

MOLEKULSKI MARKERJI V DIAGNOSTIKI IN GENETSKIH ANALIZAH FITOPATOGENIH GLIV

Sebastjan RADIŠEK¹, Branka JAVORNIK²

UDK / UDC 631.523.55:631.524.86:631.466 (045)

pregledni znanstveni članek / review article

prispelo / received: 15.09.2009

sprejeto / accepted: 07.12.2009

IZVLEČEK

Molekulski markerji so z razvojem hibridizacijskih tehnik in polimerazne verižne reakcije (PCR) postali osnovno orodje v diagnostiki in genetskih analizah različnih organizmov. Uporabnost molekulskih markerjev je podana s predstavitvijo AFLP (amplified fragment length polymorphism) markerske tehnike, ki v zadnjem desetletju predstavlja najpogostejšo tehniko za vrednotenje genetske variabilnosti fitopatogenih gliv, ter SCAR (sequence characterized amplified region) markerjev, ki so namenjeni predvsem diagnostičnim analizam. Prispevek je usmerjen tudi podrobnejši predstavitvi molekulskih analiz gliv *Verticillium albo-atrum* in *V. dahliae*, ki so omogočile razjasnitev odnosov med izolati iz različnih gostiteljskih rastlin, ter razvoj novih diagnostičnih analiz.

Ključne besede: AFLP, SCAR, *Verticillium* spp.

MOLECULAR MARKERS IN DIAGNOSTICS AND GENETIC ANALYSIS OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

ABSTRACT

With the development of hybridisation techniques and polymerase chain reaction (PCR), molecular markers became primary tool in diagnostics and genetic analysis of different organisms. The usefulness of molecular markers is presented through the novel molecular technique AFLP (amplified fragment length polymorphism), which is the most frequently used technique for assessing the genetic variability of phytopathogenic fungi in the last decade, and SCAR (sequence characterized amplified region) markers, which are used in diagnostics analysis. The manuscript also presents a detailed review of the molecular analysis of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*, which has managed to clarify the relationships among different isolates and to develop new diagnostic analysis.

Key words: AFLP, SCAR, *Verticillium* spp.

¹ Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko, in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

1 UVOD

Molekulski markerji so z razvojem hibridizacijskih tehnik in *in vitro* namnoževanja DNA v polimerazni verižni reakciji (PCR) postali osnovna tehnika v diagnostiki in proučevanju variabilnosti organizmov. Veliko taksonomskih in filogenetskih študij pri glivah je bilo usmerjenih predvsem v analizo specifičnih lokusov ali posameznih delov genoma. Tako pomemben delež raziskav predstavljajo analize ribosomske DNA (rDNA), saj ta kompleks genov vsebuje variabilne in ohranjene regije, prav tako pa je prisoten v več ponovitvah in zato lahko določljiv. Kodirajoča 18S podenota ribosomskih genov spada med evolucijsko ohranjene regije, ki se je pri glivah predvsem proučevala pri iskanju razlik med različnimi rodovi, medtem ko so se pri analizi razlik med vrstami analizirale ITS¹ in IGS² regije, ki so lahko zelo variabilne v DNA zaporedju [2]. Pri ločevanju posameznih vrst je bilo veliko raziskav usmerjenih tudi v analizo mitohondrijske DNA, za katero je znano, da ima višjo evolucijsko stopnjo v primerjavi z jedrno DNA [4]. Naslednje specifično tarčno mesto proučevanja predstavljajo ponovljiva DNA zaporedja, kot so mikrosateliti, za katere je značilna visoka stopnja mutacij in so primerni za vrednotenje genetske variabilnosti. Tako so bili različni oligonukleotidi z mikrosatelitno ali minisatelitno ponovitvijo uporabljeni kot multilokusne RFLP sonde pri proučevanju več kot 70 vrst gliv iz taksonomskih razredov Ascomycetes, Zygomycetes in Deuteromycetes [37]. Pomembno je omeniti tudi raziskave iskanja variabilnosti med glivami s ponovljivimi DNA zaporedji pridobljenimi iz bakteriofaga M13 bakterije *Esheria coli* in ponovljivimi zaporedji REP³ in ERIC⁴, ki predstavljata znaten delež nekodirajoče DNA pri bakterijah [33].

V zadnjem desetletju pri identifikaciji in vrednotenju variabilnosti gliv ter ostalih organizmov prevladujejo predvsem RAPD in AFLP markerji, katerih osnovo predstavlja polimerazna verižna reakcija (PCR) in katerih vrednost se izraža v hkratni analizi več lokusov v posamezni reakciji. RAPD tehnika temelji na uporabi enega samega začetnega oligonukleotida s poljubnim za proučevan organizem nespecifičnim zaporedjem, ki ob prileganju na bližnja nasproti si orientirana mesta na DNA molekulah sproži namnoževanje v PCR reakciji. RAPD markerji so izkazali primernost predvsem pri vrednotenju genetske variabilnosti med ozko sorodnimi organizmi, lahko pa jih uporabimo tudi pri taksonomskih in filogenetskih študijah [8]. AFLP predstavlja novejšo molekularno tehniko in je podrobneje predstavljena v naslednjem poglavju.

2 AFLP MARKERJI PRI ANALIZAH FITOPATOGENIH GLIV

AFLP tehniko so razvili in patentirali leta 1993 ter dve leti kasneje tudi objavili [36]. Metoda temelji na selektivnem PCR namnoževanju restrikcijskih fragmentov, ki so produkt razreza genomske DNA z restrikcijskimi endonukleazami. Stopnja variabilnosti med organizmi je določena z odkrivanjem razlik v prepoznavnih mestih restrikcijskih encimov, ki nastajajo s spremembami v zaporedju nukleotidov. AFLP tehnika tako združuje lastnosti hibridizacijskih tehnik kot je RFLP in možnosti *in vitro* namnoževanja DNA v PCR reakciji. Prednost AFLP tehnike se izraža v občutljivosti odkrivanja polimorfizma in analizah organizmov ne glede na njihov izvor, kompleksnost ali velikost genoma. AFLP zajame celoten genom organizma in omogoča hkratno analizo večih lokusov v eni analizi. Prav tako omogoča povečanje števila

¹ angl. Internal Transcribed Spacer

² angl. Intergenic Spacer

³ angl. Repetitive extragenic palindromic sequence

⁴ angl. Enterobacterial repetitive intergenic consensus

proučevanih lokusov, saj lahko v analizi spreminjamo restriksijske encime in povečujemo število kombinacij začetnih oligonukleotidov [36].

Možnost odkrivanja genetske variabilnosti med ozko sorodnimi organizmi, ki jo ponuja AFLP analiza se pri proučevanju fitopatogenih gliv uporablja predvsem pri identifikaciji različno virulentnih izolatov ali patotipov ter populacijskih študijah izolatov določene vrste. Majer in sod. [19] so prvi uporabili AFLP tehniko pri proučevanju gliv, ki povzročajo rastlinske bolezni. V analizi so proučevali izolate glive *Cladosporium fulvum* in *Pyrenopeziza brassicae* iz različnih geografskih območij. Pri tem so identificirali visok nivo polimorfizma med izolati obeh gliv, vendar ne poročajo o povezavah polimorfizma z virulenco ali izvorom izolatov. AFLP analiza se je izkazala za zelo učinkovito pri proučevanju sorodnosti izolatov glive *Cercospora zaeae-maydis* iz Združenih držav Amerike in Afrike. Omenjena gliva parazitira koruzo in je že več desetletij razširjena v ZDA, kjer se pojavlja v obliki patotipa I in II, v Afriki pa se je prvič pojavila leta 1988. Z AFLP so primerjali izolate iz obeh kontinentov in v analizi uporabili restriksijska encima *EcoRI* in *MseI* ter radioaktivno vizualizacijo namnoženih produktov. Ugotovili so razlike med obema patotipoma iz ZDA in visok nivo sorodnosti afriških izolatov s patotipom II [10].

V zadnjih letih se je število raziskav fitopatogenih gliv z AFLP markerji precej povečalo in po zadnjih podatkih (Web of Science[®]) dosega število več kot 150 znanstvenih člankov v revijah s faktorjem vpliva SCI (Science Citation Index). Kot pregled uporabnosti v preglednici 1 navajamo nekaj vzorčnih primerov prvih raziskav fitopatogenih gliv z AFLP markerji.

Preglednica 1: Pregled nekaterih prvih raziskav fitopatogenih gliv z AFLP markerji
Table 1: Review of some of the first AFLP analysis of phytopathogenic fungi

Gliva	Namen analize	Restriksijski encimi	Vir
<i>Cochliobolus sativus</i>	Določanje razlik med različno virulentnimi izolati	<i>EcoRI/MseI</i>	[39]
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Določanje razlik med različno virulentnimi izolati	<i>EcoRI/MseI</i>	[11]
<i>Diaporthe/Phomopsis helianthi</i>	Določanje razlik med izolati iz različnih geografskih območij	<i>EcoRI/MseI</i>	[32]
<i>Eutypa lata</i>	Določanje razlik med izolati iz različnih geografskih območij	<i>EcoRI/MseI</i>	[9]
<i>Eutypa armeniaceae</i>	Določanje razlik med različnimi specializiranimi formami (<i>formae specialis</i>)	<i>EcoRI/MspI</i>	[1]
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Določanje razlik med izolati iz različnih geografskih območij	<i>EcoRI/MseI</i>	[34]

3 SCAR MARKERJI

AFLP in RAPD tehniki se uporabljata predvsem za analize genomov, vendar metodološko nista primerni za izvajanje rutinskih analiz. Pretvorba specifičnih RAPD ali AFLP markerjev v SCAR markerje pa lahko zelo poveča njihovo uporabnost [38]. SCAR marker (Sequence characterized amplified region) predstavlja DNA fragment določenega lokusa v genomu, ki se lahko identificira s PCR namnoževanjem s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Razvoj SCAR markerjev temelji na določitvi nukleotidnih zaporedjih specifičnih RAPD ali AFLP markerjev, katera so nato osnova za izdelavo SCAR začetnih oligonukleotidov. Bistvena prednost pretvorbe RAPD ali AFLP markerjev v SCAR markerje se izraža v identifikaciji samo enega lokusa, manjši občutljivosti PCR namnoževanja na reakcijske pogoje, hitrosti in enostavnosti analize ter potencialu, da postanejo kodominatni markerji [27].

V diagnostiki rastlinskih patogenov SCAR markerji predstavljajo nove možnosti pri identifikaciji povzročiteljev bolezni, saj relativna enostavnost analize omogoča hitro in natančno detekcijo mikroorganizmov v različnih medijih kot so tla, voda in rastline, kar postavlja nove okvire pri proučevanju rastlinskih bolezni. Tako so Manzanares-Dauleux in sod. [20] opravili pomembno delo pri določanju patotipov glive *Plasmodiophora brassicae*, ki okužujejo križnice in povzročajo bolezen golšavost kapusnic. Omenjena skupina je odkrila RAPD marker, ki je specifičen za zelo virulenten patotip P1 te glive. Odkrit marker so klonirali ter mu določili nukleotidno zaporedje na osnovi katerega so razvili začetne oligonukleotide. Pri testiranju velikega števila izolatov so ugotovili namnoževanje SCAR markerja samo pri izolatih patotipa P1, kar potrjuje njegovo vrednost pri identifikaciji omenjenega patotipa. Razvit SCAR marker so nato optimizirali za identifikacijo v okuženem rastlinskem tkivu. Podobno so Hermosa in sod. [13] na osnovi RAPD analize razvili SCAR marker za določanje patotipa 11 glive *Trichoderma atroviride*, ki je patentiran za biotično zatiranje različnih talnih gliv. Omenjen marker sedaj omogoča lažje spremljanje dinamike patentiranega patotipa na poskusnih poljih.

4 MOLEKULSKE ANALIZE GLIV *VERTICILLIUM ALBO-ATRUM* IN *V. DAHLIAE*

Angleška raziskovalca Carder in Barbara [5] sta leta 1991 med prvimi uporabila molekulske tehnike pri določanju genetske variabilnosti med različnimi izolati vrst *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *V. nubilum*, *V. nigrescens* in *V. lecanii*. Pri tem sta v analizo vključila razrez genomske DNA z *EcoRI* restriksijskim encimom in RFLP metodo, kjer sta za iskanje polimorfizma uporabila hibridizacijo s sondami rDNA iz konoplje, mtDNA iz *V. albo-atrum*, ter naključnimi genomskimi sondami iz glive *V. albo-atrum*. Z neposredno vizualizacijo razreza genomske DNA na agaroznem gelu sta opazila razlike med *V. albo-atrum* in *V. dahliae* ter med ostalimi vrstami, vendar analiza zaradi prisotnosti velikega števila fragmentov ni bila vedno jasna. Glavno odkritje te raziskave pa predstavljajo rezultati RFLP analize z genomskimi sondami, s katerimi sta pri vrsti *V. albo-atrum* ugotovila razlike med izolati iz lucerne (skupina L) in izolati iz ostalih gostiteljskih rastlin (skupina NL), kar je potrjevalo predhodne analize o fiziološki specializaciji izolatov iz lucerne [12].

Barbara in njegova skupina so nato nadaljevali raziskave z RFLP metodo v smeri določanja genetskih razlik med izolati glive *V. dahliae*. Pri tem so v analizo vključili širok spekter izolatov, ki je vključeval tudi fiziološko specializirane izolate iz mete in diploidne izolate *V. dahliae* var. *longisporium*, ki večinoma parazitirajo križnice. Hibridizacijo po Southernu so izvedli z 71 naključnimi genomskimi sondami pridobljenimi iz izolata *V. dahliae* in ostalimi sondami iz predhodnih raziskav. Rezultati analize so potrdili specifičnost izolatov iz mete (skupina M) in diploidnih izolatov (skupina D). Ostali izolati *V. dahliae* so se razvrstili v dve osnovni skupini A in B ter v vmesno skupino I (intermediate), ki pa se za razliko od skupin M niso D ujemale s patogenostjo izolatov, njihovim geografskim izvorom in ostalimi lastnostmi [25,26].

Pri določanju genetske variabilnosti je bilo veliko analiz usmerjenih k proučevanju nekodogenih variabilnih regij med rDNA geni. Tako so Nazar in sod. [24] z določitvijo nukleotidnega zaporedja ITS regij med izolatom *V. albo-atrum* iz lucerne in izolatom *V. dahliae* iz sončnic odkrili nehomologijo v ITS 1 in ITS 2 regijah. Na osnovi razlik so nato razvili specifični hibridizacijski sonde in PCR začetne oligonukleotide, ki se uporabljajo v diagnostiki obeh vrst. Ista skupina raziskovalcev je uporabila specifične začetne

oligonukleotide pri testiranju kanadskih izolatov gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricornis* iz krompirja. Pri tem so odkrili izolat *V. albo-atrum*, ki ni dal pozitivnega signala po PCR reakciji. Omenjenemu izolatu so določili nukleotidno zaporedje ITS regij in ugotovili razliko v 17 baznih parih v primerjavi z ostalimi izolati *V. albo-atrum*. Na osnovi teh razlik so nato razvili specifične začetne oligonukleotide in testirali še izolate *V. albo-atrum* iz Anglije in Nizozemske. Tudi med temi izolati so našli dve skupini izolatov *V. albo-atrum* iz krompirja, kar je dokazovalo odkritje nove podskupine te glive, ki se sedaj pojavlja pod oznako Grp2⁵, medtem ko skupino Grp1 predstavljajo izolati ostalih gostiteljskih rastlin [31].

Morton in sod., [23] so v analizo ITS regij vključili izolate iz predhodno določenih RFLP skupin gliv *V. albo-atrum* (L in NL) in *V. dahliae* (A, B, I, M, D) [5,24,25] ter novo odkrito Grp2 skupino glive *V. albo-atrum*. Pri tem so z določitvijo nukleotidnega zaporedja ITS regij potrdili razliko med skupino izolatov *V. albo-atrum* iz lucerne (L) in izolati ostalih gostiteljskih rastlin (NL). Izolati *V. albo-atrum* so se razlikovali od *V. dahliae* v 5-6 nukleotidih. Slednji so se na osnovi razlike 6 nukleotidov razdelili na diploidne (D) in haploidne izolate (A, B, I, M). Pri skupini Grp2 *V. albo-atrum* so potrdili razliko 17 nukleotidov od ostalih izolatov te vrste in presenetljivo ugotovili podobnost z ITS zaporedjem glive *V. tricornis* manj pomembne fitopatogene vrste.

Pomembne so tudi raziskave izolatov z RAPD markerji. Barasubiye in sod. [3] so prvi uporabili omenjeno metodo za vrednotenje genetske variabilnosti izolatov *V. albo-atrum*. V raziskavo so vključili 15 izolatov iz krompirja in 20 lucerne, ki so jih analizirali s petimi začetnimi oligonukleotidi. RAPD analiza je jasno ločila obe patogeni skupini izolatov in potrdila predhodne ugotovitve o različnosti izolatov iz lucerne. Do podobnih rezultatov sta z RAPD analizo prišla tudi Koike in Fujita [15] pri proučevanju japonskih izolatov glive *V. dahliae* in *V. albo-atrum* iz različnih gostiteljskih rastlin.

Obsežnejšo raziskavo Grp2 skupine sta opravila Mahuku in Platt [17], ki sta z RAPD metodo in razrezom IGS regije (IGS-RFLP) analizirala 21 izolatov *V. tricornis* in 64 različnih izolatov *V. albo-atrum*, od katerih jih je 21 predstavljalo skupino Grp2. RAPD analiza je jasno določila razlike med vsemi tremi skupinami izolatov in določitev 34% povprečnega koeficienta sorodnosti med Grp2 in *V. tricornis* ter 35% med Grp2 in ostalimi izolati *V. albo-atrum* (Grp1). Variabilnost je izrazila tudi analiza IGS regije, ki je prav tako jasno določila razlike med omenjenimi skupinami. Raziskovalca na osnovi rezultatov navajata možnost potrditve Grp2 skupine kot nove vrste rodu *Verticillium*, ki je najverjetneje nastala z hibridizacijo izolata *V. albo-atrum* iz skupine Grp1 in *V. tricornis*.

Collins in sod. [7] so z AFLP metodo in analizo ITS regij proučevali izolate *V. dahliae*, ki parazitirajo križnice. Rezultati so določili dve podskupini diploidnih izolatov *V. dahliae* var. *longisporium*, od katerih jih večina predstavlja skupino imenovano α , ostali izolati pa skupino β . Določeni skupini nimata povezave s patogenostjo ali geografskim izvorom. Molekulska analiza je prav tako ločila haploidne izolate *V. dahliae* iz križnic od izolatov ostalih gostiteljskih rastlin, kar skupaj kaže na tri skupine izolatov, ki so prilagojeni parazitiranju križnic. Avtorji navajajo, da zaradi visoke variabilnosti skupin α in β izolatov *V. dahliae* var. *longisporium* predlagano ime za vse diploidne *V. longisporium* ni primerno.

Molekulski markerji so se izkazali tudi pri določanju razlik med različno virulentnimi izolati, ki so največkrat produkt vpliva monokulturnega gojenja poljščin. Tako so španski

⁵ Grp: kratica angleške besede group (skupina)

raziskovalci z RAPD metodo ugotovili razlike med bolj (*D*) in manj (*ND*) virulentnima patotipoma glive *V. dahliae*, ki parazitirata bombaž in oljke. Identificiranim specifičnim markerjem so določili nukleotidno zaporedje na osnovi katerega so razvili za vsak patotip specifične začetne oligonukleotide (SCAR), s katerimi so nato analizirali več izolatov iz različnih geografskih območij. Analiza s SCAR markerji je identificirala virulentne izolate iz Kalifornije in Kitajske, kar potrjuje hipotezo, da je bil patotip *D* v Španijo prenesen najverjetneje iz ene od teh dveh držav [28]. Podobno raziskava je bila opravljena tudi v Sloveniji, kjer smo z optimizirano AFLP tehniko odkrili DNA fragmente, ki so specifični različno virulentnima hmeljnima patotipoma PG1 in PG2 glive *V. albo-atrum*, kar je potrjevalo ugotovitve testiranja virulence o prisotnosti dveh hmeljnih patotipov v slovenskih hmeljiščih in predstavlja prvo tovrstno poročilo o identifikaciji DNA fragmentov, ki so v povezavi z virulenco pri izolatih *V. albo-atrum* iz hmelja [30].

Z dosedanjimi raziskavami so raziskovalci določili razlike med fitopatogenimi vrstami gliv iz rodu *Verticillium* in razlike med nekaterimi izolati iz različnih gostiteljev. Na osnovi opisanih raziskav z molekulskimi metodami se tako pri *V. albo-atrum* priznavata dve osnovni skupini:

- Grp1, ki vključuje podskupino L (izolati iz lucerne) in NL (izolate ostalih gostiteljskih rastlin, kamor uvršamo tudi izolate iz hmelja) in
- Grp2, ki predstavlja posebno skupino izolatov iz krompirja.

Izolati glive *V. dahliae* kažejo višji nivo variabilnosti, ki pa razen diploidnih izolatov *V. dahliae* var. *longisporium* in haploidnih izolatov iz mete ter bombaža ne kažejo jasnih fizioloških skupin oz. prilagoditve na določeno skupino gostiteljskih rastlin.

4.1 Uporaba molekulskih metod v diagnostiki gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*

Hitra in zanesljiva identifikacija povzročiteljev bolezni ima velik pomen pri preprečevanju nadaljnjega širjenja bolezni. Klasična diagnostika temelji predvsem na osnovi morfoloških lastnosti, uporabi selektivnih gojišč, patogenih testih, analizah vegetativne kompatibilnosti in razlikah v biokemičnih lastnostih. Omenjene metode so večinoma delovno zahtevne, dolgotrajne in podvržene vplivom okolja, kar otežuje zanesljivost identifikacije. Za določitev vrste na osnovi morfoloških lastnosti je pri glivah *V. albo-atrum* in *V. dahliae* potrebna vsaj 2-3 tedenska inkubacija. Prav tako določanje patotipov s patogenimi testi časovno zahteva najmanj 2-3 mesečno analizo. Vpeljava molekulskih metod, s katerimi lahko neposredno analiziramo genom proučevanega organizma in PCR tehnologije, pomeni pomembno dopolnitev obstoječih analitičnih metod.

Prva uporaba PCR metode za identifikacijo izolatov *V. albo-atrum* in *V. dahliae* je temeljila na izdelavi specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki zaznajo razlike v ITS regijah rDNA genov [24]. Razviti začetni oligonukleotidi so omogočili širši razvoj diagnostičnih metod predvsem pri določanju prisotnosti omenjenih gliv v rastlinah in tleh. Tako so Hu in sod. [14] s pomočjo različnih standardov DNA razvili kvantitativno metodo določanja prisotnosti *V. albo-atrum* in *V. dahliae* v okuženih rastlinah lucerne in sončnic. Volossiouk in sod., [35] so prvi objavili neposredno PCR detekcijo glive *V. dahliae* v tleh. Pri tem so z namenom povečanja občutljivosti analize uporabili nested-PCR metodo, ki temelji na dveh zaporednih PCR reakcijah. Prvo namnoževanje so izvedli z začetnimi oligonukleotidi, ki so jih razvili iz nukleotidnih zaporedij ITS regij specifičnih za rod *Verticillium*, analizo pa nato nadaljevali s specifičnimi ITS začetnimi oligonukleotidi za glivo *V. dahliae*. Enako metodologijo so

Mahuku in sod. [18] uporabili pri določanju krompirjevih izolatov skupin Grp1 in Grp2 glive *V. albo-atrum* v rastlinah in tleh.

Carder in sod. [6] so razvili drugo skupino specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki so temeljili na nukleotidnih zaporedjih naključnih genomskih sond, katere so uporabljali pri RFLP analizah izolatov *V. albo-atrum* in *V. dahliae* [5,24,25]. Pri tem so uspešno razvili specifične začetne oligonukleotide za določanje izolatov glive *V. dahliae* in izolatov skupine NL glive *V. albo-atrum*.

Pri *V. dahliae* so znani tudi začetni oligonukleotidi, ki so razviti na osnovi RAPD analiz. Li in sod. [16] so pri proučevanju izolatov gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* odkrili RAPD marker, ki je specifičen samo izolatom *V. dahliae*. Na osnovi nukleotidnega zaporedja polimorfnega markerja so razvili začetne oligonukleotide, ki so ohranili svojo specifičnost pri testiranju širokega spektra različnih izolatov *V. dahliae* in nekaterih sorodnih gliv. Znani so tudi začetni oligonukleotidi, ki so specifični za določanje različno virulentnih patotipov D in ND na bombažu in oljki [28]. Omenjene začetne oligonukleotide so Mercado-Blanco in sod. [21,22] uporabili pri razvoju nested-PCR metode za določanje omenjenih patotipov v obeh gostiteljskih vrstah. V povezavi s prej omenjeno AFLP raziskavo različno virulentnih izolatov glive *V. albo-atrum* iz hmelja (poglavje 4), so bili v Sloveniji na osnovi patotipsko specifičnih AFLP fragmentov izdelani SCAR markerji za določanje zelo virulentnega patotipa PG2. SCAR markerji so omogočili nadaljnji razvoj multipleks in nested PCR diagnostične analize [29], vključeni pa so tudi v diagnostični protokol za določanje gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* na hmelju, ki ga pripravlja EPPO (European Plant Protection Organisation).

Preglednica 2: Najpogosteje uporabljeni začetni oligonukleotidi v diagnostiki gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*
Table 2: The most common primers used in diagnostic of *V. albo-atrum* and *V. dahliae*

Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Specifičnost namnoževanja	Referenca
CCG GTA CAT CAG TCT CTT TA	<i>V. albo-atrum</i> Grp1 (ITS regija)	[24]
ACT CCG ATG CGA GCT GTA AT		
CCG GTA CAT CAG TCT CTA TA	<i>V. albo-atrum</i> Grp2 (ITS regija)	[31]
CAA CCG TTG CCG TACGAG AC		
CCG GTC CAT CAG TCT CTC TG	<i>V. dahliae</i> (ITS regija)	[24]
ACT CCG ATG CGA GCT GTA AC		
CTC ATA ACC CTT TGT GAA CC	<i>Verticillium</i> spp. (ITS regija)	[35]
CCG AGG TCA ACC GTT GCC G		
CAT GGA TAA CCG TGG TAA TT	<i>Verticillium</i> spp. (RFLP sonda)	[6]
CCA TTC AAT CGG TAG TAG CG		
ATG GAC CGA ACA GCT AGG TA	<i>V. albo-atrum</i> skupina NL	[6]
TCT CAG ATA TAT GCT GCT GC	(RFLP sonda)	
CGG TGA CAT AAT ACT GAG AG	<i>V. dahliae</i> (RFLP sonda)	[6]
GAC GAT GCG GAT TGA ACG AA		
CAC ATT CAG TTC AGG AGA CGG A	<i>V. dahliae</i> (RAPD marker)	[16]
CCT TCT ACT GGA GTA TTT CGG		
CAT GTT GCT CTG TTG ACT GG	<i>V. dahliae</i> patotip D	[28]
GAC ACG GTA TCT TTT GCT GAA	(RAPD marker)	
CAG GGG ATA CTG GTA CGA GAC G	<i>V. dahliae</i> patotip ND	[28]
ATG AGT ATT GCC GAT AAG AAC A	(RAPD marker)	
GGTAAGACTCCTTACCGATGCTG	<i>V. albo-atrum</i> hmeljni patotip	[29]
ATTCACACGCTACATATCAAACA	PV1, genotip PG2 (AFLP marker)	

5 ZAKLJUČEK

Pričetek uporabe molekularskih tehnik v genetskih analizah fitopatogenih gliv predstavlja prelomni korak, ki je omogočil pridobiti nova spoznanja pri razumevanju taksonomije, filogenije, razvoja virulence, patogenosti in interakcij med glivami ter rastlinami. Ob tem je prišlo do razvoja novih diagnostičnih analiz, ki so omogočile občutljivejšo, zanesljivejšo in hitrejšo identifikacijo fitopatogenih gliv. Ta napredek je močno obogatil tudi epidemiološke študije, saj sodobne diagnostične analize omogočajo detekcijo v različnih medijih kot so tla, voda in rastline, kar postavlja nove okvire pri proučevanju rastlinskih bolezni. Uporaba molekularskih tehnik bo po eni strani v prihodnosti bolj in bolj omogočala odkrivanje temeljnih spoznanj, po drugi strani pa bo na področju diagnostike vpeljevala nove standarde, ki bodo usmerjeni predvsem v visoko občutljivost, hitrost, enostavnost in zanesljivost analiz.

6 VIRI

1. Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroek, E.J.A., Waalwijk C., Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease.- *Phytopathology*, 90(2000), p. 891-900.
2. Bainbridge, B.W., Heale, J.B., Nucleic acid methods for the identification of fungi producing vascular wilt in agricultural plants, with particular reference to *Verticillium* spp. and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.- V: Fungal identification techniques. Proceedings from the Biotechnology workshop, Barcelona 5-8 april 1995. Rossen, L., Rubio, M., Dawson, T. (eds.), Barcelona, European commission, Science research development. (1995), p. 50-55.
3. Barasubiye, T., Parent, J., Hamelin, R.C., Laberge, S., Richard, C., Dostaler, D., Discrimination between alfalfa and potato isolates of *Verticillium albo-atrum* using RAPD markers.- *Mycological Research*, 12(1995), p. 1507-1512.
4. Bruns, T.D., Palmer, J.D., Evolution of mushroom mitochondrial DNA: *Suillus* and related genera.- *Journal of Molecular Evolution*, 28(1989), p. 349-362.
5. Carder, J.H., Barbara, D.J., Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*.- *Mycological Research*, 8(1991), p. 935-942.
6. Carder, J.H., Morton, A., Tabrett, A.M., Barbara, D.J., Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts.- V: Modern assays for plant pathogenic fungi, identification, detection and quantification. Schots, A., Dewey, F.M., Oliver, R.P. (eds.), Oxford, Wallingford, CAB International, (1994), p. 267.
7. Collins, A., Okoli, C.A.N., Morton, A., Parry, D., Edwards, S.G., Barbara, D.J., Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types.- *Phytopathology*, 93(2002), p. 364-376.
8. Demeke, T., Adams, R.P., Chibbar, R., Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassicaceae*.- *Theoretical and Applied Genetics*, 84(1992), p. 990-994.
9. Descenzo, R.A., Engel, S.R., Gomez, G., Jackson, E.L., Munkvold, G.P., Weller, J., Irelan, N.A., Genetic analysis of eutypa strains from California supports the presence of two pathogenic species.- *Phytopathology*, 89(1999)10, p. 884-893.
10. Dunkle, L.D., Levy, M., Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zea-maydi*.- *Phytopathology*, 5(2000), p. 486-490.

11. González, M., Rodríguez, R., Zavala, M.E., Jacob, J.L., Hernandez, F., Acosta, J., Martinez, O., Simpson, J., Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers.- *Phytopathology*, 88(1998), p.292-299.
12. Heale, J.B., *Verticillium* wilt of alfalfa, background and current research.- *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7(1985), p. 191-198.
13. Hermosa, M.R., Grondona, I., Diaz-Minguez, J.M., Iturriaga, E.A., Monte, E., Development of strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviridae* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens.- *Current Genetics*, 38(2001), p. 343-350.
14. Hu, X., Nazar, R.N., Robb, J., Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development.- *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42(1993), p. 23-36.
15. Koike, M., Fujita, M., Random amplified polymorphic DNA analysis of Japanese isolates of *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum*.- *Plant Disease*, 11(1996), p. 1224-1227.
16. Li, K.N., Rouse, D.I., Eyestone, E.J., German, T.L., The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*.- *Mycological Research*, 103(1999), p. 1361-1368.
17. Mahuku, G.S., Platt, H.W., Molecular evidence that *Verticillium albo-atrum* Grp2 isolates are distinct from *V. albo-atrum* Grp1 and *V. tricorpus*.- *Molecular Plant Pathology*, 3(2002), p. 71-79.
18. Mahuku, G.S., Platt, H.W., Maxwell, P., Comparison of polymerase chain reaction based methods with plating on media to detect and identify *Verticillium* wilt pathogens of potato.- *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(1999), p. 125-131.
19. Majer, D., Mithen, R., Lewis, G.B., Vos, P., Oliver, P.R., The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi.- *Mycological Research*, 100(1996), p. 1107-1111.
20. Manzanares-Dauleux, M.J., Barret, P., Thomas, G., Development of pathotype specific SCAR marker in *Plasmodiophora brassicae*.- *European Journal of Plant Pathology*, 106(2000), p. 781-787.
21. Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Parrilla-Araujo, S., Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction.- *Plant Disease*, 87(2003), p. 1487-1494.
22. Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E., Jiménez-Díaz, R.M., Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR.- *European Journal of Plant Pathology*, 108(2002), p. 1-13.
23. Morton, A., Carder, J.H., Barbara, D.J., Sequences of the internal transcribed spacer of the ribosomal RNA genes and relationships between isolates of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*.- *Plant Pathology*, 44(1995), p. 183-190.
24. Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D., Robb, J., Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens.- *Molecular Plant Pathology*, 39(1991), p. 1-11.
25. Okoli, C.A.N., Carder, J.H., Barbara, D.J., Molecular variation and sub-specific groupings within *V. dahliae*.- *Mycological Research*, 97(1993), p. 233-239.
26. Okoli, C.A.N., Carder, J.H., Barbara, D.J., Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and the relationships of some host adapted isolates of *Verticillium dahliae*.- *Plant Pathology*, 43(1994), p. 33-40.

27. Paran, I., Michelmore, R.W., Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce.- *Theoretical Applied Genetics*, 85(1993), p. 985-993.
28. Perez-Artes, E., Garcia-Pedrajas, M.D., Bejarano-Alcazar, J., Jimenez-Diaz, R.M., Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses.- *European Journal of Plant Pathology*, 106(2000), p. 507-517.
29. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B., Development of pathotype specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop.- *Plant Disease*, 88(2004), p. 1115-1122.
30. Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A., Javornik, B., Characterization of *Verticillium albo-atrum* Field Isolates Using Pathogenicity Data and AFLP Analysis.- *Plant Disease*, 87(2003), p. 633-638.
31. Robb, J., Moukhamedov, R., Hu, X., Platt, H., Nazar, R.N., Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays.- *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43(1993), p. 423-436.
32. SAYS-LESAGE, V., ROECKEL-DREVEY, P., VIGUIE, A., TOURVIEILLE, J., NICOLAS, P., TOURVIEILLE DE LABROUHE, D., Molecular variability within *Diaporthe/Phomopsis helianthi* from France.- *Phytopathology*, 92(2002), p. 308-313.
33. Sharples, G.J., Lloyd, R.G.J.M., A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes.- *Nucleic Acids Research*, 18(1990), p. 6503-6508.
34. Vandermark, G., Martinez, O., Pecina, V., Jesus Alvarado, M., Assessment of genetic relationships among isolates of *Macrophomina phaseolina* using a simplified AFLP technique and two different methods of analysis.- *Mycologia*, 92(2000), p. 656-664.
35. Volossiuk, T., Robb, E.J., Nazar, R.N., Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms.- *Applied and Environmental Microbiology*, 11(1995), p. 3972-3976.
36. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, F., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.- *Nucleic Acids Research*, 21(1995), p. 4407-4414.
37. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, K., *Fingerprinting in Plants and Fungi*.- London, CRC Press, Inc., p. 322.
38. Xu, M., Huaracha, E., Korban, S.S., Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple.- *Genome*, 44(2001), p. 63-70.
39. Zhong, S., Steffenson, B.J., Virulence and Molecular Diversity in *Cochliobolus sativus*.- *Phytopathology*, 91(2001), p. 469-476.