

UDK: 582.623.2: 631.52; 577.112: 577.21

Izvorni naučni rad *Original scientific paper*

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PROUZROKOVAČA RĐA
TOPOLA (*Melampsora* spp.)**

Galović Vladislava, Orlović Saša, Pap Predrag, Kovačević Branislav,
Marković Miroslav¹

Izvod: Započeta su istraživanja populacionog sastava prouzrokovala rđa (*Melampsora* spp.) na klonovima crnih topola korišćenjem molekularnih metoda. Za genetsku karakterizaciju *Melampsora* vrsta korišćena su 2 SSR markera za lokuse MmCAT-30 i MICAG101. Prvi rezultati ukazuju na postojanje dve *Melampsora* vrste. Prva je široko rasprostranjena *M. larici-populina*, dok bi druga prema našim preliminarnim rezultatima mogla biti *M. medusae*. Neophodno je nastaviti istraživanja u cilju karakterizacije prouzrokovala rđa na klonovima topola u našoj zemlji.

Ključne reči: rđa topole, molekularna karakterizacija, mikrosateliti

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF CAUSAL AGENTS OF POPLAR RUSTS
(*Melampsora* spp.)**

Abstract: The research work of population composition of causal agent of poplar rust *Melampsora* spp. in the black poplar clones using molecular methods was initiated. For genetic characterization of *Melampsora* species two SSR markers for the locuses MmCAT-30 and MICAG101 were used. First results indicate the existence of two *Melampsora* species. The first is the widespread *M. larici-populina*, while the other according to our preliminary results could be *M. medusae*. It is necessary to continue research in order to characterize causing rust on poplar clones in our country.

Key words: poplar rust, molecular characterisation, microsatellites

Rđe na lišću topola (*Melampsora* spp.) su široko rasprostranjena oboljenja u našoj zemlji. Javljaju se svake godine u rasadnicima i zasadima topola, a u zavisnosti od osetljivosti klonova i klimatskih prilika mogu da prouzrokuju značajne probleme u njihovom gajenju. Posledice napada ovih patogena su smanjenje

¹ Dr Vladislava Galović, naučni saradnik; Dr Saša Orlović, naučni savetnik; Mr Predrag Pap, istraživač saradnik; Dr Branislav Kovačević, naučni saradnik; Mr Miroslav Marković, istraživač saradnik; Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad, Srbija

asimilacione površine, prevremeno opadanje lišća, te fiziološko slabljenje i umanjeње prirasta kod gajenih biljaka.

Još šezdesetih godina prošlog veka, Vujić (1969) u svojoj doktorskoj disertaciji daje detaljan opis i proučava ciklus razvića *Melampsora* vrsta na lišću crnih topola i njenih hibrida. Pomenuti autor je utvrdio da su na crnim topolama u Podunavlju, a verovatno i na znatno širem području gajenja topola, prisutne dve vrste rđi i to *Melampsora allii-populina* Kleb. i *Melampsora larici-populina* Kleb. U godinama koje su sledile, proučavana je u prvom redu osetljivost većeg broja genotipova crnih topola prema prouzrokovacima rđi u uslovima spontanijih i veštačkih infekcija (Avramović et al., 1992, 1995, 1998; Pap et al., 2006), a pažnja je bila posvećena i mogućnostima suzbijanja ovih gljiva upotrebom fungicida (Avramović et al., 1997; Keča, 2003; Pap et al., 2007). Međutim, populacioni sastav prouzrokovaca rđi i njihovo prisustvo na genotipovima crnih topola u našoj zemlji sve do sada nisu bili predmet posebnih istraživanja.

Brojni autori u svetu i kod nas utvrdili su da obe istraživane vrste imaju skraćeni ciklus razvića, te da gljive prezimljavaju na lišću i u kori mladih izbojaka u uredostadijumu, a razmnožavaju se na proleće uredosporama (Klebahn, 1914; Kišpatić, 1959; Chiba i Zinno, 1960; Sorauer i Hassebrauk, 1962; Vujić, 1969). Time se objašnjava i činjenica da su rđe na crnim topolama svake godine prisutne, iako u rasadnicima i zasadima i njihovoj neposrednoj blizini nema prelaznih biljaka hraniteljki (*Allium* sp., *Arum* sp. i *Larix* sp.) neophodnih za njihovo razviće u haplofazi. Obe ove vrste pokazuju u dikariofazi svoga razvića veliku sličnost, pa se na osnovu njihovih morfološko-anatomskih karakteristika i bez oslonca na haplofazu koja se razvija na prelaznim biljkama hraniteljicama, ne može pouzdano utvrditi o kojoj se vrsti radi. Zato su ovim radom započeta istraživanja populacionog sastava, odnosno kvalitativnog učešća *Melampsora* vrsta na klonovima crnih topola korišćenjem molekularnih metoda.

Biljni materijal, odnosno lišće sa uredosorusima gljive sakupljeno je krajem septembra 2009. godine u matičnjaku genofonda Petrovaradinsko na Ogladnom dobru Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu. Za potrebe istraživanja izolovani su uredosorusi sa sporama koje potiču sa 4 klona različite taksonomske pripadnosti: I-214 (*P. x euramericana*), S 11-8 (*Populus deltoides*), 1007 (*P. trichocarpa*), 9111/93 (*P. nigra x P. maximowiczii*).

Prirodno zaraženo lišće sa uredosporama je poslužio za ekstrakciju DNK. Zaraženo biljno tkivo, sveže mase 100mg, samleveno je u aparatu za homogenizaciju (Retsch MM400, www.retsch.com), 1min na 30 Hz. DNK ekstrakcija je izvršena po uputstvu za korisnike Qiagen proizvoda DNeasy Plant Mini Kit sistema (www.qiagen.com). Koncentracija DNK je determinisana spektrofotometrijskom analizom, a kvalitet i čistoća određena sistemom elektroforeze na 1% agaroznom gelu. Za genetičku karakterizaciju korišćena su 2 SSR markera za lokuse: *MmCAT-30* i *MICAG-101*. Naziv lokusa, poreklo izolata, prajmer sekvenca i pristupni broj u gen banci prikazani su u tab. 1.

Tabela 1. Lokusi, prajmer sekvence i pristupni broj mikrosatelitskih markera u Banci gena za *M. larici populina* i *M. medusae*Table 1. Loci, primer sequences and Accession number of SSR markers in Gen Bank for *M. larici populina* and *M. medusae*

Lokus <i>Locus</i>	Poreklo izolata <i>Isolation source</i>	Prajmer sekvence <i>Primer sequence</i>	Pristupni broj u Gen banci <i>Accession no.</i>
<i>MmCAT-30</i>	<i>M. medusae</i>	5'AAAGAAGTTCAAATGCCTTAC3' 5'GAAACGAGCTCATCTGTTC3'	AY787479
<i>MICAG-101</i>	<i>M. larici populina</i>	5'TCCTTCTGGCTCCGCTGT3' 5'TATCTGTGGTTGCGAGTATTGG3'	AY787482

Prajmeri za oba lokusa su dizajnirani tako da razlikuju prouzrokovaoče obe vrste rđe. Lokus *MmCAT-30* je specifičan i razlikuje samo pojedinačne uredospore *M. medusae*, dok su prajmeri za lokus *MICAG-101* dizajnirani tako da poseduju mogućnost razlikovanja obe vrste rđe (*M. medusae* i *M. larici populina*). Protokol po Steimel et al. (2005) korišćen je za DNK amplifikaciju.

Oba lokusa *MmCAT-30* i *MICAG-101* su uspešno amifikovana. Lokus *MmCAT-30* amifikovao je dva fragmenta dužine 249 i 364 bazna para kod klona I-214, dok je amifikacija izostala kod tri ispitivana klona S 11-8, 1007 i 9111/93. Kod lokusa *MICAG-101* detektovana je amifikacija kod svih posmatranih klonova izuzev klona 1007 (Tab. 2).

Tabela 2. Dužina detektovanih alela (bazni parovi) kod posmatranih klonova

Table 2. Length of detected alleles (bp) in clones under observation

<i>Melampsora</i> spp.	Genotipovi topola <i>Poplar genotypes</i>			
	I-214	S11-8	1007	9111/93
Lokus <i>Locus</i>				
<i>MmCAT-30</i>	249, 364	0	0	0
<i>MICAG-101</i>	287, 294	286, 427	0	288

Izostanak amifikacije *MmCAT-30* kod klonova S 11-8, 1007 i 9111/93 bi mogao da ukaže na nepostojanje ovoga specifičnog lokusa za *M. medusae* kod pomenutih klonova, a potvrdi njegovo specifično mesto kod klona I-214. Iako je marker *MICAG-101* dizajniran za karakterizaciju obe *Melampsora* vrste postojanje njegove amifikacije uz izostanak amifikacije *MmCAT-30* kod klonova S 11-8, 1007 i 9111/93 potvrđuje prisustvo *M. larici populina*. Specifičan alel dužine 287 na lokusu *MICAG-101* detektovan kod klona I-214 i postojanje amifikacije za specifičan lokus *MmCAT-30* ukazuje na prisustvo vrste *M. medusae* kod ovoga klona.

M. larici-populina je dominantna evropska vrsta rđe na topoli, koja je u prethodnim desetlećima prouzrokovala značajne ekonomske gubitke u gajenju topola u Evropi (Pinon i Frey, 2005). Prema EPPO *M. medusae* je vrsta poreklom iz Severne Amerike koja se vremenom proširila i u Južnu Ameriku, Afriku i

Australiju. Pomenuta vrsta u Evropi se nalazi na karantinskoj A2 listi (OEPP/EPPO, 1982). Registrovana je u Francuskoj, Belgiji, Portugalu i prema izveštajima na ograničenom području u Španiji (EPPO/CABI 1997). *M. medusae* je utvrđena u Francuskoj u sporadičnim intervalima u proteklih 30 godina, ali prema navodima Pinona (1986) ova vrsta se nije značajnije proširila usled nepovoljnih uslova spoljne sredine. Smatra se da forme prisutne u Evropi nisu agresivne i nemaju tendenciju širenja i da kao takve ne predstavljaju opasnost za druge evropske zemlje. Međutim, postoji rizik da se u EPPO region unese jedna od poznatih agresivnih vrsta koja bi mogla prouzrokovati značajne gubitke posebno u područjima sa blagom klimom u kojima nema alternativnog domaćina.

Na osnovu pomenute literature i naših preliminarnih rezultata, potrebno je nastaviti istraživanja *Melampsora* vrsta na većem broju klonova i na širem području gajenja topola da bi se potvrdilo postojanje vrste *M. medusae* u našoj zemlji.

LITERATURA

- Avramović G., Guzina V., Tomović Z. (1992): Resistance progenies and clones of black poplar to *Melampsora* spp. in years of heavy attacks, Proceedings 19th session of the International Poplar Commission – Zaragoza, Vol. I, 223-230
- Avramović G., Guzina V., Orlović S. (1995): Procena osetljivosti nekih klonova topola prema uzročnicima oboljenja lista i kore. Prvi simpozijum sekcije za oplemenjivanje organizama sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka Banja, Abstract: 111-112
- Avramović G., Milivojević B., Poljaković-Pajnik L., Matijević M., Šimunovački Đ. (1997): Efekti hemijskog suzbijanja gljiva prouzrokovaca smeđe pegavosti (*Marssonina brunnea*) i rđe lišća topola (*Melampsora* spp.). Topola 159/160: 27-40
- Avramović G., Guzina V., Kovačević B. (1998): Osetljivost klonova topola prema najznačajnijim oboljenjima lišća (*Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn. i *Melampsora* spp.). Topola 161/162: 3-16
- Chiba O., Zinno Y. (1960): Uredospores of the poplar leaf rust, *Melampsora larici-populina* Kleb. as a source of primary infection. Journal of Japanese Forest Society 42, 406-410
- EPPO/CABI (1997): Quarantine Pests for Europe. 2nd dition. Edited by Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M. CAB International, Wallingford, UK, pp 1425
- Keča N. (2003): Mogućnost suzbijanja parazita na lišću topole (*Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn. i *Melampsora* spp. nekim fungicidima Glasnik Šumarskog fakulteta, Beograd, 88: 103-120.
- Kišpatić J. (1959): Bolesti topola. Topola 1959, br. 9, 9-32
- Klebahn H. (1914): Uredineen. Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. Leipzig 1914. 947
- OEPP/EPPO (1982): Data sheets for quarantine organisms No 33, *Melampsora medusae*, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 12 (1)
- Pap P., Marković M., Orlović S., Kovačević B., Drekić M., Vasić V., Poljaković-Pajnik L., Pekeč S. (2006): Rezultati višegodišnje ocene osetljivosti

- genotipova topola prema *Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn. i *Melampsora* spp. u uslovima spontanijh infekcija. Topola 177/178: 32-50
- Pap P., Lazarev V., Marković M. (2007): Efficacy of Some Fungicides in Parasite Suppression on Poplar Leaves (*Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn. and *Melampsora* spp. Acta Silvatica & Lignaria Hungarica, Special Edition, Proceedings of the Conference of IUFRO Working Party 7.02.02, 21-26 May 2007, Sopron, Hungary, pp 81-91
- Pinon (1986): Situation de *Melampsora medusae* in Europe. Bulletin OEPP/EPP Bulletin 16, 541-551
- Pinon J., Frey P. (2005): Interaction between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: Rust Diseases of Willow and Poplar. CAB International, Wallingford, UK, pp 139-154
- Sorauer P., Hassebrauk, K.(1962):Basidiomycetes. Handbuch der Pflanzkrankheiten III. P. Parey, Berlin, 747
- Steimel J., Chen W., Harrington C. (2005): Development and characterisation of microsatellite markers for the poplar rust fungi *Melampsora medusae* and *Melampsora larici populina*. Molecular Biology Notes 5: 484-486
- Vujić P. (1969): Prilog poznavanju *Melampsora* rđe na crnim topolama u Podunavlju i njihova osetljivost prema ovoj bolesti, Radovi Instituta za topolarstvo, Knjiga 2, pp 98

Summary

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF CAUSAL AGENTS OF POPLAR RUSTS
(*Melampsora* spp.)**

by

*Galović Vladislava, Orlović Saša, Pap Predrag, Kovačević Branislav, Marković
Miroslav*

*Poplar rust (*Melampsora* spp.) are widespread diseases in our country and can cause significant problems in growing poplar. The consequences of these pathogens attack are the surface assimilation reduction, premature defoliation and physiological loss and reduction in growth of cultivated plants. It was found that the black poplars along the Danube and probably in a much wider area of growing poplar trees, there are two kinds of rust *Melampsora allii-populina* Kleb. and *Melampsora larici-populina* Kleb. Both of these types shows similarities in their developmental phases (dikaryophasis) and on the basis of their morphological-anatomical characteristics can not reliably determine the species. Therefore, this work began research of population composition and quality of participation *Melampsora* species on black poplar clones using molecular methods. For the purposes of research uredosporuses were isolated from spores originating from 4 clones of different taxonomic affiliation: I-214 (*P. x euramericana*), S 11-8 (*Populus deltoides*), 1007 (*P. trichocarpa*), 9111/93 (*P. nigra* x *P. maximowiczii*). For genetic characterization 2 SSR markers are used for the following loci: MmCAT-30 and MICAG-101.*

*It can be concluded that, according to the preliminary results, for the first time in our plant material in the clone I-214, *M. medusae* was determined. As this research work was recently initiated in the field of phytopathology it is necessary to be continued in order of additional characterization of this type of disease in the our country.*