PG20 and Pro2 primer (A). Marker 1 kb (M), negative control (1), *A. citri* (2), and *A. alternata* (3). Amplification of *A. citri* DNA with UCREAF1 and UCREAR3 primer (B), marker 1 kb (M), negative control (1), *A. citri* (2), and *A. alternata* (3)]

kemunculan cendawan sangat diperlukan dalam melakukan tindakan pemeriksaan media pembawa oleh Badan Karantina pertanian, agar cepat dilakukan pengambilan keputusan terhadap pemasukan buah jeruk, sehingga buah jeruk tidak tertahan lama di pelabuhan.

Spesies *A. citri* diidentifikasi lebih lanjut menggunakan primer spesifik untuk membuktikan kebenarannya mengingat spesies tersebut dalam Permentan 93 tahun 2011 tergolong dalam kategori A1 (belum terdapat di Indonesia). Pasangan primer spesifik yang digunakan adalah PG20 dan Pro2 dengan ukuran target 813 pb (Isshiki *et al.* 2003) dan UCREAF1 dan UCREAR3 dengan ukuran target 1395 pb (Kato *et al.* 2007). Primer yang digunakan mengidentifikasi pertama kali adalah primer universal dengan ukuran target sekitar 600 pb.

Hasil elektroforesis DNA menunjukkan bahwa kedua primer yang digunakan mampu mengamplifikasi DNA target *A. citri*. Hal ini dibuktikan dengan munculnya pita DNA pada gel agarosa 1,2% sesuai dengan ukuran target 813 pb pada primer PG20 dan Pro2 dan 1395 pb pada primer UCREAF1 dan UCREAR3, namun pada primer PG20 dan Pro2 terdapat 2 pita DNA (Gambar 5A). Hal ini diduga primer tersebut masih kurang spesifik, sementara itu, pada sampel *A. alternata* (pembanding) tidak terlihat pita DNA. Identifikasi *A. citri* menggunakan primer spesifik UCREAF1 dan UCREAR3 menunjukkan bahwa primer dapat mengamplifikasi DNA target pada sampel *A. citri* dengan visualisasi 1 pita DNA sehingga dapat dibuktikan bahwa sampel tersebut adalah positif *A. citri* (Gambar 5B). Primer spesifik UCREAF1 dan UCREAR3 lebih baik dalam mendeteksi spesies *A. citri* dibandingkan primer PG20 dan Pro2. Smith *et al.* (1996) dan Sharma *et al.* (2013) menyebutkan PCR merupakan pengujian deteksi organisme yang spesifik, sensitif dan cepat sampai ke level spesies.

KESIMPULAN DAN SARAN

Metode ONFIT yang diikuti dengan teknik identifikasi secara konvensional melalui karakter morfologi dan teknik molekuler melalui perunutan basa nukleotida DNA akurat dan relatif cepat serta dapat diaplikasikan untuk mendeteksi cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk impor. Lima cendawan penyebab infeksi laten pada buah jeruk impor yang berhasil dideteksi dan diidentifikasi adalah *A. citri*, *F. incarnatum*, *C. boninense*, *C. gloeosporioides*, dan *G. mangiferae*. Tiga spesies pertama belum terdapat di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Kepala Balai Besar Karantina Pertanian Surabaya, yang telah memberikan ijin pelaksanaan, pemberian sarana dan prasarana penunjang penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Pusat Statistik 2013, *Produksi buah-buahan menurut provinsi tahun 2013*, diunduh 12 Juli 2014, <[http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php? tabel=1&daftar=1&id_subyek=55¬ab=10](http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?tabel=1&daftar=1&id_subyek=55¬ab=10)>.
2. Brown, GE 1986, 'Postharvest decays of Florida citrus fruit', American Chemical Symposium Series 143, Washington.
3. Bukar, A, Mukhtar, MD & Adamu, S 2009, 'Isolation and identification of postharvest spoilage fungi associated with sweet oranges (*Citrus chinensis*) traded in Kano Metropolis', *Bayero J. of Pure and Appl. Sci.*, vol.2, no.1, pp. 122-4.
4. Cerkauskas, RF & Sinclair, JB 1980, 'Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues', *Phytopathology*, vol.70, pp. 1036-8.
5. Chauhan, SK, Singh, P & Jawa, NK 2012, 'Studies on the standardization of ripening techniques for oranges', *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, vol.3, no.8, pp. 117-21
6. Cohn, J, Sessa G, & Martin, GB 2001, 'Innate immunity in plants', *Current Opinion in Immunology*, vol.13, pp. 55-62
7. Cristescu, SM, Woltering, EJ & Harren, FJM 2008, 'Real time monitoring of ethylene during fungal plant interaction by laser based photoacoustic spectroscopy', *Real time monitoring of ethylene*, vol.2, pp. 25-47.
8. Damm, U, Cannon PF, Woudenberg, JHC, Johnston, PR, Weir, BS, Tan, YP, Shivas, RG & Crous, PW 2012, 'The *Colletotrichum boninense* species complex', *Studies in Mycology*, vol.73, pp. 1-36.
9. El-Kazzaz, MK, Sommer, NF & Kader, AA 1983, 'Ethylene effects on in vitro and in vivo of certain postharvest fruit-infecting fungi', *Phytopathology*, vol.73, pp. 998-1001
10. Ellies, MB 1971, *Dematiaceous hyphomycetes*, Commonwealth Mycological Institute, England.
11. EPPO 2009, '*Gugnardia citricarpa*', *Bulletin EPPO*, vol.39, pp. 318-27.
12. Faisal, PM, Nagendran, K & Ranjitham, P 2011, 'Specific detection of *Colletotrichum musae* inciting anthracnose disease in Banana', *Libyan Agriculture Research Center J. International*, vol. 2, no.6, pp. 279-86.
13. Gardes, M & Bruns, TD 1993, 'ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts', *Molecular Ecology*, vol.2, pp. 113-8.
14. Govrin, EM & Levine, A 2000, 'The hypersensitive reaction facilitates plant infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*', *Current Biology*, vol.10, pp. 751-7

15. International Plant Protection Convention 2008, *International standards for phytosanitary measures (ISPM) No. 31 Methodologies for Sampling of Consignments*, FAO, Italia.
16. Isshiki, A, Ohtani, K, Kyo, M, Yamamoto, H & Akimitsu, K 2003, 'Green fluorescent of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus', *Phytopathology*, vol. 93, no.7, pp. 768-73.
17. Johnston, PR, Pennycook, SR & Manning, MA 2005, 'Taxonomy of fruit-rotting fungal pathogens : What's really out there ?', *New Zealand Plant Protection*, vol. 58, pp. 42-6.
18. Kaiser C, Van der Merwe, Bekker, R, Labuschagne, TF 2005, '*In-vitro* inhibition of mycelial growth of several phytopathogenic fungi, including *Phytophthora cinnamomi* by soluble silicon', *South African Avocado Growers Association Yearbook*, vol. 28, pp. 70-4.
19. Katoh, H, Ohtani, K, Yamamoto, H & Akimitsu, K, 2007, 'Over expression of a gene encoding a catabolite repression element in *Alternaria citri* causes severe symptoms of black rot in citrus fruit', *Phytopathology*, vol. 97, no.5, pp. 557-63.
20. Kementerian Pertanian 2011, *Peraturan Menteri Pertanian No. 93 tahun 2011 tentang jenis organisme pengganggu tumbuhan karantina*, Jakarta.
21. Kementerian Pertanian 2012, *Peraturan Menteri Pertanian Nomor 3 tahun 2012 tentang rekomendasi impor produk hortikultura*, Jakarta.
22. Knoester, M, Van Loon, LC, Van den Heuvel, J, Henning, J, Bol, J & Linthorst, HJM 1998, 'Ethylene insensitive tobacco lacks non host resistance against soil borne fungi', *Proceeding of the National Academy of Sci USA*, vol. 95, pp. 1933-7.
23. Lacomis, VB, Blancard, D, Guenard, M, Molinero, V, Laurent & Simoneau, E 2002, 'Development of a PCR based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous seeds', *Seed.Sci.Technol.*, vol. 30, pp. 87-95
24. Lesmana, D 2009, 'Analisis finansial jeruk keprok di Kabupaten Kutai Timur', *EPP*, vol. 6, no.1, hlm. 36-43.
25. Luo, Y & Michailides, TJ 2001, 'Risk analysis for latent infection of prune by *Monilinia fructicola* in California', *The American Phytopathological Society*, vol. 91, no.12, pp. 1197-208.
26. Luo, Y & Michailides, TJ 2003, 'Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*', *Phytopathology*, vol. 93, pp. 102-111.
27. Michailides, TJ, Morgan, DP & Luo, Y 2010, 'Epidemiological assesments and postharvest disease incidence', *Postharvest Pathology*, vol. 2, no.6. pp. 69-88.
28. Michailides, TJ & Elmer, PAG 2010, 'Botrytis grey mold of kiwi fruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand', *Plant.Dis.*, vol. 84, pp. 208-23.
29. Palou, L, Crisosto, CH, Garner, D & Basinal, LM 2003, 'Effect of continuous exposure to exogenous ethylene during cold storage on postharvest decay development and quality attributes of stone fruits and table grapes', *Postharvest Biology and Technology*, vol. 27, hlm. 243-54.
30. Republik Indonesia 1994, Undang-undang Republik Indonesia nomor 7 tahun 1994 tentang pengesahan *agreement establishing the world trade organization* (Persetujuan Pembentukan Organisasi Perdagangan dunia), Jakarta.
31. Roberts, D 2005, *The integration of economics into SPS risk management policies : issues and challenges*, University of Adelaide, Australia.
32. Schaad, NW, Frederick, RD, Shaw, J, Schneider, WL, Hickson, R, Petrillo, MD & Luster, D 2003, 'Advances in molecular based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues', *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 41, pp. 305-24.
33. Seta, S, Gonzales, M & Lori, G 2004, 'First report of walnut canker caused by *Fusarium incarnatum* in Argentina', *Plant Pathology*, vol. 53, no.2, pp. 248-52.
34. Sharma, P, Deep, S, Sharma, M, Bhat,i DS & Chowdappa 2013, 'PCR based assay for the detection of *Alternaria brassicicola* in crucifers', *Indian Phytopath.*, vol. 66, no.3, pp. 263-8.
35. Sikdar, P, Okubara, P, Mazzola, M & Xiao, CL 2014, 'Development of PCR assays for diagnosis and detection of the pathogens *Phacidiopycnis washingtonensis* and *Sphaeropsis pyriputrescens* in apple fruit', *Plant Diseases*, vol. 98, no.2, pp. 241-6.
36. Sinclair, JB 1991, 'Latent infection of soybean plants and seeds by fungi' *The American Phytopathological Society*, vol. 75, no.3, pp. 220-4.
37. Smith, OP, Peterson, GL, Beck, RJ, Schaad, NW & Bonde, MR 1996, 'Development of a PCR based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat', *Phytopathology*, vol. 86, pp. 115-22.
38. Weir, BS, Johnston, PR & Damm, U 2012, 'The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex', *Studies in Mycology*, vol. 73, pp. 115-80.
39. White, TJ, Bruns, T, Lee, S & Taylor, J 1990, *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, Academic Press, London.
40. Zhang, ZG, Wang, YC & Zheng, XB 2004, 'Sequence analysis of ITS of the ribosomal RNA gene repeat of *Phytophthora sojae* and *P.medicaginis*', *Mycosystema*, vol. 22, pp. 524-48
41. Zhao, J, Wang, XJ, Chen, CQ, Huang, LL & Kang, ZS 2007, 'A PCR based assay for detection of *Puccinia striiformis* f.sp *tritici* in wheat', *Plant Dis.*, vol. 91, pp. 1669-74.