

POGODNOST RAZLIČITIH PRAJMERA ZA SPECIFIČNU MOLEKULARNU DETEKCIJU *MONILINIA* SPP.

Nataša D. Duduk*, Miljan M. Vasić, Nina R. Vučković,
Aleksandra A. Žebeljan i Ivana M. Vico

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet,
Nemanjina 6, 11080 Beograd-Zemun, Srbija

Rezime: Vrste roda *Monilinia* su ekonomski značajni patogeni jabučastih i koštičavih vrsta voćaka. U Srbiji su prisutne četiri vrste ovog roda: *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* i *Monilia polystroma*. Detekcija i identifikacija vrsta roda *Monilinia* je složena, tako da je cilj ovog rada bio da se ispita i standardizuje brza i efikasna metoda molekularne detekcije korišćenjem različitih prajmera u PCR metodi i da se utvrdi njihova specifičnost i mogućnost korišćenja u identifikaciji *Monilinia* spp. U radu su korišćeni izolati *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* i *M. polystroma* poreklom iz plodova jabuke prikupljenih u Srbiji, kao i referentni izolati iz Italije i Japana. Specifična molekularna detekcija *M. laxa* postignuta je korišćenjem prajmera ITS1Mlx/ITS4Mlx i MI-Mfg-F2/MI-Mfc-R1, a vrste *M. fructicola* korišćenjem prajmera ITS1Mfcl/ITS4Mfcl i Mfc-F1/Mfc-R1. Prajmeri ITS1Mfng/ITS4Mfng i ITS1/Mfg-R2, koji su u literaturi opisani kao specifični za *M. fructigena*, pored izolata *M. fructigena* amplifikovali su i DNK izolata *M. polystroma*. Za razdvajanje ove dve vrste, kao i za razlikovanje sve četiri ispitivane vrste roda *Monilinia*, najpogodniji su uzvodni prajmer MO368-5 u kombinaciji sa nizvodnim prajmerima MO368-8R, Laxa-R2 i MO368-10R u direktnoj ili Multiplex PCR metodi.

Ključne reči: *Monilinia fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola*, *M. laxa*, PCR, Multiplex PCR, molekularna detekcija.

Uvod

Vrste roda *Monilinia* se ubrajaju u ekonomski najštetnije patogene – prouzrokovaoče sušenja cvetova, grančica i smeđe truleži plodova jabučastih i koštičavih voćaka (Wormald, 1954; Byrde i Willetts, 1977). Najznačajnije vrste ovog roda su: *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey, *M. laxa* (Aderh. & Ruhl.) Honey, *M. fructicola* (G. Winter) Honey i *Monilia polystroma* van Leeuwen (Byrde i Willetts, 1977; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2002). *M. laxa* i *M.*

* Autor za kontakt: e-mail: natasadukic@yahoo.com

fructicola su najzastupljenije i ekonomski najznačajnije na koštičavim voćkama, a *M. fructigena* na jabučastim (Wormald, 1954; Byrde i Willetts, 1977; Batra, 1991).

Gljive iz roda *Monilinia* su rasprostranjene u celom svetu. *M. fructigena* je široko rasprostranjena u Evropi i Aziji i karantinska je vrsta za Severnu Ameriku i Australiju, *M. laxa* je prisutna na svim kontinentima, a *M. fructicola* u Severnoj i Južnoj Americi, Aziji i Australiji (Wormald, 1954; Byrde i Willetts, 1977; Batra 1991; OEPP/EPPO, 2009; CABI, 2016). U Evropi je *M. fructicola* prvi put opisana u Francuskoj 2001. godine (OEPP/EPPO, 2002). Ova vrsta je karantinska gljiva za Evropu (EPPO A2 lista karantinskih vrsta) (OEPP/EPPO, 2009), a u Srbiji se nalazi na IA listi I deo štetnih patogena (Službeni glasnik Republike Srbije, br. 7/2010). Iako je opisana u većini evropskih zemalja, ova vrsta i dalje ima karantinski status jer kao prouzročivač bolesti dovodi do velikih ekonomskih gubitaka u proizvodnji voća (Baker, 2011). Četvrta vrsta, *M. polystroma*, opisana je 2002. godine i do sada je rasprostranjena u Evropi i Aziji (van Leeuwen et al., 2002; OEPP/EPPO, 2009; Vasić et al., 2013; CABI, 2016).

Detekcija i identifikacija vrsta roda *Monilinia* je složena jer ove gljive prouzrokuju slične simptome na zaraženim biljkama, morfološki su slične, a u okviru vrste varijabilne (Munoz et al., 2008; Poniadowska et al., 2013; Vasić et al., 2016). To je razlog zbog koga su molekularne metode našle mesto i u identifikaciji vrsta ovog roda (Carbone i Kohn, 1993; Holst-Jensen et al., 1997; Fulton et al. 1999; Ioos i Frey, 2000; Hughes et al., 2000; Cote et al., 2004). Kod vrsta roda *Monilinia* kao i kod ostalih gljiva, najviše su proučavani geni ribozomalnih RNK.

Carbone i Kohn (1993) su utvrdili da između vrsta porodice *Sclerotiniaceae*, pa i vrsta roda *Monilinia*, postoji nukleotidna razlika u ITS regionu ribozomalne DNK (rDNK). U okviru sekcije *Junctoriae* pronađeno je pet baznih parova razlike između *M. fructicola* i *M. laxa*, dok je *M. fructigena* imala 13 baznih parova razlike u poređenju sa prethodne dve vrste (Holst-Jensen et al., 1997). Fulton et al. (1999) su utvrdili genetičku razliku u pet baznih parova ITS regiona rDNK između izolata vrste *M. fructigena* i *M. polystroma*. Značajno variranje u genetičkim osobinama utvrđeno je analizom gena male ribozomalne podjedinice (SSU) koje je pokazalo postojanje introna samo kod izolata *M. fructicola*, ali ne i kod *M. laxa* i *M. fructigena* (Fulton i Brown, 1997; Snyder i Jones, 1999). Međutim, kasnije su utvrđeni izolati bez introna u ovom delu genoma i kod ove vrste (Fulton et al., 1999).

Na osnovu ITS regiona rDNK razvijeno je više molekularnih metoda za detekciju i identifikaciju vrsta roda *Monilinia* među kojima je najzastupljenija metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) (Förster i Adaskaveg, 2000; Hughes et al., 2000; Ioos i Frey, 2000; Boehm et al., 2001; Ma et al., 2003; Gell et al., 2007). Hughes et al. (2000), Ioos i Frey (2000) i Gell et al. (2007) dizajnirali su prajmere za specifičnu detekciju *M. fructicola*, *M. fructigena* i *M. laxa*. Förster i Adaskaveg (2000), Boehm et al. (2001) i Ma et al. (2003) napravili su prajmere koji mogu

razdvajati i specifično detektovati *M. fructicola* i *M. laxa*. Snyder i Jones (1999) su na osnovu građe ITS1 regiona razvili metodu analize polimorfizma dužine restrikcionihi fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) u kojoj se digestijom PCR produkata sa *MseI* restrikcionihi enzimom omogućava razlikovanje *M. laxa* i *M. fructicola*.

Iako je većina molekularnih metoda detekcije i identifikacije vrsta roda *Monilinia* zasnovana na varijabilnosti u ITS regionu rDNK, i osobine drugih genskih regiona su se pokazale uspešnim za karakterizaciju i identifikaciju vrsta ovog roda. Cote et al. (2004) su razvili Multiplex PCR metodu koja omogućava istovremenu pouzdanu detekciju *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* i *M. polystroma* upotrebom specifičnih prajmera zasnovanihi na delu genoma nepoznate funkcije.

Prema podacima OEPP/EPP0 (2009) prajmeri koje su dizajnirali Hughes et al. (2000), Ioos i Frey (2000) i Cote et al. (2004) uspešno razdvajaju četiri najznačajnije vrste roda *Monilinia*. U našoj zemlji su prisutne i ekonomski značajne *M. fructigena* i *M. laxa*, a od nedavno je utvrđeno prisustvo karantinske *M. fructicola* na plodovima jabuke (Vasić et al., 2012) i nektarine (Hrustić et al., 2013), kao i *M. polystroma* na plodovima jabuke (Vasić et al., 2013). Prisustvo i ove dve vrste roda *Monilinia* u našoj zemlji od kojih je jedna karantinska i druga nova vrsta podstaklo je detaljnija ispitivanja. Cilj ovog rada je bio da se ispita i standardizuje brza i pouzdana metoda molekularne detekcije korišćenjem različitih parova prajmera u PCR metodi i da se utvrdi njihova specifičnost i mogućnost korišćenja u identifikaciji četiri ekonomski značajne vrste gljiva ovog roda.

Materijal i metode

Izolati *Monilinia* spp.

Korišćeni su izolati vrsta roda *Monilinia* iz zaraženih plodova jabuke iz kolekcije Laboratorije za postžetvenu fitopatologiju Katedre za fitopatologiju, Univerziteta u Beogradu – Poljoprivrednog fakulteta i referentni izolati poreklom iz Italije (prof. Mari, Univerzitet u Bolonji) i Japana (dr van Leeuwen, Wageningen, Holandija). Izolati iz Srbije su prethodno okarakterisani i potvrđena je njihova patogenost (Vasić, 2016; Vasić et al., 2016). U ispitivanja su uključeni sledeći izolati vrsta roda *Monilinia*: *M. fructigena* (MFSRB-1, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-2, MFSRB-10 i referentni izolat MCG, poreklom iz Italije), *M. laxa* (MLX-SV1, MLX-13, MLX-24 i referentni izolat C-28, poreklom iz Italije), *M. fructicola* (MFC-1, MFC-20, MFC-28 i referentni izolat a-100, poreklom iz Italije) i *M. polystroma* (MPSRB-13, MPSRB-20, MPSRB-2, MP-13 i referentni izolat 0603202046, poreklom iz Japana).

Ekstrakcija DNK i PCR

Iz kultura starih sedam dana gajenih na podlozi od krompir-dekstroznog agara (PDA, EMB Chemicals INC. Gibbstown, NJ, USA) sakupljena je vazдушna micelija, homogenizovana u tečnom azotu i urađena ekstrakcija nukleinskih kiselina po CTAB metodi koju su opisali Day i Shatock (1997). Ekstrakt nukleinskih kiselina čuvan je pri temperaturi od -20°C.

PCR metoda je izvedena korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 (White et al., 1990), kao i specifičnih prajmera ITS1Mfgn, ITS4Mfgn, ITS1Mlx, ITS4Mlx, ITS1Mfcl, ITS4Mfcl (Ioos i Frey, 2000), Mfg-R2, MI-Mfg-F2, MI-Mfc-R1, Mfc-F1, Mfc-R1, (Hughes et al., 2000) i MO368-5, MO368-8R, Laxa-R2 i MO368-10R (Cote et al., 2004). Svaka reakciona PCR smeša, ukupne zapremine 25 µl, sadržala je 12,5 µl 2xPCR master mix (Fermentas, Lithuania), po 1 µl svakog prajmera (10 pmol/µl) (Metabion international AG, Germany), 9,5 µl vode i po 1 µl ekstrahovane DNK, dok je u Multiplex PCR metodi reakciona smeša sadržavala po 0,5 µl svakog prajmera (10 pmol/µl). Kao negativna kontrola korišćena je reakciona PCR smeša uz dodavanje vode umesto ciljane DNK.

Uslovi izvođenja PCR metode sa prajmerima ITS1/ITS4 bili su sledeći: početna denaturacija 2 min pri temperaturi od 94°C, zatim 30 ciklusa: denaturacija 30 s pri 94°C; hibridizacija 30 s pri 55°C; elongacija 30 s pri 72°C i finalna elongacija 10 min pri 72°C. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 550 bp.

Uslovi izvođenja PCR metode korišćenjem prajmera Ioos i Frey (2000) obuhvatili su početnu denaturaciju 3 min pri temperaturi od 94°C, zatim 30 ciklusa: denaturacija 30 s pri 94°C; hibridizacija 30 s pri 62,5°C; elongacija 1,5 min pri 72°C i finalna elongacija 10 min pri temperaturi od 72°C. U PCR metodi upotrebom prajmera ITS1Mfgn/ITS4Mfgn pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 350 bp specifičnih za *M. fructigena*, upotrebom prajmera ITS1Mlx/ITS4Mlx pojava amplikona veličine oko 350 bp specifičnih za *M. laxa* i upotrebom prajmera ITS1Mfcl/ITS4Mfcl pojava amplikona veličine oko 350 bp specifičnih za *M. fructicola*.

Uslovi izvođenja PCR metode sa prajmerima koje su dizajnirali Hughes et al. (2000) bili su: početna denaturacija 2 min pri temperaturi od 94°C, zatim denaturacija 1 min pri 94°C, hibridizacija 1 min pri 59°C, elongacija 1,5 min pri 72°C u 27 ciklusa za prajmere Mfc-F1/Mfc-R1 i 30 ciklusa za prajmere MI-Mfg-F2/MI-Mfc-R1 i ITS1/Mfg-R2 i finalna elongacija 10 min pri temperaturi od 72°C. Korišćenjem prajmera ITS1/Mfg-R2 pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 460 bp specifičnih za *M. fructigena*, upotrebom prajmera MI-Mfg-F2/MI-Mfc-R1 pojava amplikona veličine oko 280 bp specifičnih za *M. laxa* i upotrebom prajmera Mfc-F1/Mfc-R1 pojava amplikona veličine oko 280 bp specifičnih za *M. fructicola*.

Uslovi izvođenja PCR metode sa prajmerima koje su opisali Cote et al. (2004) bili su: početna denaturacija 2 min pri temperaturi od 95°C, zatim 35 ciklusa: denaturacija 15 s pri 95°C; hibridizacija 15 s pri 60°C; elongacija 1 min pri 72°C i finalna elongacija 3 min pri 72°C. U PCR metodi korišćenjem prajmera MO368-8R/MO368-5 pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 402 bp specifičnih za *M. fructigena* i amplikona veličine oko 425 bp specifičnih za *M. polystroma*, upotrebom prajmera Laxa-R2/MO368-5 pojava amplikona veličine oko 351 bp specifičnih za *M. laxa* i korišćenjem prajmera MO368-10R/MO368-5 pojava amplikona veličine oko 535 bp specifičnih za *M. fructicola*.

Nakon izvedene PCR metode (Biometra GmbH, Germany), vizuelizacija PCR produkata obavljena je elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu koji je obojen etidijum bromidom (0,5 µg/ml) i posmatran pomoću UV transiluminatora (Vilber Lourmat, France).

Rezultati i diskusija

Kod svih ispitivanih izolata *Monilinia* spp. upotrebom prajmera ITS1/ITS4 dobijeni su amplikoni očekivanih veličina oko 550 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije, čime je potvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina u uzorcima.

Primenom prajmera dizajniranih od strane Ioos i Frey (2000) ITS1Mlx/ITS4Mlx amplikoni veličine oko 350 bp dobijeni su kod svih izolata *M. laxa*, dok kod negativne kontrole, kao i ispitivanih izolata *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* nije došlo do amplifikacije. Korišćenjem prajmera ITS1Mfcl/ITS4Mfcl amplikoni veličine oko 350 bp dobijeni su kod svih izolata *M. fructicola*. Ovi prajmeri nisu amplifikovali negativnu kontrolu, kao ni ispitivane izolate *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa*. Upotrebom prajmera ITS1Mfgn/ITS4Mfgn, amplikoni veličine oko 350 bp dobijeni su kod izolata *M. fructigena* i *M. polystroma*, dok kod izolata *M. fructicola* i *M. laxa*, kao i negativne kontrole nije došlo do amplifikacije.

Primenom prajmera dizajniranih od strane Hughes et al. (2000) MI-Mfg-F2/MI-Mfc-R1 dobijeni su amplikoni veličine oko 280 bp kod svih izolata *M. laxa*, dok kod negativne kontrole, kao i ispitivanih izolata *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* nije došlo do amplifikacije. Primenom prajmera Mfc-F1/Mfc-R1 dobijeni su amplikoni veličine oko 280 bp samo kod izolata *M. fructicola*. Ovi prajmeri nisu amplifikovali negativnu kontrolu, kao ni ispitivane izolate *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa*. Upotrebom prajmera ITS1/Mfg-R2 dobijeni su amplikoni veličine oko 460 bp kod svih izolata *M. fructigena* i *M. polystroma*, dok kod negativne kontrole, kao i ispitivanih izolata *M. laxa* i *M. fructicola* nije došlo do amplifikacije.

Prajmeri specifični za detekciju *M. fructicola* i *M. laxa* (Hughes et al., 2000; Ioos i Frey, 2000) u ovim ispitivanjima bili su specifični za ove dve vrste roda *Monilinia* (tabela 1).

Tabela 1. Pogodnost različitih specifičnih prajmera za molekularnu detekciju *Monilinia* spp.

Table 1. Suitability of different PCR primers for detection of *Monilinia* spp.

Vrsta Species	Izolati Isolates	PCR produkti/PCR products									
		Ioos i Frey (2000)			Hughes et al. (2000)			Cote et al. (2004)			
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	D
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-6	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-10	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MCG	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>M. polystroma</i>	MP-13	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	MPSRB-20	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	MPSRB-2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	MPSRB-13	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	0603202046	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. fructicola</i>	MFC-20	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	MFC-1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	MFC-28	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	a-100	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	MLX-13	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	MLX-24	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	C-28	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

A: amplikon specifičan za *M. fructigena*; B: amplikon specifičan za *M. laxa*; C: amplikon specifičan za *M. fructicola*; D: amplikon specifičan za *M. polystroma*; + pojava amplikona specifične veličine; - nije došlo do amplifikacije.

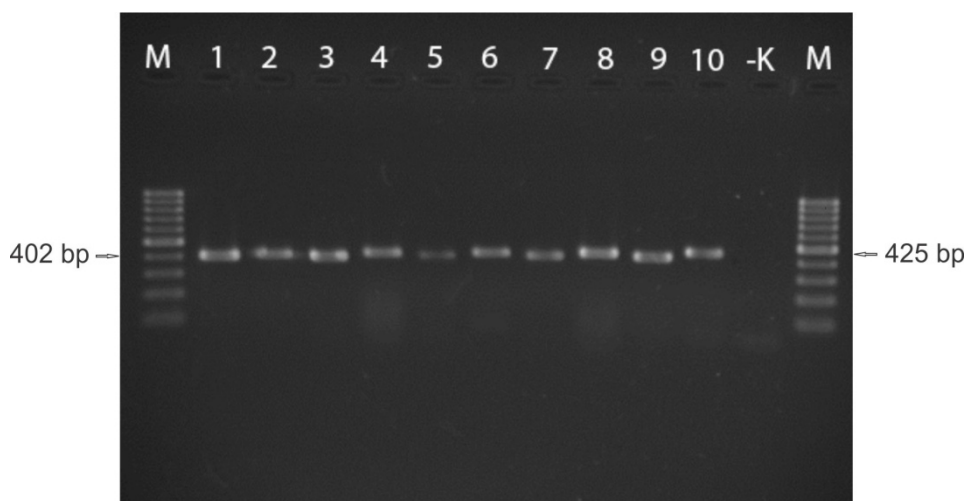
A: *M. fructigena*-specific product; B: *M. laxa*-specific product; C: *M. fructicola*-specific product; D: *M. polystroma*-specific product; '+' and '-' indicate the presence and absence of specific band patterns, respectively.

Međutim, prajmeri koje ovi autori navode kao specifične za *M. fructigena* su u sprovedenim istraživanjima pored izolata *M. fructigena*, amplifikovali i izolate *M. polystroma* (tabela 1). Razlog može biti što su Ioos i Frey (2000) i Hughes et al. (2000) dizajnirali ove prajmere pre opisa *M. polystroma* kao nove vrste (van

Leeuwen et al., 2002). *M. polystroma* se od *M. fructigena* razlikuje u pet nukleotida u sekvenci ITS rDNK regiona (Fulton et al., 1999). Hu et al. (2011) su takođe pokazali da prajmeri specifični za *M. fructigena* dizajnirani od strane Ioos i Frey (2000) mogu da amplifikuju *M. yunnanensis*, koja je na osnovu molekularnih osobina ITS rDNK veoma slična *M. fructigena* i *M. polystroma*.

Zbog male intraspezijske varijabilnosti ITS rDNK regiona vrsta roda *Monilinia*, ovaj region je pogodan za njihovu identifikaciju (Carbone i Kohn, 1993; Holst-Jensen et al., 1997; Fulton et al., 1999). Kod *M. fructigena* i *M. polystroma* razlika od pet nukleotida u sekvenci ITS rDNK regiona nije dovoljno velika da bi se na osnovu nje mogli dizajnirati specifični prajmeri. Međutim, ova genetička razlika ITS rDNK regiona *M. fructigena* i *M. polystroma* je poslužila za razvijanje druge molekularne metode (PCR-RFLP) za specifičnu detekciju *M. polystroma* zasnovane na digestiji ITS1/ITS4 PCR produkata restrikcijom *Hha* I enzimom (Vasić et al., 2016).

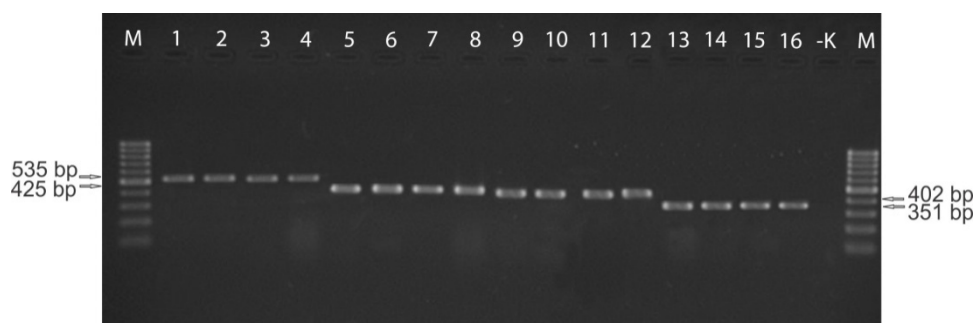
U PCR metodi razvijenoj od strane Cote et al. (2004), korišćenjem prajmera MO368-8R/MO368-5, amplikoni veličine oko 402 bp dobijeni su samo kod izolata *M. fructigena*, dok su amplikoni veličine 425 bp dobijeni samo kod izolata *M. polystroma* (slika 1).



Slika 1. 1,5% agarozni gel sa amplikonima dobijenim korišćenjem prajmera MO368-8R/MO368-5 u PCR metodi (Cote et al., 2004). M-marker 100 bp; 1,3,5,7,9 – izolati *M. fructigena*; 2,4,6,8,10 – izolati *M. polystroma*; -K – negativna kontrola.

Figure 1. 1.5% agarose gel with amplification products obtained with MO368-8R/MO368-5 primers in PCR (Cote et al., 2004). M 100-bp ladder; 1,3,5,7,9 – isolates of *M. fructigena*; 2,4,6,8,10 – isolates of *M. polystroma*; -K – negative control.

Upotrebom prajmera Laxa-R2/MO368-5 ampliconi veličine oko 351 bp dobijeni su samo kod izolata *M. laxa*, dok su prajmerima MO368-10R/MO368-5 ampliconi veličine oko 535 bp dobijeni samo kod izolata *M. fructicola*. Kod negativnih kontrola nije došlo do amplifikacije. U Multiplex PCR metodi dobijeni su ampliconi odgovarajuće veličine kod izolata sve četiri ispitivane vrste (slika 2).



Slika 2. 1,5% agarozni gel sa ampliconima dobijenim Multiplex PCR metodom (Cote et al., 2004). M-marker 100 bp; 1,2,3,4 – izolati *M. fructicola*; 5,6,7,8 – izolati *M. polystroma*; 9,10,11,12 – izolati *M. fructigena*; 13,14,15,16 – izolati *M. laxa*; -K – negativna kontrola.

Figure 2. 1.5% agarose gel with amplification products obtained in Multiplex PCR (Cote et al., 2004). M 100-bp ladder; 1,2,3,4 – isolates of *M. fructicola*; 5,6,7,8 – isolates of *M. polystroma*; 9,10,11,12 – isolates of *M. fructigena*; 13,14,15,16 – isolates of *M. laxa*; -K – negative control.

Prajmeri koje su dizajnirali Cote et al. (2004) na osnovu dela genoma čija je funkcija nepoznata, uspešno su amplifikovali i razdvojili ispitivane izolate *M. fructigena* i *M. polystroma*, kao i ostale dve vrste *M. fructicola* i *M. laxa* (tabela 1). PCR metoda razvijena od strane Cote et al. (2004) se pokazala kao efikasna, pouzdana i brza za detekciju sve četiri vrste roda *Monilinia*.

Vrste roda *Monilinia* su ekonomski značajni patogeni jabučastih i koštičavih voćaka. Dve od četiri ispitivane vrste prisutne u Srbiji imaju karantinski status, *M. fructicola* u Evropi i Srbiji, a *M. fructigena* u Severnoj Americi i Australiji (OEPP/EPPO, 2009; CABI, 2016). Iako je biologija ovih vrsta slična, razlike između njih određuju pojavu i zastupljenost pojedinih vrsta, što se odražava i na ekonomske štete koje nastaju njihovom pojavom (Byrde i Willetts, 1977; van Leeuwen et al., 2002). *M. polystroma* se odlikuje visokom virulentnošću kao *M. fructigena*, ali za razliku od nje intenzivnije i kompleksnije stromatizacije plodova što joj omogućava bolju adaptaciju i održavanje u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine (Vasić et al., 2016), a time i veću postojanost primarnog inokuluma. Zbog toga razvijanje pouzdane metode detekcije doprinosi pravilnoj identifikaciji prouzrokovaca, omogućava praćenje promena u zastupljenosti pojedinih vrsta, što

kao krajnji cilj ima primenu efikasnih mera zaštite biljaka od bolesti koje vrste roda *Monilinia* prouzrokuju.

Zaključak

Primenom PCR metode specifična molekularna detekcija *M. fructicola* postignuta je korišćenjem prajmera ITS1Mfc1/ITS4Mfc1 i Mfc-F1/Mfc-R1, a vrste *M. laxa* korišćenjem prajmera ITS1Mlx/ITS4Mlx i Ml-Mfg-F2/Ml-Mfc-R1. Prajmeri opisani kao specifični za *M. fructigena* amplifikovali su i izolate *M. polystroma*. Za razdvajanje ove dve vrste, kao i za razlikovanje sve četiri vrste roda *Monilinia* najpogodniji prajmeri bili su MO368-5 u kombinaciji sa MO368-8R, Laxa-R2 i MO368-10R.

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekta III 46008 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Batra, L.R. (1991). *World Species of Monilinia (Fungi): Their Ecology*. Berlin, Germany: Biosystematics and Control.
- Baker, R. (2011). Pest risk assesment of *Monilinia fructicola* for EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal*, 9, 2119. Preuzeto sa www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Boehm, E.W., Ma, Z., & Michailides, T.J. (2001). Species-Specific Detection of *Monilinia fructicola* from California Stone Fruits and Flowers. *Phytopathology*, 91 (5), 428-439.
- Byrde, R.J.W., & Willetts, H.J. (1977). *The Brown Rot Fungi of Fruit. Their Biology and Control*. Oxford: Pergamon Press.
- CABI. (2016). *Monilia polystroma (Asiatic brown rot) Datasheet*. UK: CAB International.
- Carbone, I., & Kohn, L.M. (1993). Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*, 85 (3), 415-427.
- Cote, M.J., Tardif, M.C., & Meldrum, A.J. (2004). Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using Multiplex PCR. *Plant Disease*, 88, 1219-1225.
- Day, J.P., & Shattock, R.C. (1997). Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in Engli and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (4), 379-391.
- Förster, H., & Adaskaveg, J.E. (2000). Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by monilinia-specific DNA primers. *Phytopathology*, 90 (2), 171-178.
- Fulton, C.E., van Leeuwen, G.C.M., & Brown, A.E. (1999). Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 105 (5), 495-500.
- Gell, I., Cubero, J., & Melgarejo, P. (2007). Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6), 2629-2637.

- Holst-Jensen, A., Kohn, L., Jakobsen, K. & Schumacher, T. (1997). Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* (Sclerotiniaceae) based on coding and noncoding rDNA sequences. *American Journal of Botany*, 84 (5), 686-701.
- Hrustić, J., Tanović, B., Mihajlović, M., Delibašić, G., Stanković, I., Krstić, B. & Bulajić, A. (2013). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on nectarine in Serbia. *Plant Disease*, 97, 147.
- Hu, M.J., Cox, D.C., Shnnabel, G., & Luo, C.X. (2011). *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *Plos One*, 6, 1-14.
- Hughes, K.J.D., Fulton, C.E., McCreynolds, D., & Lane, C.R. (2000). Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *EPPO Bulletin*, 30 (3-4), 507-511.
- Ioos, R., & Frey, P. (2000). Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 106 (4), 373-378.
- Ma, Z., Luo, Y., & Michailides, T.J. (2003). Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. *Journal of Phytopathology*, 151, 312-322.
- Munoz, Z., Moret, A., & Bech, J. (2008). Morphological and molecular characterization of *Monilinia* sp. isolates and pathogenicity on apple. *Agrociencia*, 42, 119-128.
- OEPP/EPPO. (2002). *First report of Monilinia fructicola in France*. EPPO Reporting Service. 003. Preuzeto sa <http://www.EPPO.org>
- OEPP/EPPO. (2009). *Monilinia fructicola*. *Bulletin OEPP/EPPO*, 39, 337-343.
- Poniatowska, A., Michalecka, M., & Bielenin, A. (2013). Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 855-865.
- Snyder, C.L., & Jones, A.L. (1999). Genetic variation between isolates of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21, 70-77.
- van Leeuwen, G.C.M., Baayen, B.P., Holb, I.J., & Jeger, M.J. (2002). Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research*, 106, 441-451.
- Vasić, M. (2016). *Karakterizacija Monilinia spp. patogena plodova jabuke u Srbiji i različiti aspekti njihove kontrole*. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet.
- Vasić, M., Duduk, N., Ivanović, M.M., Obradović, A., & Ivanović, M.S. (2012). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on stored apple in Serbia. *Plant Disease*, 96, 456.
- Vasić, M., Duduk, N., & Ivanović, M. (2013). First report of brown rot caused by *Monilia polystroma* on apple in Serbia. *Plant Disease*, 97, 145.
- Vasić, M., Duduk, N., Vico, I., Rančić, D., Pajić, V., & Backhouse, D. (2016). Comparative study of *Monilinia fructigena* and *Monilia polystroma* on morphological features, pathogenicity, RFLP analysis and histopathology. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 15-30.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. U M.A. Innis, D.H. Gelfi, J.J. Sninsky, & T.J. White (Ur.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. (315-322). New York, USA: Academic Press.
- Wormald, H. (1954). *The Brown Rot Diseases of Fruit Trees*. Her majesty'Stationery Office. London.

Primljeno: 23. januara 2017.

Odobreno: 23. aprila 2017.

SUITABILITY OF DIFFERENT PRIMERS FOR SPECIFIC MOLECULAR
DETECTION OF *MONILINIA* SPP.

Nataša D. Duduk*, Miljan M. Vasić, Nina R. Vučković,
Aleksandra A. Žebeljan and Ivana M. Vico

University of Belgrade, Faculty of Agriculture,
Nemanjina 6, 11080 Belgrade-Zemun, Serbia

A b s t r a c t

Monilinia spp. are economically important pathogens of pome and stone fruits. Four *Monilinia* species are present in Serbia – *Monilinia fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* and *Monilia polystroma*. As detection and identification of *Monilinia* species are complex, the aim of this research was to evaluate species-specific primers in PCR in order to standardize fast and reliable molecular methods for differentiation between the four *Monilinia* species. Isolates of *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* and *M. polystroma* from apple fruit and referent isolates from Italy and Japan were used for testing. Specific molecular detection of *M. laxa* was obtained using ITS1Mlx/ITS4Mlx and MI-Mfg-F2/MI-Mfc-R1 primer pairs, and *M. fructicola* using ITS1Mfcl/ITS4Mfcl and Mfc-F1/Mfc-R1 primer pairs. ITS1Mfgn/ITS4Mfgn and ITS1/Mfg-R2 primer pairs, described as *M. fructigena* species-specific, amplified *M. fructigena* and *M. polystroma*, as well. Specific detection of these two species as well as of all four tested *Monilinia* species was obtained using the reverse primer MO368-5 with forward primers MO368-8R, Laxa-R2 and MO368-10R in separate or in Multiplex PCR reactions.

Key words: *Monilinia fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola*, *M. laxa*, PCR, Multiplex PCR, molecular identification.

Received: January 23, 2017

Accepted: April 23, 2017

*Corresponding author: e-mail: natasadukic@yahoo.com