

Agrovoc descriptors: verticillium albo atrum, pathogenesis, pathogenicity, effectors, genomes, fungal diseases, symptoms

Agris category code: H20

Virulenčni faktorji glive *Verticillium albo-atrum*

Aljaž MAJER¹, Janez KOSEL²

Prispelo: 11. avgust 2011, sprejeto: 16. september 2011

Received: August 11, 2011, accepted: September 16, 2011

IZVLEČEK

Gliva *Verticillium albo-atrum* je pomemben rastlinski patogen, ki lahko okuži več sto rastlinskih vrst in povzroča precejšnjo škodo v kmetijstvu. O mehanizmih patogeneze te glive je znanega zelo malo, pred kratkim pa je bil sekvenciran njen genom, kar ponuja dobre obete za raziskave na tem področju. V tej raziskavi sva pregledala literaturo o znanih genih gliv, ki sodelujejo pri napadu in pojavu simptomov bolezni, nakar sva v genomu *V. albo-atrum* z uporabo orodja BLAST poiskala homologe vseh najdenih genov in poskusila prepoznati razloge za virulenco te pomembne patogene glive.

Ključne besede: *Verticillium albo-atrum*, glivni efektorji, patogeneza, BLAST

ABSTRACT

VIRULENCE FACTORS OF THE FUNGUS *Verticillium albo-atrum*

The fungus *Verticillium albo-atrum* is an important plant pathogen, capable of infecting several hundred plant species and causing considerable agricultural losses. Pathogenesis mechanisms of this fungus are poorly understood, but the recent sequencing of its genome offers good foresight for conducting research on this topic. We have surveyed accessible knowledge on known pathogenesis related fungal genes and conducted a search of gene homologs of these genes in the genome of *V. albo-atrum* using BLAST. From retrieved data, we tried to form a possible explanation for the high virulence of this important pathogenic fungus.

Key words: *Verticillium albo-atrum*, fungal effectors, pathogenesis, BLAST

Večji del obsega tega izdelka je bil pripravljen kot seminarska naloga pod vodstvom prof. dr. Gregorja Anderluha, prof. dr. Blaža Zupana in prof. dr. Uroša Petroviča pri predmetu Bioinformatika na doktorskem študiju Biomedicina, smer Genetika.

1 UVOD

Talne glive rodu *Verticillium* povzročajo bolezni pri več kot 200 rastlinskih vrstah, ki rastejo v zmernem in subtropskem podnebju. Znaki bolezni so uvelost, kloroza, pobelost listnih žil in nekroza. Napadajo pomembne poljščine in vsako leto povzročijo več milijard dolarjev škode v pridelku po vsem svetu. Vrste rodu *Verticillium* izločajo nizokomolekularne fitotoksine in encime, ki razgrajujejo rastlinsko celično steno. V svojem patogenem ciklu tvorijo posebne strukture imenovane mikrosklerociji in melanizirani micelijji, ki omogočajo dolgotrajni parazitizem rastline

(Fradin in Thomma, 2006). Gliva *V. dahliae* ima sposobnost izredne prilagoditve na spreminjajoče se okolje in lahko parazitira rastline različnih ekoloških niš. Strategije nadzora teh bolezni so slabo razvite in neučinkovite zaradi slabega razumevanja biologije in ekologije glive *V. dahliae*. Glavni povzročitelj hmeljeve uvelosti je gliva *V. albo-atrum*, ki je tudi splošno razširjena, vendar se njen nabor gostiteljev močno razlikuje od gostiteljev glive *V. dahliae* (Bhat in sod., 1999, Qin in sod., 2006). Da bi ugotovili glavne lastnosti glive, ki omogočajo preživetje, patogenost in

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija; univ. dipl. bioteh., mladi raziskovalec, aljaz.majer@bf.uni-lj.si

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija; univ. dipl. bioteh., mladi raziskovalec.

virulenco, so na inštitutu Broad posekvencirali celoten genom obeh zgoraj naštetih predstavnikov rodu *Verticillium*. Obe nukleotidni zaporedji genomov sta dostopni na spletnem strežniku Ameriškega nacionalnega centra za biotehnologijo (NCBI).

1.1 Pregled glivnih efektorskih proteinov

Glivni efektorji so beljakovine ali majhne molekule, ki vplivajo na strukturo in funkcijo gostiteljskih celic (Ellis in sod., 2009). Vpliv glivnih efektorjev na rastlinsko tkivo se lahko izrazi kot bolezen (virulenčni dejavniki) ali pa kot sproženje obrambnih mehanizmov proti patogenu (avirulenčni dejavniki).

Patogene glive izločajo proteine, ki vplivajo na strukturo in funkcijo gostiteljskih celic, kot so npr. encimi in avirulenčni faktorji ter sintaze fitotoksinov. Encimi med patogenozo pospešujejo privzem kompleksnih ogljikovih hranil in privzem dušika iz nepreferenčnih virov rastlinskega organizma ter omogočajo glivi razstrupljanje in izogibanje obrambnim mehanizmom rastline. Encimi, ki jih izločajo številni patogeni rodovi gliv so npr. celulaze, kutinaze, celobiazze, ksilanaze, glukozidaze, celobiohidrolaze, lipaze in proteaze, pomembni patogeni dejavniki pa so tudi sami transkripcijski faktorji, ki regulirajo njihovo izražanje (npr. *areA*, *xlnR* in *ctf1 α* ; Bluhm in sod., 2008).

Nizkomolekularni fitotoksini so sekundarni metaboliti, ki jih proizvajajo glivne poliketidne sintetaze, in so pogosto ključni za infekcijo in virulenco ter z njima povezanimi simptomi bolezni. Fitotoksini lahko delujejo na različne celične tarče, lahko spremenijo gensko ekspresijo ali oslabijo integriteto celične membrane. Fotosenzibilizatorji so fitotoksini, ki tvorijo reaktivne kisikove oblike, te pa poškodujejo rastlinsko celico in lipidne membrane. Cerkosporin in elzinohrom vsebujeta perilenkvinonski kromofor, ki po absorpciji svetlobne energije preide v aktivirano tripletno stanje, to pa s kisikom tvori O_2^- in H_2O_2 . Cerkosporin izločajo glive rodu *Cercospora*, ki sintetizirajo poliketidno sintetazo CTB1. Same so pred toksinom zavarovane z ABC transporterjem (CFP1, kodiran v genu *ctb4*), ki aktivno izloča toksin iz celic. Gliva *Ramularia colloocygni* izloča rubelin D, ki v rastlinski celici sproži peroksidacijo alfa-linoleične kisline. Epipolitiiodioksopiperazini vsebujejo notranje disulfidne ali trisulfidne mostičke, ki omogočajo uničevanje gostiteljevih beljakovin. Primeri takih toksinov so sirodesmin PL, ki ga sintetizira *Leptosphaeria maculans*, in gliotoksini gliv rodov *Trichoderma* in *Aspergillus*. Številni fitotoksini inhibirajo encime, ki sodelujejo pri sintezi membranskih lipidov. Fumonizin gliv rodu *Fusarium* in AAL-toksin glive *Alternaria alternata* delujeta kot analoga sfingozina in tako inhibirata encima sfingainin-N-

acetiltransferazo ter keramid sintazo. Posledično je moteno obnavljanje celične membrane, njena prepustnost pa se poveča. Fitotoksin ciperin je difenilni eter, ki ga izločajo številne patogene glive. Inhibira encim enoil reduktazo in posledično biosintezo lipidov. Gliva *Cercospora beticola* sintetizira betikoline ali rumene toksine, ki se v membranah sestavljajo v pore.

Črpanje esencialnih hranil kot je npr. železo je izredno pomembno za obstoj patogene glive. Pridobivanje železa iz rastlinskih celic poteka preko nizkomolekularnih kelatorjev imenovanih siderofori, kot je npr. ferikrocin iz *Alternaria brassicicola* in triacetilfuzarinin C (TAFC, iz *Aspergillus fumigatus*).

Blokiranje ATPaze vodi do popolnega zloma rastlinske celice. Ten-toskin sintetizirajo vrste rodu *Alternaria* in je ciklični tetrapeptid, ki se veže med α in β podenoto encima ATPaze v kloroplastu. Gliva *Cochliobolus heterostrophus* pa izloča T-toksin, ki vstopa v mitohondrij, kjer se veže na protein T-urf13, to pa sproži konformacijske spremembe in tvorbo pore. Posledično mitohondriji nabreknejo. Pri sintezi T-toksina sodelujejo trije biosintetski geni, in sicer dve poliketidni sintazi in ena dekarboskilaza (DEC1). Fitotoksin fuzikocin se veže na encim H^+ ATPazo in jo stalno aktivira, to pa vodi do naraščanja izvencelične koncentracije reaktivne spojine H_2O_2 . Fuzikocin sintetizira gliva *Phomopsis amygdale* z encimoma preniltransferazo (kondenzacija izoprenskih enot) in terpen ciklazo (ciklizacija C-20 prekurzorja).

Sprožitev apoptoze je ena glavnih strategij fitopatogenih gliv, saj omogoča hitro pridobivanje hranil iz rastline. Gliva *Fusarium graminearum* sintetizira fitotoksin deoksivalenol (DON); prvi encim v sintezni poti je trihodien sintaza, ki ciklizira farnezil pirofosfat do trihodienu. DON je gostiteljsko specifičen toksin, ki inhibira translacijo, ne da bi sprožil obrambni sistem rastline. Gliva je zaščitena proti toksinu z encimom trihotecen 3-O-acetiltransferazo (Tri101), ki acetilira DON v nenevaren 3-ADON.

Viktorin je ciklični pentapeptid iz glive *Cochliobolus victoriae*, ki povzroča rastlinsko rjo na ovsu. Toksin vstopa v mitohondrije rastlinskih celic in se veže na glicin dekarboksilazni kompleks. Posledično pride do cepitve DNA molekul, lipidne oksidacije, razgradnje encima RUBISCO in do inhibicije fotorespiracije.

Toksini iz družine citohalazanov (citohalazin A, citohalazin B in hetoglobozini) se specifično vežejo na aktinske filamente in tako blokirajo citokinezo. Gliva *Penicillium expansum* biosintetizira aminokislinsko hrbtnico haetoglobozina A in C s posebno hibridno neribosomalno poliketid sintetazo (CheA). Podobne

hibridne poliketid sintetaze (ACE1) so odkrili tudi v genomu glive *Magnaporthe oryzae*.

Nekateri fitotoksini delujejo kot transkripcijski faktorji ali pa kot epigenetski modifikatorji. Yap1 sorodni protein je znan kot osrednji regulator kvasovke *S. cerevisiae*. V glivi *Ustilago maydis* pa je ta transkripcijski faktor vpleten v proces detoksifikacije s strani rastline proizvedenih reaktivnih kisikovih radikalov. HC-toksin glive *Cochliobolus carbonum* je ciklični tetrapeptid in deluje tako, da inhibira histon deacetilazo (HDAC), kar vodi do hiperacetilacije in posledično do sprememb v ekspresiji genov v rastlini. HC-toksin preko epigenetskih modifikacij stimulira privzem organskih in anorganskih molekul, predvsem nitrata, v koreninski sistem koruze. Gliva *Cochliobolus carbonum* vsebuje kompleksni lokus tox2, ki kodira HC-toksin sintetazo (HTS1) in protein, ki izloča HC-toksin (toxA), s čimer ščiti glivo pred lastnim toksinom (Möbius in Hertweck, 2009).

Rastline se branijo proti patogenim glivam, tako da s posebnimi receptorji prepoznavajo njihove ohranjene molekularne motive (ang. Pathogen Associated Molecular Patterns; PAMP; npr. hitin). Vendar so nekatere glive sposobne produkcije posebnih efektorskih proteinov kodiranih z avirulenčnimi geni

(Avr), ki zaustavijo s strani PAMP stimulirani obrambni sistem. Skozi evolucijo so rastline razvile sekundarni sistem za prepoznavanje patogenov, in sicer preko prepoznavanja njihovih efektorskih proteinov z rastlinskimi proteini rezistence (R proteini). Hipoteza »gen za gen« trdi, da za vsak dominantni Avr gen patogene glive obstaja pripadajoči R gen v gostiteljski rastlini. Interakcija med proteinskima produktoma obeh pripadajočih genov vodi do aktivacije močnih rastlinskih odzivov kot je npr. hipersenzitivni odziv (HR; De Wit in sod., 2009). Avr geni so bili odkriti že pri številnih patogenih glivah kot npr. *Cladosporium fulvum* (Avr2, Avr4, Avr4E in Avr9), *Rhynchosporium secalis* (AvrRrs1/Nip1, Nip3 in Nip2), *Fusarium oxysporum* (Avr3/Six1, Avr2, Avr1), *Leptosphaeria maculans* (AvrLm1–AvrLm9), *Magnaporthe oryzae* (Avr–Pita geni, Avr1–CO39, Ace1, Pwl geni), *Magnaporthe grisea* (Pwl geni, AVR-Pia, AVR-Pii in AVR-Pik/km/kp), *Blumeria graminis* (Avrkl in Avra10) in *Melampsora lini* (AvrL567 geni, AvrM geni, AvrP123 geni in AvrP4). Za nekatere glivne efektorje še niso uspeli dokazati hipoteze »gen za gen«, npr. za *Ecp* gene iz *Cladosporium fulvum*, *Hum3*, *Pep1*, *Stp1* in *Rsp1* iz *U. maydis* ter nekatere *Tox* gene iz *Stagonospora nodorum* in *Pyrenophora tritici-repentis* (De Wit in sod., 2009).

2 MATERIAL IN METODE

Iz treh preglednih člankov iz posebne izdaje revije Current Opinion In Plant Biology, katere tema so bile interakcije rastlin z mikroorganizmi, sva izpisala imena vseh beljakovin oz. genov, za katere je znano, da so efektorji patogenih gliv (Ellis J.G. in sod., 2009; Hematy K. in sod., 2009; Möbius N. in Hertweck C., 2009). V programu Excel 2007 sva uredila seznam, v katerem sva posameznim efektorskim beljakovinom pripisala glivno vrsto, iz katere je bil efektor izoliran, ter referenco, ki je bila citirana v preglednem članku in se nanaša na določen efektor. Nato sva vse dosegljive po zgornjem postopku izpisane reference pregledala in izpisala morebitne novo najdene efektorske proteine. V bazi Protein na strežniku Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/) sva poiskala aminokislinska zaporedja v prejšnjem koraku najdenih efektorskih proteinov in jih prekopirala v skupno tekstovno datoteko.

S spletišča instituta BROAD (www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiDownloads.html) sva prenesla tekstovni datoteki v formatu FASTA s celotnim genomom seva glive *V. albo-atrum* VaMS 102 v obliki sosesk (contigs.fasta) ter z naborom vseh predvidenih genov (genes.fasta). V programskem paketu Blast 2.2.20 sva s programom formatdb.exe iz prenešenih datotek pripravila ločeni lokalni bazi za soseske in predvidene gene. Nato sva s

programom blastall.exe (algoritem tblastn, največja dovoljena E-vrednost 0,01) izvedla iskanje možnih homologov v obeh bazah; kot vhodno datoteko sva uporabila tekstovno datoteko z v literaturi najdenimi efektorskimi beljakovinami (glej zgoraj). S celotnim naborom aminokislinskih zaporedij v literaturi najdenih efektorskih beljakovin sva izvedla poravnavo v programu ClustalX 2.0.12 (Larkin in sod., 2007), nato pa v istem programu na podlagi dobljene poravnave izračunala drevo po metodi združevanja sosedov (NJ; bootstrap=100). Za vse klade na drevesu z zadostno podporo (s parametrom bootstrap večjim od 50) sva izdelala nabore aminokislinskih zaporedij vseh članov določenega klada in vseh njihovih homologov v genomu *V. albo-atrum* in z njim izvedla poravnavo v programu Muscle v 3.6 (Edgar, 2007); na podlagi te poravnave sva izračunala drevo v programu ClustalX (metoda NJ, bootstrap=1000).

V bazi UniProt sva poiskala posamezne dostopne ontologije v literaturi najdenih efektorskih proteinov in jih zbrala v tabeli v programu Excel (geni iz *V. albo-atrum* pa so že vsebovali informacijo o predvideni funkciji v izhodiščni datoteki, dobljeni s spleta). Za vsako na podlagi evolucijske sorodnosti pridobljeno skupino glivnih efektorjev in njihovih homologov sva preverila, če se ujemajo tudi v ontologijah.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Iskanje efektorskih proteinov v literaturi in iskanje njihovih homologov v genomu *V. albo-atrum*

Ob pregledu literature sva našla skupno 142 posameznih efektorskih beljakovin, in sicer 34 v izhodiščnih preglednih člankih in 108 v referencah, ki sva jih našla v teh preglednih člankih. Aminokislinsko zaporedje sva uspela najti le za 118 od teh beljakovin, od tega za 32 efektorjev iz preglednih člankov in 86 iz referenc. Ob izrisu filogenetskega drevesa vseh najdenih aminokislinskih zaporedij sva skupno število najdenih efektorjev zmanjšala, saj se je izkazalo, da je bila najina baza redundantna na račun različnih imen, pod katerimi so znani posamezni efektorji, in sicer za 11 efektorjev. Skupno število unikatnih najdenih aminokislinskih zaporedij znaša 107.

Za 52 efektorskih proteinov so bili z uporabo orodja BLAST najdeni homologi v genomu *Verticillium albo-atrum*. V lokalni bazi sosesk celotnega genoma je bilo zaznanih 1605 posameznih zadetkov (lokalnih poravnavek efektorskega gena in soseske). V lokalni bazi z naborom predvidenih genov pa je bilo najdenih 1555 poravnavek, torej le 3,1% manj kot v bazi sosesk. Iz tega sklepa, da je bil genom bioinformacijsko zadosti kakovostno anotiran. Razlika v številu poravnavek je morebiti v prisotnosti dveh ali večih delov posameznih genov na večih kontigih in s tem v prelomu poravnavek. Za vseh 52 efektorskih proteinov so bili najdeni skupno 443 homologi. V genomu verticilija je predvidenih 10221 genov, torej izkazuje homologijo z glivnimi efektorji vsaj 4,3% verticilijevih genov.

Iskanje efektorskih proteinov v literaturi in njihovih homologov v genomu *V. albo-atrum*

Z iskanjem v bazi UniProt ter kombiniranjem z izpisanimi podatki o genih iz literature nama je uspelo okarakterizirati 48 efektorskih proteinov od 54, ki imajo homologe v verticilijevem genomu. Izvleček ontologije posameznih efektorjev je prikazan v preglednici 1.

3.2 Verticilijevi geni, udeleženi v sintezi in transportu toksinov

Slika 1 prikazuje filogenetsko drevo štirih skupin efektorskih proteinov, prisotnih v genomu *V. albo-*

atrum. Močno so zastopane poliketidne sintaze (Slika 1A), ki se z izhodiščnimi efektorskimi proteini grupirajo v tri veje, od katerih ena vsebuje večino homologov. V celotni skupini je 24 možnih homologov iz genoma *V. albo-atrum*. Le 2 od teh nimata predvidene funkcije, predlagane ontologije preostalih pa ustrezajo ontologiji efektorskih proteinov, ki so grupirani v isto drevo (biosintezna pot glivnih toksinov; Preglednica 1).

Na drevesu manjkajo 4 izhodiščni efektorski proteini, ki naj bi bili udeleženi v biosintetski poti toksinov, in sicer PaFS, Pdx1, ToxC in ToxF. PaFS se skupaj s tremi avirulentnimi geni Avr-Pita1, Avr-Pita2 in Avr-Pita3 združi še z verticilijevim homologom geranilgeranil pirofosfatne sintetaze v klad, ki kaže nekaj sorodnosti z metaloproteinazami in nevtralnimi proteinazami (Slika 1B). PaFS je encim v izoprenoidnem biosinteznem procesu (Möbius in Hertweck, 2009), proteini Avr-Pita pa so metaloproteinaze (Ellis in sod., 2009; De Wit in sod., 2009); morda malo preseneča možnost, da so Avr-Pita sorodnejši verticilijevim homologom za sintezo izoprenoidov kot homologom metaloproteinaz. Pdx1 je udeležen v sintezi piridoksinkega obroča; v verticilijevem genomu ima le en homolog, katerega predvidena funkcija je ustrezna (PDX1, protein piridoksinke sinteze). ToxC je sintaza maščobnih kislin, ki sodeluje v sintezi HC-toksina, v verticilijevem genomu ima en homolog z ustrezno predvideno funkcijo. ToxF je aminotransferaza, tudi udeležena v sintezi HC-toksina; ima 4 homologe, vse z ustrezno predvideno funkcijo; le z enim ima zelo dobro poravnavo ($E < 10^{-60}$).

Tri12, ToxA in Cfp so membranski proteini, ki prenašajo proizvedene toksine iz glivne celice. Filogenetsko so si sorodni (Slika 1D). V verticilijevem genomu imajo 18 predvidenih homologov; Tri12 ima 9 homologov, ToxA in Cfp pa pripadata drugi veji, ki vsebuje še 3 njune statistično in ontološko dobro podprte homologe. Ctb4 in Fer2 pripadata enaki ontologiji, a sta filogenetsko bolj oddaljena; prvi ima 19 homologov, med najboljšimi zadetki so poliaminski transporterji. Fer2 je membranski transportni protein za železo, torej ima popolnoma drugo funkcijo kot preostali štirje zgoraj opisani; v verticilijevem genomu ima 4 homologe. Pri sintezi toksina cercosporina v *C. nicotianae* sodelujeta tudi proteina Ctb2 in Ctb3, ki sta tudi zastopana pri verticiliju s 4 homologji.

Preglednica 1. Razporeditev v literaturi najdenih glivnih efektorskih proteinov glede na celični proces in molekularno funkcijo.

Table 1: Grouping of accessible fungal effector proteins by cellular process and molecular function

Proces	Št. beljak.	Funkcija (število efektorjev;efektorji)
Biosinteza	14	Biosintetska pot glivnih toksinov (15; Ace1, CheA, Ctb1, Efpks1, Fuss, HTS1, HyNRPS, Nps6, PaFS, Pdx1, PKS5, SirP, ToxC, ToxF)
Metabolni proces	11	Oksidoreduktaza (1; Aox) Prenos acilne skupine (2; Cps1, NRPS) Razgradnja ogljikovih hidratov (7; α -glukozidaza, β -glukozidaza, Cbp1, celulaza, EIX, ksilanaza, Pls1) Razgradnja maščob (1; ekstracelularna lipaza)
Oksidoreduktivni procesi	8	Katalazna aktivnost (1; katalaza) Monooksigenazna aktivnost (1; Shh1) O-metiltransferazna aktivnost (2;Ctb2, Ctb3) Prenos acilne skupine (1; Pks1), Vezava kovinskih ionov (3; Fer1, NoxA, ToxD)
Proteoliza	3	Metaloendopeptidaza (3; Avr-Pita1, Avr-Pita2, Avr-pita3)
Celična signalizacija	1	MAP kinaza (1; Vmk1)
Regulacija prepisovanja mRNA	5	Protein, ki veže cinkove ione (4; Cfl α , Ctb8, Nrf1, XlnR) Iz družine bZip (1; ToxE)
Prenos čez celično membrano	5	Prenos toksinov iz glivne celice (5; Cfp, Ctb4, Fer2, ToxA, Tri12)
Komunikacija med celicami	1	Hidrofobin (Vdh1)
Ni znano	4	AnPhiA, Gas1, Gas2, VdNep

3.3 Glivni encimi s homologi v *V. albo-atrum*

V verticilijevem genomu so dobro zastopani tudi katalitični encimi, denimo hidrolaze z 18 homologi v vsaj dveh družinah proteinov (Slika 1C). Homologov α -glukozidaze je 7, homologov β -glukozidaze pa 23.

Cbp1 in Pls1 sodelujeta pri tvorbi posebne invazivne strukture pri *M. grisea* (Möbius in Hertweck, 2009). Pri verticiliju ima prvi vsaj 5 homologov, drugi pa enega statistično dobro podprtega.

Pri verticiliju najdemo še dva homologa alkohol oksidaze (ki je virulenčni dejavnik pri *Cladosporium fulvum*), 13 homologov aciltransferaz in 19 homologov ekstracelularnih lipaz. Proteini, ki vežejo kovinske ione, so tudi dobro zastopani; homologov že obravnavanega Fer2 ter NoxA, ki vežeta železo, je skupno 11, homologov ToxD, ki veže cink in je pomemben člen metabolne poti HC-toksina, pa je pri verticiliju 14.

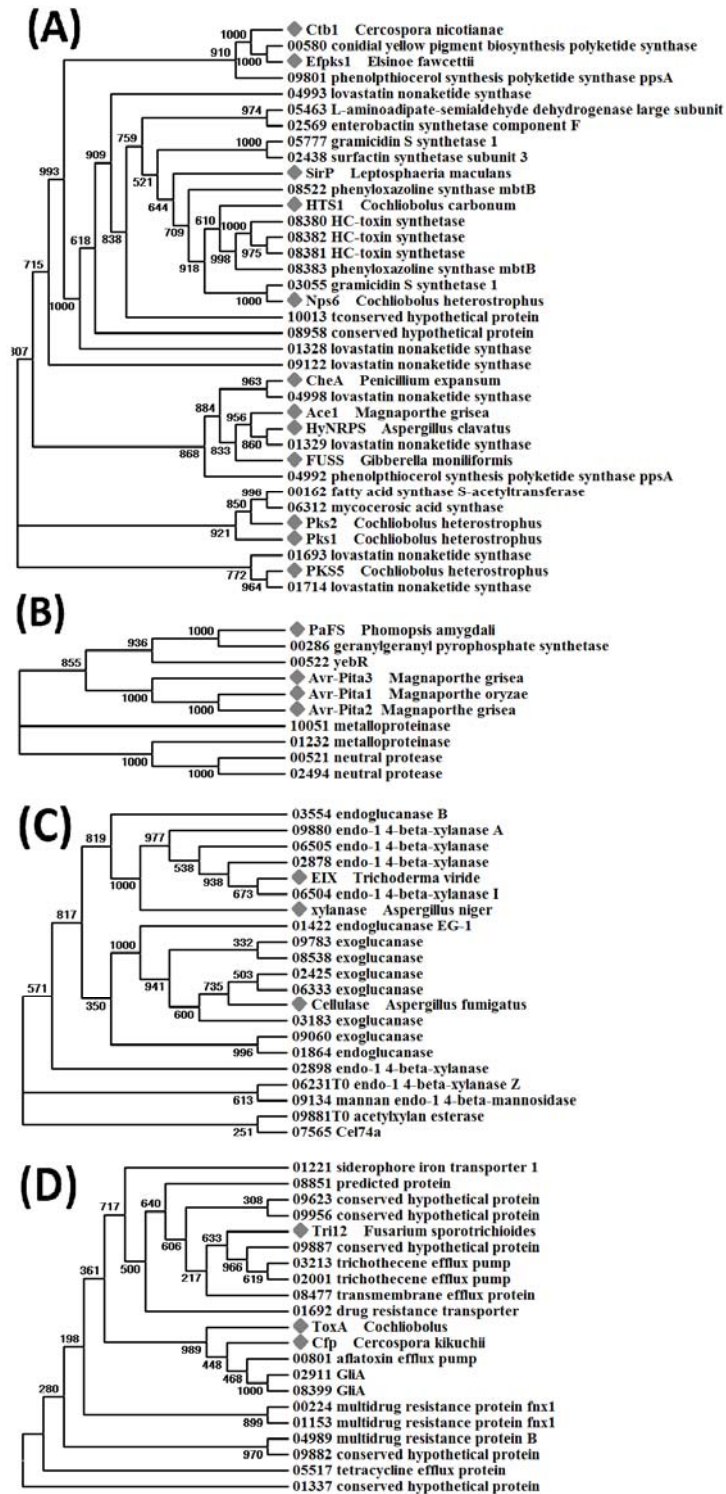
Katalaze so pomembne pri preprečevanju oksidativnega stresa glive in so v verticiliju prisotne vsaj 3; homologov monooksigenaze Shh1 iz glive *Fusarium oxysporum*, ki je tudi udeležena v preprečevanju oksidativnega stresa, pa je 8.

3.4 Verticilijevi homologi s patogenezo povezanih transkripcijskih faktorjev, proteinskih kinaz in proteinov za medcelično komunikacijo

Vmk1 je signalni protein (MAP kinaza), za katerega je znana vloga v celični signalizaciji pri tvorbi mikrosklerocijev (mirovnih struktur) pri glivi *V. dahliae* (Fradin in Thomma, 2006). V genomu *V. albo-atrum* je 74 homologov Vmk1, od katerih ima 5 zelo dobro poravnava z Vmk1. Tudi Vdh1 je udeležen pri tvorbi mikrosklerocijev pri *V. dahliae*, le da gre za protein, udeležen v medcelični signalizaciji; v genomu *V. albo-atrum* ima 3 homologe, kar je razumljivo, saj obe sorodni vrsti gliv tvorita ta tip mirovne strukture (Fradin in Thomma, 2006).

Transkripcijski faktor Ctb8 omogoča prepisovanje genov za encime, ki sodelujejo v sintezi različnih glivnih toksinov; pri *V. albo-atrum* ima 6 homologov. Nrf1, ki sodeluje pri prepisovanju genov za sintezo sideroforov (Möbius in Hertweck, 2009), ima pri verticiliju 4 homologe.

XlnR in Cfl α sta transkripcijska faktorja, ki sodelujeta pri regulaciji sinteze katalitičnih encimov (ksilanaz ter kutinaz; Ellis in sod, 2009). Prvi ima skupno 15 homologov v verticilijevem genomu, od tega 2 z dobro poravnava ($E < 10^{-100}$). Cfl α ima 31 homologov, od tega 2 z dobro poravnava ($E < 10^{-120}$)



Slika 1: Filogenetska drevesa posameznih skupin v literaturi najdenih glivnih efektorjev (posamezni označeni z sivim karom) in njihovih homologov v genomu *V. albo-atrum*. (A) poliketidne sinteze, (B) proteinaze, (C) hidrolitski encimi, (D) transporterji toksinov.

Figure 1: Phylogenetic trees drawn for different groups of fungal effectors retrieved from literature (grey rectangles) and their homologs in the *V. albo-atrum* genome. (A) polyketide synthetases, (B) proteinases, (C) hydrolytic enzymes, (D) toxin transporters

3.5 Verticilijevi homologi proteinov z do sedaj še neznano molekulsko funkcijo

Za 4 v literaturi najdene glivne virulenčne dejavnike, ki imajo tudi zadetke v verticilijevem genomu, ni znano, v katerem biološkem procesu sodelujejo. Za protein

AnPhiA je znano le to, da se nahaja v celični steni glive; zanj sva našla 1 homolog. Za med seboj sorodna Gas1 in Gas2 so bili najdeni 4 homologi, za VdNep pa 7 homologov. Pri slednjem gre za gene za proteine, ki se izločajo iz celice.

4 SKLEPI

Pričujoča raziskava genoma *V. albo atrum* je pokazala na možne osrednje vzroke virulence tega pomembnega glivnega patogena. Verticilij poseduje večje število homologov genov, za katere je znano, da sodelujejo v sintezi glivnih toksinov. Zraven tega ima homologe prenašalcev toksinov in genov, ki sodelujejo v lastni odpornosti glive nanje, in tudi možnih transkripcijskih faktorjev za izražanje teh genov. Verticilij ima homologe za večino znanih genov, povezanih s sintezo in izločanjem tako cercosporina kot tudi HC-toksina. V genomu verticilija je obsežen nabor genov, ki sodelujejo v razgradnji rastlinske celične stene. Verticilij poseduje

gene, ki mu omogočajo razgradnjo kisikovih prostih radikalov, ki so tudi način obrambe rastline pred patogenom. V verticilijevem genomu so tudi homologi za nekatere proteine, katerih delovanje še ni znano, a je bilo z genetskimi študijami pokazano, da imajo pomembno vlogo v poteku glivne virulence. Čeprav sva iz literature izpisala večje število znanih avirulenčnih genov, sva v genomu verticilija našla le eno družino takšnih genov (Avr-Pita1-3). Morebiti je to razlog za slabši obrambni odziv rastline na napad glivnega patogena

5 LITERATURA

- Bhat, R.G., Subbarao, K.V. 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89: 1218-1225.
- Bluhm, B., Dhillon, B., Lindquist, E., Crane, C.F., Kema, G., Goodwin, S.B., Dunkle, L.D. 2008. Analyses of Expressed Sequence Tags from the Maize Foliar Pathogen *Cercospora Zeae-maydis* Identify Novel Genes Expressed during Vegetative, Infectious, & Reproductive Growth. *Biomed Central (BMC) Genomics*. 9: 523.
- De Wit P.J., Mehrabi R., Van den Burg H.A., Stergiopoulos I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, Nov; 10(6): 735-47.
- Edgar R.C. 2007. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 2004, 32(5): 1792-1797.
- Ellis, J.G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A. in Dodds, P.N. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion Plant Biology*, 12: 399-405.
- Fradin, E.F. in Thomma, B.P.H.J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol*, 7: 71-86.
- Hematy K., Cherk C., in Somerville S. 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 12 :406-413.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. Clustal W in Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Möbius N., Hertweck C. 2009. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, Aug; 12(4):390-8.
- Qin, Q. M. in sod. 2006. Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium*. *Phytopathology*, 96: 582-592.