



Molekularna identifikacija izolata *Fusarium graminearum*, patogena sirka u Srbiji

Danijela Ristić • Ana Vučurović • Ivana Stanković • Dušan Nikolić •
Janoš Berenji • Branka Krstić • Aleksandra Bulajić

primljeno / received: 14.04.2011. prihvaćeno / accepted: 10.06.2011.
© 2011 IFVC

Izvod: U periodu 2009-2011. na lokalitetima u Bačkom Petrovcu i Čantaviru prikupljeno je i analizirano 39 uzoraka biljaka gajenog sirka (*Sorghum bicolor*) sa simptomima truleži prizemnog dela stabla. Iz biljnog tkiva izolovane su monosporne kulture, čija je patogenost potvrđena pojavom simptoma na veštački inokuliranim biljkama sirka, a na osnovu morfoloških makroskopskih i mikroskopskih osobina identifikovan je *Fusarium graminearum*. Molekularna identifikacija obavljena je primenom lančane reakcije polimeraze (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) uz korišćenje prajmera ef1/ef2 i amplifikaciju kodirajućeg proteinskog gena TEF 1-alfa. Sekvenca TEF gena odabranog izolata 535-10 (JF747146) je pokazala 98% do 99% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 63 izolata *Gibberella zeae* deponovanih u NCBI bazi podataka. Amplifikacijom barkoding dela genoma *F. graminearum* izolata iz sirka dat je doprinos bržoj i preciznijoj identifikaciji i karakterizaciji vrsta roda *Fusarium* u Srbiji.

Cljučne reči: *Fusarium graminearum*, molekularna identifikacija, morfološke osobine, sirak, TEF gen, testovi patogenosti

Uvod

Sirak (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) spada među najstarije gajene biljke, a po površinama i značaju četvrto je uzgajano žito i krmni usev u svetu, posle pirinča, pšenice i kukuruza (Kazanas & Fields 1981). Po površinama na kojima se sirak metlaš gaji, Srbija se ubraja među vodeće proizvođače ove biljke u Evropi, pa i u svetu. Šezdesetih godina je sa oko 7.500 ha tadašnja Jugoslavija bila na prvom mestu među evropskim zemljama po proizvodnji sirka metlaša. Poslednjih godina ova industrijska biljka gaji se pretežno na severu i jugu Vojvodine (Berenji 1990) i realno je očekivati da nivo proizvodnje dostigne 4.000-5.000 ha (Berić 2000).

Fusarium graminearum Schwabe [teleomorfni stadijum *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch] je opšte rasprostranjen patogen koji prouzrokuje palež klijanaca, trulež korena i prizemnog dela stabla i

plesnivost semena, klipa i klasa velikog broja biljaka kao što su strna i prosolika žita, pšenica, ječam, ovas, kukuruz, gajeni i divlji sirak (Lević 2008) i druge ratarske, povrtarske biljke i korovi (Chongo et al. 2001, Burlakoti et al. 2008, Lević 2008). Zbog svog značaja u prirodi i kompleksnosti, većina autora koja istražuje *F. graminearum* opredelila se da koristi ime anamorfnog stadijuma, što su i autori ovog rada usvojili. Bolesti koje uzrokuje *F. graminearum* svrstavaju se u one koje su iznenada ponovo privukle pažnju (*re-emerging diseases*) pričinjavajući velike štete (McMullen et al. 1997). Agroekološki uslovi u Srbiji pogoduju pojavi patogenih i toksigenih vrsta roda *Fusarium* u širim razmerama i ukupno je do sada identifikovano 63 vrste, 35 varijeteta i 19 specijalizovanih formi osnovnih vrsta (Lević et al. 2009). U Srbiji su vrste roda *Fusarium* izolovane sa preko 100 biljnih vrsta, a sa ekonomskog aspekta najznačajnije su kao prouzrokovali fuzarioza kukuruza i pšenice (Lević 2008). Osim *F. graminearum*, u semenu sirka u Srbiji ustanovljeno je prisustvo *F. equiseti*, *F.*

D. Ristić (✉) • A. Vučurović • I. Stanković • D. Nikolić • B. Krstić • A. Bulajić
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija
e-mail: risticdaca@yahoo.com

J. Berenji
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekata TR 31073 „Unapređenje proizvodnje kukuruza i sirka u uslovima stresa“ i III-43001 „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrirana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“, koji su finansirani od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

prolifertatum, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum* i *F. verticillioides* (Lević et al. 2003, 2008, 2009).

Mada se različiti izolati i vrste roda *Fusarium* tradicionalno i istorijski grupišu u sekcije na osnovu morfoloških i fizioloških sličnosti, činjenica da se poslednje dve decenije opisuje veliki broj novih vrsta uporedo sa uvođenjem molekularnih metoda istraživanja, ukazala je na potrebu revizije važeće klasifikacije (Kristensen et al. 2005). Ispitujući pogodnost različitih molekularnih metoda za identifikaciju, naročita pažnja je posvećena sekvencioniranju pojedinih delova genoma i ocenjivanju njihove pogodnosti kao taksonomskih markera. Među prvim, ispitana je mogućnost korišćenja gena koji kodiraju ribozomalnu RNA i ITS region koji se često koriste kod drugih vrsta gljiva, ali koji se kod *Fusarium* vrsta nisu pokazali pogodnim (O'Donnell & Cigelnik 1997). Od više ispitanih gena, ustanovljeno je da je gen koji kodira translacioni faktor izduživanja 1-alfa (TEF, *translation elongation factor 1-alpha*) odgovarajući pojedinačni marker gen koji je visoko informativan za razlikovanje srodnih vrsta ovog roda (Geiser et al. 2004).

Osnovni cilj sprovedenih istraživanja bio je da se prethodno okarakterisani izolati *F. graminearum*, koji su izolovani iz različitih biljnih delova sirka, identifikuju primenom molekularnih metoda, amplifikacijom barkoding dela genoma, što predstavlja uvođenje novih perspektiva u proučavanje vrsta roda *Fusarium* u Srbiji, čime bi se dao doprinos bržoj i preciznijoj identifikaciji i karakterizaciji ove vrste.

Materijal i metod

Sakupljanje uzoraka obolelih biljaka i izolacija patogena

U periodu 2009-2011. na lokalitetima u Bačkom Petrovcu i Čantaviru prikupljeno je i analizirano 39 uzoraka biljaka sirka različitih formi (sirak metlaš i sirak za zrno) sa simptomima truleži prizemnog dela stabla, kao i prezimeli zaraženi ostaci sirka. Sa prizemnog dela stabla prikupljenih uzoraka obavljena je izolacija na krompirdekstroznu podlogu (PDA) prema standardnim fitopatološkim metodama. U cilju dobijanja uniformih i čistih kultura, nakon 7 dana razvoja inicijalnih kolonija izvršena je monosporna izolacija gljive na podlogu sa sterilnim fragmentima lista karanfila (CLA) (Fisher et al. 1982).

Provera patogenosti

Test provere patogenosti svih dobijenih monospornih izolata obavljen je u uslovima stakle-

nika na sejancima sirka u fenofazi bokorenja. Inokulacija biljaka obavljena je injektiranjem sterilnim špricom 2-3 ml suspenzije konidija gljive. Suspenzija konidija pripremljena je od kultura odabranih izolata starih sedam dana, koje su odgajane na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C i fotoperiodu u trajanju od 12 sati. U razvijene kolonije nalivena je sterilna voda, nakon čega su konidije oslobođene pomoću staklenog štapića. Koncentracija dobijene suspenzije podešena je na 1×10^3 konidija po ml pomoću hemocitometra. Tako pripremljenom suspenzijom inokulisano je 10 biljaka, a kao negativna kontrola korišćeni su sejanci sirka inokulisani sterilnom vodom. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrивane najlonom koji je nakon dva dana uklonjen. Pojava simptoma posmatrana je do dve nedelje po inokulaciji. Sa prizemnog dela stabla na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji.

Morfološke karakteristike

Preliminarna identifikacija obavljena je na osnovu proučavanja morfoloških makroskopskih i mikroskopskih osobina gljive na hranljivim podlogama prema kriterijumima Summerell et al. (2003). Proučavanje makroskopskih morfoloških osobina obuhvatilo je praćenje brzine razvoja i ocenu fenotipskih karakteristika kolonija na PDA podlozi. Ispitivanje mikroskopskih morfoloških osobina reproduktivnih organa obuhvatilo je utvrđivanje oblika i dimenzija makrokonidija, kao i prisustva ili odsustva mikrokonidija i hlamidospora prema metodi Burgess et al. (1994), mikroskopiranjem kultura izolata starosti 10-14 dana, odgajanih na CLA podlozi, pri cikličnom smenjivanju svetlosti i tame u intervalima od po 12 sati. Prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivana je veličina konidija. Direktnim mikroskopiranjem određivani su izgled i dimenzije tvorevina polnog razmnožavanja - peritecija gljive u prirodno zaraženim stabljikama sirka.

Molekularna detekcija i identifikacija

Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR, *polymerase chain reaction*) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *F. graminearum* poreklom iz *Sorghum bicolor* (sorta Gold) sa lokaliteta Čantavir. Za ova ispitivanja odabran je uzorak 535-10, koji je dobijen izolacijom iz biljaka sa simptomima truleži prizemnog dela stabla sirka i uzorak 14-11 iz prezimele zaražene stabljike sirka sa formiranim peritecijama. Ekstrakcija DNK obavljena je na tri načina: 1)

iz micelije čiste kulture patogena odgajenog na tečnoj PB podlozi (zamrznute na -80°C); 2) iz vazdušne micelije sakupljene direktno iz kolonija odgajenih na PDA podlozi, i 3) iz peritecija koje su sterilnim skalpelom direktno nanošene u mikrotubicu za ekstrakciju. Ekstrakcija DNK izvršena je primenom DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. PCR reakcija obavljena je sa ef1/ef2 parom prajmera (Geiser et al. 2004) koji omogućavaju amplifikaciju kodirajućeg proteinskog gena TEF 1-alfa. PCR reakcija je obavljena u radnoj zapremini od 25 μl , korišćenjem 12,5 μl 2X PCR Master miksa (K071, Fermentas, Lithuania), 9 μl RNase-free vode, po 1,25 μl svakog prajmera (100 pmol/ μl) i 1 μl ekstrahovane ukupne DNK. Kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK. PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min pri 94°C ; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 1 min pri 94°C , hibridizacije 1 min pri 53°C , elongacije 2 min pri 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min.

Vizuelizacija dobijenih produkata izvršena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu, koji je nakon bojenja u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ posmatran pod UV transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Umnoženi fragment izolata 535-10, nakon prečišćavanja pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) poslat je na uslužno sekvencioniranje u oba smera u BMR Genomics (Padova, Italy). Dobijena sekvencija je obrađena u programu FinchTV Version 1.4.0., nakon čega je određena konsenzus nukleotidna sekvencija i podneta u National Center for Biotechnology Information (NCBI) banku podataka, posle čega joj je dodeljen pristupni broj (*GenBank Accession Number*).

Višestruko poređenje dobijene sekvence sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) izvršeno je pomoću BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) analize i softverskog paketa MEGA verzija 4.0. (Tamura et al. 2007). Proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti dobijene sekvence odabranog izolata sa odgovarajućim sekvencama izolata iz drugih delova sveta, obavljena je takođe korišćenjem MEGA programa.

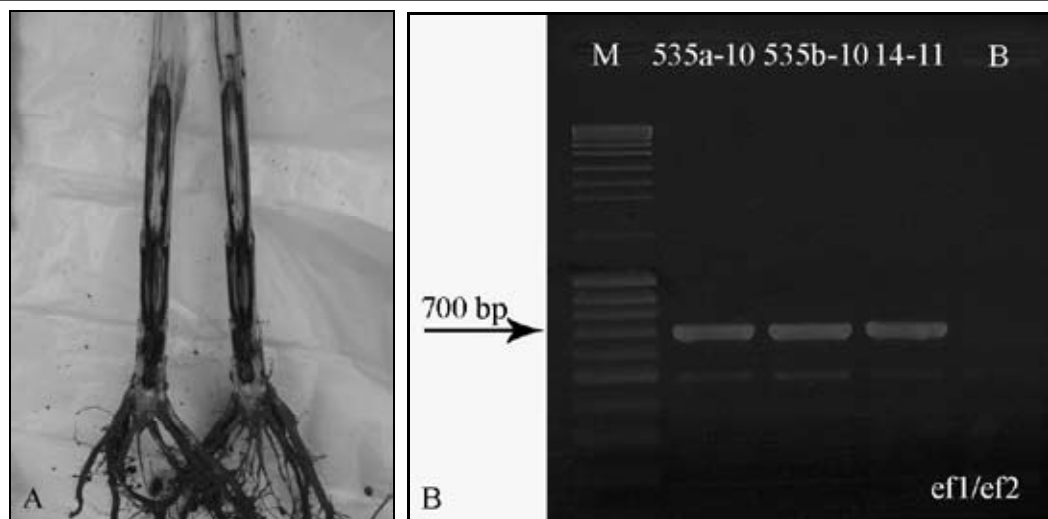
Rezultati i diskusija

Simptomi bolesti i konvencionalna identifikacija

Tokom pregleda ogledne parcele sirka u Bačkom Petrovcu i proizvodnog zasada u Čantaviru tokom 2009. i 2010. zabeležena je pojava intenzivnih simptoma fuzariozne truleži stabla. Procenjena zaraženost pregledanih biljaka sirka u Čantaviru bila je veoma visoka, a sušenje i brzo propadanje zaraženih biljaka rezultiralo je procenjenim gubicima od preko 90%. Brojni autori saopštavaju o direktnim štetama i ekonomskom značaju zaraza različitih useva sa *F. graminearum* (Aoki & O'Donnell 1999, Burlakoti et al. 2009, Vogelgslang et al. 2009, Alvarez et al. 2010). Usled jake pojave bolesti došlo je do lomljenja i poleganja stabla što je otežalo ili potpuno onemogućilo žetvu. Zaražene biljke ispoljavale su simptome prvenstveno na prizemnom delu stabla u vidu mrkih pega, koje su se dalje širile na internodije, dok je korenov sistem u većoj meri bio razoren. Na uzdužnom preseku obolelog tkiva uočena je dezorganizovana srž tamnomrke ili ružičaste boje (Sl. 1A).

Izolacijom iz zaraženih biljaka sirka dobijen je veći broj kultura monospornih izolata, od kojih su za dalji rad odabrane kolonije koje po morfološkim karakteristikama odgovaraju *F. graminearum*. Na prezimelim zaraženim ostacima sirka, u toku proleća 2011. oko donjih nodusa i oko osnove inficiranog stabla uočeno je prisustvo ovalnih i crnih peritecija u grupama. Provera patogenosti odabranih izolata obavljena je tako što su u uslovima postavljenog eksperimenta reprodukovani simptomi prirodne infekcije. Prve promene tkiva na stablu sirka, koje je veštački zaražavano injektiranjem suspenzije konidija patogena, uočene su već 3-5 dana od inokulacije. U početku razvoja simptoma uočena je pojava crvenkastosmeđih sitnih pega u osnovi stabla. Jasno vidljive promene boje vaskularnog tkiva, primarnog korena i čvora bokorenja uočene su sedam dana nakon inokulacije. Simptomi su po izgledu u potpunosti odgovarali simptomima na prirodno zaraženim biljkama. Na biljkama koje su kao negativna kontrola tretirane sterilnom vodom umesto suspenzijom konidija patogena, nije došlo do pojave simptoma, niti bilo kakvih promena.

Preliminarna identifikacija odabranih izolata obavljena je standardnim konvencionalnim fitopatološkim metodama. Tokom ispitivanja morfoloških osobina, koje je obavljeno in situ direktno na izvornim zaraženim ostacima biljaka sirka, ustanovljeno je prisustvo tvorevina polnog razmnožavanja, peritecija, koje su se formirale površinski na tankim stromama u grupama oko osnove inficiranog stabla sirka. U dozrelim peritecijama formirali su se izduženi i zaobljeni askusi



Slika 1A. *Fusarium graminearum*: izgled zaraženog korena i stabla *S. bicolor*

1B. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem seta prajmera ef1/ef2. Kolone: M - MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 2 - izolat 535a-10, DNA ekstrahovana iz micelije gajene u tečnoj kulturi; 3 - izolat 535b-10 DNK ekstrahovana iz vazdušne micelije kolonije odgajene na PDA podlozi; 4 - izolat 14-11 iz peritecija, i 5 - negativna kontrola - PCR mix sa vodom

Fig. 1A. *Fusarium graminearum*: appearance of the infected root and stem *S. bicolor*

1B. Electrophoretic analysis of PCR products obtained using primer sets ef1/ef2. Lanes: M - MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 2 - isolate 535a-10 DNA extracted from mycelium grown in liquid culture; 3 - isolate 535b-10 DNA extracted from aerial mycelium from the colony cultured PDA; 4 - isolate 14-11 from perithecia, and 5 - negative control - PCR mix with water

koji najčešće sadrže 4-6 askospora poređanih u nizu. Askospore su prozirne, savijene i zaobljenih krajeva, veličine 17,5-30 x 5-7,5 μm, sa 1-3 septe. Kolonije reprezentativnog izolata 535-10 ispoljile su brz i ravnomeran porast na PDA podlozi. Vazdušna micelija je gusta, pamučasta, ružičaste do ljubičastožućkaste boje s belom ivicom. Makrokonidije su prozirne, prave do umereno srpaste, debelih zidova sa četiri poprečne pregrade, veličine 25-50 x 2,5-7,5 μm. Vršne ćelije su kukaste, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala. Prisustvo mikrokonidija nije ustanovljeno, dok su se okrugle i bledosmeđe hlamospore formirale u nizovima. Sve morfološke makroskopske i mikroskopske osobine u potpunosti su saglasnosti sa rezultatima navedenim u literaturi (Aoki & O'Donnell 1999, Schmale et al. 2005, 2006, Lević 2008).

Molekularna detekcija i identifikacija

Molekularna metoda PCR uspešno je primenjena za detekciju *F. graminearum* uz korišćenje prajmera ef1/ef2. Kod odabranih reprezentativ-

nih uzoraka (535-10 i 14-11) bez obzira na način ekstrakcije, uspešno je došlo do amplifikacije kodirajućeg proteinskog gena TEF 1-alfa. Kod oba ispitivana uzorka, u svim ponavljanjima, rezultati dobijeni PCR reakcijom potvrđuju prisustvo trake procenjene veličine oko 700 bp (Sl. 1B). U svim reakcijama do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog amplifikacijom iz micelije uzorka 535-10, korišćenjem para prajmera ef1/ef2 i obrade sekvenci u FinchTV programu, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u NCBI bazu podataka i dodeljen joj je pristupni broj, JF747146. BLAST analiza sekvence produkta u dužini od 676 bp, pokazala je 98% do 99% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 63 izolata *G. zeae* deponovanih u NCBI bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne različitosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 576 bp. Proračunom genetičke sličnosti korišćenjem softverskog paketa MEGA

verzija 4.0. (Tamura et al. 2007) dobijeni su precizniji rezultati i izolat 535-10 pokazao je najviši stepen nukleotidne identičnosti od 99,8% sa razlikom u jednom nukleotidu, sa sekvencom 41 izolata različitog porekla, od čega su 22 izolata prijavljena kao *F. graminearum* poreklom iz Norveške (AJ543575-AJ543596), osam izolata *G. zeae* poreklom iz USA (AF212455-AF212459, AJ452957, AF107883, GU116585), četiri izolata *G. zeae* poreklom iz Francuske (JF278571, JF278572, JF278591, JF278592), dva izolata *G. zeae* poreklom iz Italije (GQ848544 i GQ848545), dva izolata *G. zeae* poreklom iz Kine (HQ176419 i HQ176421), kao i sa sekvencom po jednog izolata *G. zeae* poreklom iz Australije (GU370497), Danske (AJ601394) i Finske (HM744693). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 98,8% sa razlikom u sedam nukleotida, ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencom *G. zeae* (GU370499) poreklom iz Australije.

Molekularna detekcija, sekvencioniranje i filogenetske analize DNK sekvenci odgovarajućih delova genoma pružaju mogućnost da se preciznije proučava razdvajanje vrsta roda *Fusarium*, da se identifikuju nepoznati izolati, da se ustanove međuodnosi između poznatih vrsta, kao i da se izvrši mapiranje toksikogenih profila vrsta ili grupa vrsta (O'Donnell et al. 1998). DNK sekvence šest gena koji se u genomu nalaze kao pojedinačne kopije, pružilo je osnovu za razdvajanje kompleksa *F. graminearum* (FG kompleks) u devet različitih filogenetskih linija porekla (O'Donnell et al. 2000), koje su posle dodatnih ispitivanja pre svega toksikogenih osobina podignute na nivo vrsta (O'Donnell et al. 2004) koje ispoljavaju različitu rasprostranjenost i učestalost. Do sličnih zaključaka došli su i Zeller et al. (2004) primenom polimorfizma dužine amplifikovanih fragmenata (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*) i analizom 30 lokusa. Ovi autori ustanovili su postojanje osam poljskih populacija koje su bile sa niskim nivoom genotipskog diverziteta. Jedna od vrsta iz FG kompleksa, koja je među prvima izdvojena je *F. pseudograminearum* (nekada poznata kao *F. graminearum* Grupa1). Ove dve vrste su razdvojene na osnovu sekvenci introna i egzona β -tubulin gena i heterotalusnog ponašanja u testovima ukrštanja (Aoki & O'Donnell 1999). Autori Alvarez et al. (2010) navode da je u Argentini, iz kompleksa FG, prisutna samo predominantna *F. graminearum sensu stricto*. Pojedina novija istraživanja dovode u pitanje ovakve rezultate, navodeći da ove filogenetske linije porekla ipak predstavljaju pre genetički i geografski razdvojene populacije koje nisu polno izolovane (Vogelgsang et al. 2009) a koje su deo jedne velike populacije koja se ne

razlikuje u odnosu na biljke domaćine sa kojih su izolovane (Burlakoti et al. 2008). Ovakve rezultate potvrdili su autori Schmale et al. (2006) smatrajući da su ove poljske populacije deo jedne velike regionalne populacije koja nije polno izolovana, da njihove askospore predstavljaju osnovni inokulum koji se vetrom prenosi na velike udaljenosti omogućavajući efikasnu diseminaciju i doprinoseći razmeni genetičkog materijala.

Primena identifikacije *Fusarium* vrsta na osnovu sekvence TEF gena, koji predstavlja značajni deo genoma uključen u složeni mehanizam translacije proteina u ćelijama gljiva, pokazala se pogodnom jer je sekvenca ovog dela genoma visoko informativna na nivou vrste za ceo rod *Fusarium*. Nisu detektovane neortologe kopije gena, i što je veoma značajno, dizajnirani su univerzalni prajmeri koji uspešno amplifikuju ovaj barkoding region kod svih poznatih vrsta ovog roda (Summerell et al. 2003, Geiser et al. 2004, Kristensen et al. 2005).

Zaključak

Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima, uspešna primena protokola za molekularnu identifikaciju *F. graminearum* na osnovu sekvence TEF gena koji kodira translacioni faktor izduživanja 1-alfa, predstavljaju početak i osnovu proučavanja filogeografske distribucije ove značajne vrste u Srbiji. Naročito je značajno što dobijeni rezultati predstavljaju uvod u bližu genetičku karakterizaciju, kao i brzo i lako razlikovanje ove vrste od morfološki sličnih vrsta iz FG kompleksa. Sekvencioniranje većeg broja izolata, uključivanje dodatnih delova genoma, njihovo poređenje i određivanje njihovog međuodnosa i odnosa sa drugim izolatima u svetu doprinosi poznavanju strukture populacije *F. graminearum* iz čega jedino i može da proizađe uspešna strategija kontrole ovog veoma štetnog patogena.

Literatura

- Alvarez LC, Somma S, Moretti A, Fernandez Pinto V (2010): Agressivness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *J. Phytopathol.* 158: 173-181
- Aoki T, O'Donnell K (1999): Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* 91: 597-609
- Berenji J (1990): Varijabilnost i međuzavisnost svojstava u raznih genotipova sirka metlaša, *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 62/63: 7-68
- Berić B (2000): Industrijsko bilje. Novi Sad
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994): *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia
- Burlakoti RR, Ali S, Secor GA, Neate SM, McMullen MP, Adhikari TB (2008): Genetic relationships among populations

- of *Gibberella zeae* from barley, wheat, potato and sugar beet in upper midwest of United States. *Phytopathol.* 98: 969-976
- Chongo G, Gossen BD, Kutcher HR, Gilbert J, Turkington TK, Fernandez MR, McLaren D (2001): Reaction of seedling roots of 14 crop species to *Fusarium graminearum* from wheat heads. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 132-137
- Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA, Nelson PE (1982): Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathol.* 72: 151-153
- Geiser DM, Jimenez Gasco MM, Kang S, Mkalowska I, Veeraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K (2004): FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 473-479
- Kazanas N, Fields ML (1981): Nutritional Improvement of Sorghum by Fermentation. *J. Food Sci.* 46: 819-821
- Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A (2005): Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycol. Res.* 109: 173-186
- Lević J (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Cicero, Beograd
- Lević J, Ivanović D, Stanković S (2003): Paraziti kukuruza, sirka i prosa koji se prenose semenom. *Biljni lekar* 6: 570-577
- Lević J, Kovačević T, Vukojević J, Stanković S (2008): Mikrobiota semena sirka. *Zbornik rezimea IX Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*, 48-49
- Lević TJ, Stanković ŽS, Krnjaja SV, Bočarov-Stančić SA (2009): *Fusarium* species: The occurrence and the importance in agriculture of Serbia. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 116: 33-48
- McMullen M, Jones R, Gallenberg D (1997): Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81: 1340-1348
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997): Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116
- O'Donnell K, Cigelnik E, Casper HH (1998): Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support re-identification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genet. Biol.* 23: 57-67
- O'Donnell K, Kistler H C, Tacke B K, Caspar H H (2000): Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *PNAS USA* 97: 7905-7910
- O'Donnell K, Ward TJ, Geiser DM, Kistler CH, Aoki T (2004): Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* 41: 600-623
- Schmale DG, Leslie JF, Zeller KA, Saleh AA, Shields EJ, Bergstrom GC (2006): Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathol.* 96: 1021-1026
- Schmale DG, Shah AA, Bergstrom GC (2005): Spatial patterns of viable spore depositions of *Gibberella zeae* in wheat fields. *Phytopathol.* 95: 472-479
- Summerell BA, Salleh B, Leslie JF (2003): A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 87: 117-128
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599
- Vogelgsang S, Widmer F, Jenny E, Enkerli J (2009): Characterization of novel *Fusarium graminearum* microsatellite markers in different *Fusarium* species from various countries. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 477-482
- Zeller KA, Bowden RL, Leslie JF (2004): Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from United States. *Mol. Ecol.* 13: 563-571

Molecular Identification of *Fusarium graminearum*, Sorghum Pathogen in Serbia

Danijela Ristić¹ • Ana Vučurović¹ • Ivana Stanković¹ • Dušan Nikolić¹ •
Janoš Berenji² • Branka Krstić¹ • Aleksandra Bulajić¹

¹Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Nemanjina 6, 11080 Belgrade, Serbia

²Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

Summary: A total of 39 samples of sorghum (*Sorghum bicolor*) with symptoms of stem and root rot were collected and analyzed during 2009-2011 in Bački Petrovac and Čantavir, Serbia. Monosporic cultures were isolated from stem tissue, their pathogenicity was confirmed by the development of symptoms on artificially inoculated sorghum plants, and they were identified on the basis of macroscopic and microscopic morphological features as *Fusarium graminearum*. Molecular identification was performed utilizing polymerase chain reaction (PCR) with primer pair ef1/ef2 and by amplification of protein coding TEF 1-alpha gen. Sequence of TEF gene from the selected isolate 535-10 (JF747146) showed 98-99% nucleotide identity with sequences of 63 *Gibberella zeae* isolates deposited in NCBI GenBank. Amplification of the barcoding region of *F. graminearum* genome of sorghum isolate, contributes to the fast and accurate identification and characterization of *Fusarium* species in Serbia.

Key words: *Fusarium graminearum*, molecular identification, morphological features, pathogenicity tests, sorghum, TEF gene