

Primena molekularnih metoda u dijagnostici biljnih bolesti

Miroslav Ivanović¹, Mirjana Koprivica², Svetlana Milijašević³,

Nataša Dukić⁴ i Bojan Duduk⁴

¹Institut "Srbija", Centar za povrtarstvo, Smederevska Palanka,

²Institut "Srbija", Centar za voćarstvo i vinogradarstvo, Čačak,

³Institut "Srbija", Centar za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun-Beograd i

⁴Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd

REZIME

U cilju preduzimanja blagovremenih i efikasnih mera suzbijanja biljnih bolesti, veoma je značajna pouzdana i brza detekcija i identifikacija njihovih prouzrokovaca. Nekada je dijagnoza bila zasnovana samo na simptomatologiji oboljenja, a otkrićem mikroskopa i razvijanjem metoda izolacije i gajenja patogena na hranljivim podlogama ili test-biljkama, kao i primenom seroloških metoda, omogućena je preciznija identifikacija prouzrokovaca.

Sredinom 80-ih razvijena je metoda selektivnog *in vitro* umnožavanja DNK. Uvođenje molekularnih metoda, a posebno metode lančane reakcije polimeraze (PCR), napravilo je prekretnicu u savremenoj dijagnostici, između ostalog i patogena biljaka. Korišćenjem ovih metoda građa genoma uzročnika biljnih bolesti postala je dostupna, čime je omogućen jedan novi način identifikacije i karakterizacije fitopatogenih gljiva, bakterija, virusa i fitoplazmi. Zbog visoke osetljivosti, specifičnosti i brzine izvođenja, molekularne metode su našle primenu u detekciji biljnih patogena, a posebno onih koje je teško ili nemoguće gajiti u uslovima *in vitro*, ili na drugi način brzo identifikovati. Takođe, primenom molekularnih metoda, unapređena su taksonomska istraživanja i bolje definisani odnosi unutar taksonomskih kategorija.

Ključne reči: Molekularne metode; PCR; biljni patogeni; detekcija

UVOD

Tačna dijagnoza bolesti i precizna identifikacija patogena, prouzrokovaca, prvi su koraci u razumevanju biljne bolesti i preduzimanju efikasnih mera suzbijanja. Dijagnoza biljnih bolesti za-

snovana isključivo na simptomatologiji oboljenja, često je nepouzdana s obzirom na to da mnogi patogeni mogu da izazivaju nespecifične i varijabilne simptome, ili su prisutni bez vidljivih simptoma

zaraze (Miller i Martin, 1988). Dijagnoza zasnovana na simptomatologiji mora da bude praćena identifikacijom patogena u laboratoriji korišćenjem mikroskopa, selektivnih hranljivih podloga, biohemijskih i fizioloških testova, biotesta i seroloških metoda.

U mnogim slučajevima klasični put dijagnoze još uvek je najjeftiniji, veoma je jednostavan i ne zahteva skupu opremu. Standardne metode, međutim, imaju brojne nedostatke koje su podsticale istraživanja savremenijih dijagnostičkih procedura. Nekada su potrebni dani, pa i nedelje da bi se identifikovao uzročnik oboljenja. Rezultati nisu uvek pouzdani jer se mnogi mikroorganizmi teško mogu razlikovati samo na osnovu morfoloških ili drugih pokazatelja koji su često promenljivi pod uticajem uslova spoljašnje sredine.

Razvijanjem tehnika molekularne biologije, koje se zasnivaju na detekciji genoma patogena, omogućen je jedan novi način njihove identifikacije i karakterizacije. Uvođenje molekularnih metoda, najpre hibridizacije nukleinskih kiselina, a potom i lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction - PCR), napravilo je prekretnicu u savremenoj dijagnostici uzročnika oboljenja ljudi, životinja i biljaka (Miller i Martin, 1988).

Zbog visoke specifičnosti, osetljivosti i brzine izvođenja, molekularne metode našle su primenu u detekciji patogena biljaka, posebno onih koje je teško ili nemoguće gajiti u *in vitro* uslovima, ili na drugi način brzo identifikovati (Annamalai i sar., 1995). Visoka senzitivnost omogućava detekciju patogena iz jedne spore gljive ili jedne bakterijske ćelije, što omogućava ranu detekciju prisustva patogena, pre pojave vidljivih simptoma (Hu i sar., 1993). Molekularne metode našle su svoju primenu i u detektovanju patogena na semenu ili sadnom materijalu u uslovima latentnih infekcija (Reeves, 1998), kao i kod ispitivanja prisustva karantinskih patogena (Ward i sar., 2004). Primenom ovih metoda unapređena su taksonomska istraživanja i bolje definisani odnosi unutar taksonomskih kategorija, omogućeno je razlikovanje nižih sistematskih kategorija, specijalizovanih formi gljiva ili patogenih varijeteta bakterija, praćenje strukture populacije i njene dinamike (Wallace i Covert, 2000), interakcije biljke i patogena (McCartney i sar., 2003), kao i rezistentnosti na fungicide (Luck i Gillings, 1995).

U detekciji i identifikaciji biljnih patogena koriste se različite metode hibridizacije nukleinskih

kiselina (Dot-blot, Southern blot, Northern blot i dr.), različite varijante PCR metode (Random PCR, RT-PCR, Nested PCR, Immunocapture PCR, Multiplex PCR, Real-time PCR i dr.), polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) i druge, koje su povećale specifičnost i osetljivost detekcije (Henson i French, 1993; Darrasse i sar., 1994; Bereswill i sar., 1995; McManus i Jones, 1995; Cuppels i Ainsworth, 1995; Gallitelli i Saldarelli, 1996).

Hibridizacija nukleinskih kiselina zasniva se na vezivanju jednolančane nukleinske kiseline patogena i jednolančane patogen-specifične komplementarne nukleinske kiseline (probe). Probe su obeležene na različite načine, što omogućava detekciju prisustva patogena (Nikolaeva, 1995).

Lančana reakcija polimeraze (PCR) podrazumeva selektivno *in vitro* umnožavanje fragmenata DNK korišćenjem termostabilne *Taq* polimeraze. U standardnoj PCR metodi koristi se jedan par prajmera. Kod patogena sa RNK, PCR metodi predhodi reverzna transkripcija (RT-PCR). Osetljivost metode može se povećati uvođenjem još jednog para prajmera (Nested PCR). Drugi način da se poveća specifičnost i osetljivost je da se PCR koristi u kombinaciji sa anitelima u tzv. Immunocapture PCR (IC-PCR). U slučajevima kada je potrebno detektovati više različitih patogena istovremeno, koristi se Multiplex PCR. U ovom slučaju nekoliko pari prajmera koristi se u jednoj reakciji (McCartney i sar., 2003).

METODE DETEKCIJE FITOPATOGENIH GLJIVA

Razvoj i korišćenje molekularnih metoda u detekciji fitopatogenih gljiva ima tri osnovna koraka; (1) izbor specifične sekvence nukleotida koja će biti korišćena za identifikaciju patogena, (2) ekstrakcija DNK iz uzorka i (3) metod za identifikaciju prisustva ciljne sekvence u uzorku (McCartney i sar., 2003).

Dva pristupa se koriste za izbor ciljne sekvence DNK; jedan se bazira na korišćenju visokokonzervativnih regiona DNK, zajedničkih za sve gljive, ali unutar kojih se nalaze mesta sa „finim“ varijacijama, a drugi se zasniva na slučajnom izboru dela genoma jedne vrste gljive i testiranju što više izolata te i slične vrste radi utvrđivanja stepena specifičnosti.

Glavni region DNK koji se koristi za dijagnostičke postupke je ribozomalna DNK (rDNK). U okviru rDNK jedinice nalaze se veoma konzervativni regioni, koji su prisutni u skoro svim formama živih organizama. Kod gljiva rDNK se nalazi u jedru i mitohondrijama. Između tri ribozomalna gena u jednoj jedinici nalaze se dva unutrašnja dela, označena kao ITS1 i ITS2. Dve rDNK jedinice su razdvojene sa intergenskim delom koji se označava kao IGS. Regioni koji se nalaze između gena u okviru jedne rDNK jedinice (ITS) ili između njih (IGS) veoma su varijabilni u odnosu na gene i koriste se za detekciju vrste, ali i nižih taksonomskih jedinica (Henson i French, 1993).

Za razliku od korišćenja prajmera dizajniranih na osnovu prethodno određene sekvence ITS regiona rDNK i njenom umnožavanju u reakciji PCR, mogu se koristiti i nasumično odabrani kratki molekuli DNK (do 10 nukleotida), nazvani DNK proba. Probe su obeležene radioaktivnim elementom ili hemijskim markerom koji omogućavaju praćenje pozitivne reakcije (Bridge, 2001). Izbor probe je najznačajniji u detekciji i identifikaciji gljiva. Probe moraju da hibridizuju sa svim izolatima jedne vrste patogena, ali ne i sa drugim vrstama.

Za ekstrakciju DNK iz uzorka se koriste različite metode, a izbor zavisi od vrste i količine početnog materijala. Koriste se čista kultura gljive, zaraženi biljni materijal, zemljište, ili uzorci spora prikupljeni iz vazduha. U nekim situacijama dovoljnu količinu DNK zadovoljavajućeg kvaliteta moguće je dobiti jednostavnim kuvanjem micelije gljive ili zaraženog materijala. Međutim, u većini slučajeva DNK mora biti ekstrahovana i prečišćena posebnim postupcima. U početku razvoja ovih metoda, DNK patogena morala je biti izdvojena iz čiste kulture da bi se sprečila kontaminacija sa DNK biljnog materijala. Danas se DNK patogena može ekstrahovati i direktno iz biljnog tkiva, što je posebno značajno za obligatne parazite koji se ne mogu gajiti na podlozi. Kada se vrši ekstrakcija DNK patogenih gljiva iz zemljišta potrebne su određene modifikacije da bi se uklonile neke inhibirajuće komponente.

Na početku razvoja molekularnih metoda u mikologiji za identifikaciju prisustva ciljne sekvence u uzorku, odnosno za detekciju i identifikaciju gljiva, korišćena je reakcija hibridizacije nukleinskih kiselina. Međutim, razvojem i usavršavanjem PCR, metode sekvencioniranja varijabilnih regiona gljiva

i konstruisanja specifičnih prajmera, metod hibridizacije se danas malo koristi u detekciji samih gljiva, već uglavnom za otkrivanje polimorfizma DNK u kombinaciji sa PCR (Bridge, 2001).

METODE DETEKCIJE FITOPATOGENIH BAKTERIJA

Tradicionalne metode u detekciji i identifikaciji fitopatogenih bakterija, zasnovane na proučavanju njihovih morfoloških i biohemijsko-fizioloških odlika, zahtevaju dosta vremena i materijala (Darrasse i sar., 1994). Za detekciju fitopatogenih bakterija može se koristiti i elektronska mikroskopija, a u novije vreme i brojne serološke metode; aglutinacija na pločici, ELISA-test, imunofluorescencija i „lateral flow strip” testovi. Osetljivost ovih metoda prvenstveno zavisi od specifičnosti odabranih antitela za ciljane ćelije ili njihove komponente. ELISA-test omogućava detekciju fitopatogenih bakterija iako su one prisutne u vrlo niskim koncentracijama u biljci. Rezultati se dobijaju brzo, a osetljivost se može porediti sa osetljivošću molekularnih metoda (Alvarez, 2001). Međutim, primenu ovih metoda u identifikaciji fitopatogenih bakterija otežava postojanje većeg broja seroloških grupa (Darrasse i sar., 1994).

Molekularne metode zasnovane na poznavanju genoma fitopatogenih bakterija veoma su specifične, brze i osetljive. Ključna prednost ovih metoda je u tome što su nezavisne od spoljašnjih uslova, starosti i fiziološkog stanja ciljanog patogena (Louws i Cuppels, 2001). Osim toga, moguće je detektovati bakterije i u veoma niskim koncentracijama, kako u simptomatičnim, tako i u asimptomatičnim uzorcima, što je posebno značajno u detekciji karantinskih bakterija na semenu i sadnom materijalu, kada je izolacijom nemoguće utvrditi njihovo prisustvo (Darrasse i sar., 1994; McManus i Jones, 1995).

Osetljivost PCR reakcije u detekciji fitopatogenih bakterija sa semena, iz uzoraka zemljišta i biljnog tkiva može se uvećati i do sto puta primenom BIO-PCR metode (Louws i Cuppels, 2001), a primenom Nested-PCR osetljivost u detekciji *Erwinia amylovora* povećana je do hiljadu puta (McManus i Jones, 1995). Immunocapture plus PCR, takođe, povećava osetljivost i specifičnost reakcije. Najnovija i najosetljivija je Real-time PCR metoda, pomoću koje je moguće istovremeno kvantifikovati i analizirati produkt tokom PCR umnožavanja.

Prednost se sastoji u tome što se na ovaj način može eliminisati "Southern blot" koji se koristi za potvrdu identiteta umnoženog produkta (Louws i Cuppels, 2001). Identifikacija bakterija Rep-PCR metodom zasniva se na činjenici da se svaki patogen, identifikovan do nivoa vrste ili patogenog varijeteta, sastoji od sojeva koji poseduju jednu ili više različitih Rep-PCR molekularnih profila, što je korisno u identifikaciji bakterija koje izazivaju slične simptome, kao i za detekciju diverziteta u okviru vrste (Bouzar i sar., 1999).

METODE DETEKCIJE FITOPATOGENIH VIRUSA

U detekciji virusnih bolesti konvencionalna metoda je biotest. To je pouzdana i osetljiva metoda detekcije virusa, ali je vremenski zahtevna i često uslovljena brojnim faktorima. Detekcija virusne prirode oboljenja moguća je upotrebom elektronske mikroskopije. To je vrlo osetljiva metoda i omogućava detekciju virusa i u jako niskim koncentracijama. Uvođenje imunoelektronske mikroskopije omogućava specifično otkrivanje pojedinih virusa (Krstić i Tošić, 1994). Međutim, upotreba elektronske mikroskopije jako je skupa i koristi se uglavnom za fundamentalna istraživanja. Serološke metode, zasnovane na osobinama pre svega proteinskog omotača virusa, kao i drugih virusno-kodiranih proteina, široko su korišćene u ispitivanju biljnih virusa. Najrasprostranjenija metoda u rutinskoj detekciji virusa je DAS-ELISA, koja se odlikuje mogućnošću ispitivanja većeg broja uzoraka istovremeno, a za razliku od biotesta rezultati se dobijaju za kratko vreme (Krstić i Tošić, 1994).

Molekularne metode detekcije, zasnovane na osobinama virusnog genoma, predstavljaju jako osetljive i pouzdane metode detekcije virusa. Posebno značajnu ulogu imaju u detekciji satelitnih RNK virusa, virusa koji se ne mogu prenositi mehaničkim putem, a čiji vektori nisu poznati, latentnih virusa, defektnih virusnih čestica, koji se ne mogu detektovati serološkim metodama, u identifikaciji sojeva virusa koji se na osnovu antigenih osobina teško razlikuju, kao i u detekciji viroida (Nikolaeva, 1995; Gallitelli i Saldarelli, 1996).

Poređenjem različitih metoda detekcije virusa, utvrđeno je da je detekcija virusa mozaika krastavca "dot-blot" hibridizacijom nukleinskih kiselina i do sto puta osetljivija u poređenju sa ELISA metodom, a u

detekciji virusa uvijenosti lišća krompira dve hiljade puta (Loebenstein i sar., 1997). Osetljivost detekcije primenom, „dot-blot” hibridizacije povećana je upotrebom riboproba (RNK proba), a uvođenjem digoksigenina, neradioaktivnog obeleživača, prevaziđen je problem rada sa radioaktivnim probama (Harper i Creamer, 1995; Gallitelli i Saldarelli, 1996). Pored osetljivosti, ova metoda se odlikuje mogućnošću testiranja velikog broja uzoraka, dugim čuvanjem do upotrebe uzoraka nanetih na najlonske membrane, lakom manipulacijom membranama i brzim dobijanjem rezultata. Zbog svoje osetljivosti i pogodnosti testiranja velikog broja uzoraka, „dot-blot” hibridizacija nukleinskih kiselina predstavlja pogodnu metodu za rutinsku detekciju virusa (Harper i Creamer, 1995). U prilog tome ide podatak da se ova metoda koristi u Italiji, od 1994. godine, u sertifikaciji semenskog materijala na biljne viruse (Gallitelli i Saldarelli, 1996).

Najosetljivija metoda detekcije biljnih virusa koje imaju RNK je kombinacija reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR). Poređenjem različitih metoda detekcije virusa infektivne hloroze paradajza (*Tomato infectious chlorosis virus*), utvrđeno je da je RT-PCR i do sto puta osetljivija u odnosu na ELISA, EBIA i metodu „dot-blot” hibridizacije nukleinskih kiselina (Li i sar., 1998). Veća osetljivost detekcije postiže se primenom Immunocapture RT-PCR metode, koja je u detekciji virusa šarke šljive i do dvesta pedeset puta osetljivija od RT-PCR metode (Gallitelli i Saldarelli, 1996).

Osetljivost detekcije biljnih virusa povećana je uvođenjem Real-time RT-PCR metode (Roberts i sar., 2000), a razvojem Multiplex PCR metode omogućeno je istovremeno detektovanje više virusa u slučajevima mešane infekcije (Gallitelli i Saldarelli, 1996).

Iako je RT-PCR najsenzitivnija metoda detekcije virusa, kod virusa koji se mogu mehanički prenositi primena ove metode u rutinskoj dijagnozi je dosta skupa. Postoje druge ekonomski isplativije i jednostavnije metode, kao što su DAS-ELISA i "dot-blot" hibridizacija nukleinskih kiselina, koje su pogodnije za istovremeno testiranje velikog broja uzoraka (Figueira i sar., 1997).

METODE DETEKCIJE FITOPLAZMI

U prošlosti fitoplazme su se detektovale na osnovu simptoma, bojenjem i svetlosnom elektronskom i fluorescentnom mikroskopijom i serološkim meto-

dama. U poslednje vreme sve te metode potisnute su primenom molekularnih tehnika (Osler i sar., 1996; Jones, 2002).

Najveći broj ispitivanja fitoplazmi baziran je na osobinama ribozomalnih gena, gena za 16S rRNK, gena za 23S rRNK, dela genoma između ova dva gena, gena za ribozomalni protein L22 i drugih (Seemüller i sar., 1998).

Umnožavanje 16S rRNK fitoplazmi PCR metodom obezbedila je mnogo osetljiviju metodu detekcije u odnosu na sve ranije. Prajmeri napravljeni po sekvencama konzervativnog 16S rRNK gena, a koriste se za detekciju svih fitoplazmi, označeni su kao univerzalni prajmeri za fitoplazme. Specifični prajmeri mogu se koristiti za detekciju određenih specifičnih grupa fitoplazmi. Oni su komplementarni delu sekvence DNK koji poseduje samo ta specifična grupa fitoplazmi i mogu dati više podataka o prouzrokovaču oboljenja od univerzalnih prajmera (Jones, 2002).

Osetljivost detekcije fitoplazmi povećana je uvođenjem Nested PCR metode. Digestija amplifikovanih fragmenata restrikcionim enzimima i analiza polimorfizma dužine nastalih fragmenata (RFLP) omogućila je preciznije detektovanje i klasifikovanje fitoplazmi (Jones, 2002).

PRIMENA MOLEKULARNIH METODA U ISPITIVANJU NEKIH BILJNIH PATOGENA U NAŠOJ ZEMLJI

U našoj zemlji, prva ispitivanja zasnovana na osobinama genoma biljnih patogena sprovedena su na biljnim virusima. Ispitivanje prisustva virusa specifičnih dvolančanih RNK potvrdilo je virusnu prirodu oboljenja dunje (Paunović, 1995). Ova, kao i druge molekularne metode primenjene su u detekciji i karakterizaciji virusa voćaka; virusa šarke šljive (*Plum pox virus*) (Dulić-Marković i sar., 1998a, i b, i 2003), virusa jamičavosti stabla jabuke (*Apple stem pitting virus*) (Paunović i sar., 1998a, i b; 1999, i 2000), virusa blagog žutila oboda lista jagode (*Strawberry mild yellow edge virus*) (Dulić-Marković i sar., 1998c, i d), virusa prugavosti nerava jagode (*Strawberry vein banding virus*) (Dulić-Marković i Jovanović-Cvetković, 2000) i virusa šarenila jagode (*Strawberry mottle virus*) (Dulić-Marković i Jovanović-Cvetković, 2000; Lazić i sar., 2002; Lazić i Dulić-Marković, 2003).

Molekularne metode primenjene su u detekciji i karakterizaciji virusa ratarskih i povrtarskih biljaka;

Y virusa krompira (*Potato Y virus*) (Milošević i sar., 1998; Dukić i sar., 2004), virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*) (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2002a, i 2004), virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*) (Dukić i sar., 2002b), virusa mozaika lubenice 2 (*Watermelon mosaic virus 2*), virusa žutog mozaika kukuruznog (*Zucchini yellow mosaic virus*) i virusa mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*) (Dukić i sar., 2004).

Ivanović i saradnici (2003, i 2004a. i 2004b) su radili na detekciji *Phytophthora infestans* i karakterizaciji izolata uzročnika plamenjače krompira i paradajza. Primenom PCR i Nested PCR vršeno je umnožavanje fragmenata molekula DNK i analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) u cilju identifikacije tipa mitohondrijalne DNK. Metodom Southern hibridizacije određen je fingerprinting DNK (Ivanović, *neobjavljeni podaci*).

Sindrom propadanja maline kod nas nepoznate etiologije zabeležen je kao masovna pojava početkom ove decenije. Zabrinutost proizvođača i javnosti bila je velika, ali je još veća nepoznanica bio uzročnik patoloških promena na korenovom vratu i korenu biljaka kod nas. Koprivica i saradnici (2002) daju saopštenje o prisustvu gljiva roda *Phytophthora*, a detekcija i identifikacija metodom PCR potvrđuju ovaj nalaz. Specifičnost metode omogućila je identifikaciju vrste *P. fragariae* var. *rubi* kao prouzrokovača truleži korena maline (Koprivica i sar., 2003).

Ranija malobrojna istraživanja fitoplazmi, Aleksića i saradnika (1980) godine, odnose se na proučavanje fitoplazme stolbur na biljkama porodice *Solanaceae* (Šutić, 1982). Fitoplazme u našoj zemlji, prvi put su detektovane, molekularnim tehnikama (Nested PCR praćen RFLP analizom), na vinovoj lozi, 2003. godine (Duduk i sar., 2003a). Korišćenjem univerzalnih i specifičnih prajmera u Nested PCR-u, praćenom RFLP analizom (Duduk i sar., 2003b. i 2004a, i b) izvršena je identifikacija i karakterizacija, kao i pregled prisustva fitoplazmi na vinovoj lozi u Srbiji. Molekularnim metodama utvrđeno je i prisustvo fitoplazmi na koštičavom voću (Tanasković i Carraro, 2003; Duduk i sar., 2004c).

Molekularna detekcija i karakterizacija fitopatogenih bakterija u našoj zemlji obuhvata ispitivanja *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* prouzrokovača bakterijske pegavosti paprike i paradajza (Obradović i sar., 2004), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* patogena paradajza (Milijašević i

sar., 2004) i *Erwinia amylovora* prouzročivača bakterijske plamenjače jabučastih voćaka (Gavrilović i sar., 2004).

ZAKLJUČNE KONSTATACIJE

Danas postoji obilje podataka o korišćenju metoda molekularne biologije u biljnoj patologiji. Veliki broj publikacija koje su objavljene o ovoj temi u svetu, svedoči o aktuelnosti ovih metoda. Kod nas se tek poslednjih godina metode molekularne biologije koriste u detekciji patogenih organizama u saradnji sa istraživačima iz sveta, i to uglavnom u njihovim laboratorijama. Još uvek visoka cena opreme i neophodnih reagensa, i pored nesumnjivih prednosti, predstavlja ograničavajući faktor širem uvođenju ovih metoda u naše fitopatološke laboratorije.

LITERATURA

Annamalai, P., Ishii, H., Lalithakumari, D. and Revathi,

R.: Polymerase chain reaction and its applications in fungal disease diagnosis. Z. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz, 102: 91-104, 1995.

Alvarez, A.: Serological techniques. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA, 2001.

Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I. and Geider, K.: Identification of the Fire Blight Pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR Assays with Chromosomal DNA. Appl. Environ. Microbiol., 61: 2636-2642, 1995.

Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Louws, F. J., Schneider, M., Rademaker, J. L. W., De Brujin, F. J. and Jackson, L. E.: Multiphasic analyses of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. Phytopathology, 89: 328-335, 1999.

Bridge, P.: Biochemical and molecular techniques. In: Plant Pathologist Pocketbook (Third Edition) (Waler, J.M., Lenne, J.M., Waler, S.J., eds.), CAB International, i UK, 2001.

Cuppels, D. A. and Ainsworth, T.: Molecular and Physiological Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* Strains That Produce the Phytotoxin Coronatine. Appl. Environ. Microbiol., 61: 3530-3536, 1995.

Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y.: PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism of a *pel* Gene as a Tool To Identify *Erwinia carotovora* in Relation to Potato Diseases. Appl. Environ. Microbiol., 60: 1437-1443, 1994.

Duduk, B., Ivanović, M., Dukić, N., Botti, S. and Bertaccini, A.: First report of Elm yellows subgroup 16SrV-C phytoplasma infecting grapevine in Serbia. Plant Dis., 87: 599, 2003a.

Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Dukić, N. and Bertaccini, A.: Molecular characterization of a Flavescence doree phytoplasma infecting grapevine in Serbia. Extended Abstracts of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, 2003b, pp. 91-92.

Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Krstić, B., Dukić, N. and Bertaccini, A.: Identification of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows in Serbia. J. Phytopathol., 152: 575-579, 2004a.

Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M. i Bertaccini, A.: Stolbur i European stone fruit yellows (ESFY) fitoplazme na vinovoj lozi u Srbiji. V kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 2004b (Zbornik rezimea, str. 134).

Duduk, B., Paltrinieri, S., Ivanović, M. i Bertaccini, A.: European stone fruit yellows fitoplazme na kajsiji u Vojvodini, Srbija. V kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 2004c (Zbornik rezimea, str. 136).

Dukić, N., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D. i Duduk, B.: Molekularna identifikacija izolata virusa mozaika krastavca u Jugoslaviji – podgrupe IA. XII simpozijum o zaštiti bilja i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2002a (Zbornik rezimea, str. 75).

Dukić, N., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D., Krstić, B., Vico, I. i Duduk, B.: Molekularna identifikacija izolata virusa bronzavosti paradajza na paprici. XII simpozijum o zaštiti bilja i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2002b (Zbornik rezimea, str. 72).

Dukić, N., Krstić, B., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D., Vico, I. i Berenji, J.: Metoda „dot-blot” hibridizacije nukleinskih kiselina u detekciji virusa paprike, paradajza i obične tikve. V kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 2004 (Zbornik rezimea, str. 104).

Dulić-Marković, I., Ranković, M., Čuljković, B., Stojković, O. i Romac, S.: Primena metode lančane reakcije polimeraze za dokazivanje virusa šarke. Zaštita bilja, 225: 257-275, 1998a.

Dulić-Marković, I., Ranković, M., Čuljković, B., Stojković, O. i Romac, S.: Identifikacija sojeva virusa šarke u Jugoslaviji. IV jugoslovenski kongres o zaštiti bilja i Međunarodni simpozijum o integralnoj zaštiti ratarskih biljaka, Vrnjačka Banja, 1998b (Zbornik rezimea, str. 45).

- Dulić-Marković, I., Ranković, M., Čuljković, B., Stojković, O. i Romac, S.:** Dokazivanje virusa blagog žutila ivice lista jagode u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, 225: 192-229, 1998c.
- Dulić-Marković, I., Ranković, M., Čuljković, B., Stojković, O. i Romac, S.:** Detekcija virusa vezanog za bolest blagog žućenja oboda lista jagode u Jugoslaviji. IV jugoslovenski kongres o zaštiti bilja i Međunarodni simpozijum o integralnoj zaštiti ratarskih biljaka, Vrnjačka Banja, 1998b (Zbornik rezimea, str. 70).
- Dulić-Marković, I. i Jovanović-Cvetković, T.:** Otkrivanje i identifikacija virusa jagode u Jugoslaviji. XI jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2000 (Zbornik rezimea, str. 38).
- Dulić-Marković, I.:** Rekombinantni soj virusa šarke. VI savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 2003 (Zbornik rezimea, str. 26).
- Figueira, A. R., Domier, L. L. and D'Arej, C. J.:** Comparison of techniques for detection of barley yellow dwarf virus-PAV-IL. *Plant Dis.*, 81: 1236-1240, 1997.
- Gallitelli, D. and Sardarelli, P.:** Molecular Identification of Phytopathogenic Viruses. In: *Methods in Molecular Biology, Species Diagnostics Protocols - PCR and Other Nucleic Acid Methods* (Clapp, J.C., ed). Humana Press Inc., 1996.
- Gavrilović, V., Milijašević, S., Obradović, A. i Arsenijević, M.:** Occurrence and spread of *Erwinia amylovora* in Serbia during 2000-2003. 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, 2004 (Book of Abstracts, p. 16).
- Hu, X., Nazar, R.N. and Robb, J.:** Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 42: 23-36, 1993.
- Harper, K. and Creamer, R.:** Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probes. *Plant Dis.*, 79: 563-567, 1995.
- Henson, J.M. and French, R.:** The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 31: 81-109, 1993.
- Ivanović, M., Niepold, F. and Ivanović, M.:** Survey of *Phytophthora infestans* populations in Serbia: Mating type, metalaxyl resistance and virulence properties. Potato Research, 2003 (In Press).
- Ivanović, M., Niepold, F., Ivanović, M., Mijatović, M. and Zečević, B.:** Occurrence of new populations and mating types of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Serbia. Proc. 3rd Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes, Bursa, Turkey, 2004 p. 69.
- Ivanović, M., Ivanović, M., Milošević, D. i Mijatović, M.:** Identifikacija tipa mitohondrijalne DNA *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. V kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 2004 (Zbornik rezimea, str. 92).
- Jones, P.:** Phytoplasma plant pathogens. In: *Plant Pathologist's Pocketbook (Third Edition)* (Waler, J. M., Lenne, J. M. and Waller, S. J., eds.). CABI Publishing, UK, 2002.
- Koprivica, M., Milenković, S., Milijašević, S. i Gavrilović, V.:** Nove bolesti maline i manje poznate interakcije štetoina i patogena maline. XII simpozijum o zaštiti bilja i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2002 (Zbornik rezimea, str. 56).
- Koprivica, M., Milenković, S., Duncan, J.M., Cooke, D.E.L. i Young, V.:** Rasprostranjenost *Phytophthora spp.* na malini u Srbiji. I simpozijum o malini Srbije i Crne Gore, Čačak, 2003 (Zbornik rezimea, str. 45).
- Krstić, B. i Tošić, M.:** Biljni virusi-neke osobine i dijagnoza. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1994.
- Krstić, B., Vico, I., Dovas, I. C., Constantinos, E., Katis, I. N. i Berenji, J.:** Molekularna detekcija i delimična karakterizacija jugoslovenskih izolata virusa mozaika krastavca. XII simpozijum o zaštiti bilja i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2002 (Zbornik rezimea, str. 74).
- Lazić, T., Dulić-Marković, I. i Jovanović-Cvetković, T.:** Dijagnostika virusa šarenila lista jagode. XII simpozijum o zaštiti bilja i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2002 (Zbornik rezimea, str. 78).
- Lazić, T. i Dulić-Marković, I.:** Dijagnostika virusa šarenila lista jagode. *Jugoslovensko voćarstvo*, 141-142: 59-65, 2003.
- Li, R. H., Wisler, G. C., Liu, H.-Y. and Duffus, J. E.:** Comparison of diagnostic techniques for detecting Tomato infectious chlorosis virus. *Plant Dis.*, 82: 84-88, 1998.
- Loebenstein, G., Akad, F., Filatov, V., Sadvakasova, G., Manadilova, A., Bakelman, H., Teverovsky, E., Lachmann, O. and David, A.:** Improved detection of Potato leafroll luteovirus in leaves and tubers with digoxigenin-labeled cRNA probe. *Plant Dis.*, 81: 489-491, 1997.
- Louws, F. J. and Cuppels, D. A.:** Molecular techniques. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA, 2001.
- Luck, J.E. and Gillings, M.R.:** Rapid identification of benomil resistant strains of *Botrytis cinerea* using

- the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.*, 99: 1283-1288, 1995.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A. and Ward, E.:** Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.*, 59: 129-142, 2003.
- McManus, P. S. and Jones, A. L.:** Detection of *Erwinia amylovora* by Nested PCR and PCR-Dot-Blot and Reverse-Blot Hybridizations. *Phytopathology*, 85: 618-623, 1995.
- Milijašević, S., Obradović, A., Arsenijević, M., Jones, J. B. and Minsavage, G.V.:** Characterisation and race determination of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Serbia. 1st International Symposium on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop, Orlando, FL, USA, 2004 (Book of Abstracts, p. 107).
- Miller, S. A. and Martin, R. R.:** Molecular diagnosis of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 409-432, 1988.
- Milošević, D., Dulić-Marković, I., Čuljković, B. i Romac, S.:** Primena metode lančane reakcije polimerizacije (PCR) za unapređenje dijagnostike Y virusa (PVY). IV jugoslovenski kongres o zaštiti bilja i Međunarodni simpozijum o integralnoj zaštiti ratarskih biljaka, Vrnjačka Banja, 1998 (Zbornik rezimea, str. 33).
- Nikolaeva, O. V.:** Nucleic acid hybridization for the detection and localization of plant viruses. In: *Molecular methods in plant pathology* (Singh, R. P. and Singh U. S., eds.). CRC Press, Inc., FL, USA, 1995.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijević, M., Jones, J. B., Minsavage, G. V. and Wang, J. F.:** Characterisation and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *E. J. Plant Pathol.*, 110: 285-292, 2004.
- Osler, R., Carraro, L., Loi, N., Gregoris, A., Pavan, F., Firrao, G., Musetti, R., Ermacora, P., Loschi, A., Pertot, I., Rafatti, E.:** Le piu importanti malattie da fitoplasmii nel Friuli-Venezia Giulia. ERSA, Italia, 1996.
- Paunović, S.:** Double-stranded RNA associated with fruit deformation of quince. *Acta Horticulturae*, 386: 45-50, 1995.
- Paunović, S., Ranković, M., Maksimović, V. i Radović, S.:** PCR identifikacija virusa vezanog za deformacije plodova dunje cv Leskovačka. IV jugoslovenski kongres o zaštiti bilja i Međunarodni simpozijum o integralnoj zaštiti ratarskih biljaka, Vrnjačka Banja, 1998a (Zbornik rezimea, str. 42).
- Paunović, S., Ranković, M., Maksimović, V. i Radović, S.:** Karakterizacija virusa vezanog za kamenitost plodova kruške cv Wurtemberg. IV jugoslovenski kongres o zaštiti bilja i Međunarodni simpozijum o integralnoj zaštiti ratarskih biljaka, Vrnjačka Banja, 1998b (Zbornik rezimea, str. 43).
- Paunović, S., Maksimović, V., Ranković, M. i Radović, S.:** Characterization of a virus associated with pear stony pit in cv. Wurtemberg. *J. Phytopathol.*, 147: 695-700, 1999.
- Paunović, S., Maksimović, V., Radović, S. i Ranković, M.:** Detekcija virusa jamičavosti stabla jabuke u različitim vrstama jabučastih voćaka. XI jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2000 (Zbornik rezimea, str. 37).
- Reeves, J.C.:** Molecular diagnostics for pathogen detection in seeds and planting materials. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 52: 33-39, 1998.
- Roberts, C. A., Dietzgen, R. G., Heelan, L. A. and Maclean, D.:** Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *J. Virol. Methods*, 88: 1-8, 2000.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragazzino, A. and Goschl, M.:** Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.*, 80: 3-26, 1998.
- Tanasković, S. i Carraro, L.:** Pojava fitoplazme evropskog žutilla koštičavog voća na kajsiji i šljivi u Srbiji. VI savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 2003 (Zbornik rezimea, str. 89).
- Šutić, D.:** Viroze biljaka. Nolit, Beograd, 1982.
- Wallace, M.M. and Covert, S.F.:** Molecular mating types assay for *Fusarium cicutatum*. *App. Environ. Microbiol.*, 66: 5506-5508, 2000.
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A. and McCartney, H. A.:** Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches. *Ann. Appl. Biol.*, 145:1-6, 2004.

Molecular Methods in Plant Disease Diagnosis

SUMMARY

Reliable and rapid identification of causal agents of plant diseases is very important for conducting efficient control measures. Previously, the diagnosis relied on symptomatology. Introduction of light microscopy and cultivation methods of plant pathogens, as well as the application of serological methods, made pathogen identification more accurate.

During the 1980-ies the methods of selective *in vitro* amplification of DNA were introduced. By development of molecular methods, especially polymerase chain reaction (PCR), new ways of identification and characterization of plant pathogenic fungi, bacteria, viruses and phytoplasmas, have become available.

Molecular methods are being applied for the detection of plant pathogens since they are rapid, specific and sensitive tools. These recent advances in molecular biology also made possible the detection of unculturable microorganisms.

Besides the advantages in detection of plant pathogens, these techniques improved taxonomy and defined the relationships within taxonomic categories of the groups of microorganisms.

This review focuses on the application of molecular methods in detection and identification of plant pathogenic fungi, bacteria, viruses and phytoplasmas including the data on their applications in our country.

Key words: Molecular methods; PCR; Plant pathogens; Detection