

Tradicionalni in novejši pristopi pri identificiranju/diagnosticiranju antagonističnih gliv na primeru vrste *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G.Arnaud

Klara ŠAVLI^{1, 2}, Stanislav TRDAN³, Janja ZAJC ŽUNIČ¹

Received July 11, 2025, accepted May 30, 2026

Delo je prispelo 11. julij 2025, sprejeto 30. maj 2026

Tradicionalni in novejši pristopi pri identificiranju/diagnosticiranju antagonističnih gliv na primeru vrste *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G.Arnaud

Izvleček: Kvasovka *Aureobasidium pullulans* je poliekstremotolerantna vrsta z izrazito fenotipsko plastičnostjo, ki jo pogosto uporabljajo za biotično zatiranje fitopatogenih gliv na rastlinah in plodovih po pravilu. Tradicionalne metode identifikacije, kot so morfološke in fiziološke analize, temeljijo na opazovanju kolonij, mikroskopskih značilnosti in biokemičnih lastnosti, vendar jih omejuje velika fenotipska variabilnost. V zadnjih desetletjih so sodobne molekularne metode, kot so MALDI-TOF masna spektrometrija, visokopretočna fenotipizacija, sekvenciranje regij črtnih kod DNK in specifično določanje vrst s PCR, postale ključno orodje za zanesljivo identifikacijo in razlikovanje med sevi ter vrstami glive. Kombinacija morfoloških, fizioloških in molekularnih pristopov omogoča večjo natančnost določanja in prispeva k razumevanju filogenetskih odnosov in ekološke raznolikosti med vrstami. Napredek metod, kot so qPCR, ddPCR in sekvenciranje celotnega genoma, pomembno prispeva k standardizaciji ter izboljšanju učinkovitosti tehnik za biotično varstvo rastlin, saj omogoča zanesljivo, hitro in natančno določevanje sevov ter vrst antagonistov. Članek izpostavlja prednosti in omejitve posameznih tehnik identifikacije ter poudarja, da je za natančno določanje glive *A. pullulans* in učinkovito uporabo v varstvu rastlin, ključno povezovanje različnih identifikacijskih metod.

Ključne besede: *Aureobasidium pullulans*, morfološka identifikacija, molekularna identifikacija, visokopretočna fenotipizacija, tehnike PCR

Traditional and modern approaches for identifying/diagnosing antagonistic fungi: the case of *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G.Arnaud

Abstract: The yeast *Aureobasidium pullulans* is a polyextremotolerant fungus with pronounced phenotypic plasticity, widely used in the biocontrol of phytopathogenic fungi on crops and postharvest products. Traditional identification methods, including morphological and physiological analyses based on colony observation, microscopy, and biochemical characteristics, are limited by high phenotypic variability. Consequently, modern molecular techniques, such as MALDI-TOF mass spectrometry, high-throughput phenotyping, DNA barcode sequencing, and species-specific PCR, have become essential tools for accurate identification and differentiation of species and strains. Integrating morphological, physiological, and molecular approaches ensures greater precision and enhances understanding of phylogenetic relationships and ecological diversity among different species. Advances in methods such as qPCR, ddPCR, and whole genome sequencing have significantly contributed to the standardisation of procedures and the effectiveness of biological plant protection strategies in a reliable, rapid and accurate manner. This review discusses the advantages and limitations of various identification methods and emphasises the importance of combining different approaches for accurate determination of *A. pullulans* and its effective application in plant protection.

Key words: *Aureobasidium pullulans*, morphological identification, molecular identification, high-throughput phenotyping, PCR techniques

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana, Slovenija

² korespondenčni avtor: klara.savli@kis.si

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

1 UVOD

Rastlinski patogeni organizmi in škodljivci naj bi letno povzročili do 40 % izgube pridelka na gospodarsko pomembnih poljščinah. Škoda zaradi bolezni rastlin, je ocenjena na 220 milijard evrov letno (FAO, 2019). Zaradi negativnih in dolgotrajnih vplivov fitofarmaceutskih sredstev na okolje ter vse pogostejše odpornosti gliv proti fungicidom (El-Baky in Amara, 2021), se je v zadnjih desetletjih povečalo zanimanje za odkrivanje potencialnih antagonističnih vrst mikroorganizmov za zatiranje rastlinskih škodljivcev in bolezni (Ayaz in sod., 2023). Nekatere vrste gliv lahko z različnimi mehanizmi zmanjšujejo posledice gospodarsko pomembnih bolezni pri poljščinah in sadnih vrstah (Abbey in sod., 2019; Chen in sod., 2018; Roca-Couso in sod., 2021; Santos in sod., 2004). Poleg filamentoznih gliv se za zaviranje rasti fitopatogenih gliv uporabljajo tudi številne kvasovke, kot so *Candida oleophila* Kaisha & Iizuka, *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G.Arnaud, *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby, *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner in *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen (Freimoser in sod., 2019). *A. pullulans* je kvasovkam podobna saprotrofska in epifitska gliva, ki jo v naravi najdemo na odmrli organski masi ali na površju plodov in drugih rastlinskih organov, ter v različnih habitatih (Pertot in sod., 2017; Prasongsuk in sod., 2018; Zalar in sod., 2008). Gliva *A. pullulans* spada v družino Dothioraceae, red Dothideales, razred Dothideomycetes, in deblo Ascomycota. V rod *Aureobasidium* je uvrščenih 63 vrst in varietet, med katerimi je *A. pullulans* ena izmed bolje raziskanih (Cabi Database Index Fungorum, 2025). Je poliekstremotolerantna vrsta, ki zaradi molekularnih prilagoditev in fenotipske plastičnosti lahko uspeva v številnih različnih okoljih in razmerah (Gostinčar in sod., 2011; Slepecky in Starmer, 2009). Številne raziskave kažejo, da je uporaba glive *A. pullulans* v pripravkih za zatiranje nekaterih patogenih vrst gliv učinkovita in lahko poveča količino pridelka (Chen in sod., 2018; Iqbal in sod., 2023). Različni sevi vrste *A. pullulans* so bili uporabljeni za biotično zatiranje bolezni, ki se pojavljajo na plodovih po pravilu (npr. siva plesen) (Bencheqroun in sod., 2007; Lima in sod., 1997; Zhang in sod., 2010). Gliva *A. pullulans* zavira rast nekaterih patogenih gliv v rastlinjakih (Dik in Elad, 1999), vinogradih in drugod na prostem (Di Francesco in sod., 2023; Pertot in sod., 2017). Značilen mehanizem delovanja glive je antibioza, kjer gre za inhibicijo patogena s tvorbo sekundarnih antimikrobnih metabolitov (npr. aureobasidin, antimikotična snov z majhno akutno toksičnostjo) (Rai in sod., 2021; Yurlova in De Hoog, 1997). Drugi mehanizmi delovanja so tekmovanje za hranila in prostor, pri čemer se celice glive *A. pullulans* hitro razrastejo po površju

rastline, tvorijo biofilm in učinkovito porabljajo hranila, kar onemogoča razrast patogenov. Pri tem tvorijo encime, med njimi tudi takšne, ki razgrajujejo celično steno gliv (npr. hitinaza, proteaza in celuloza). Ta mehanizem je opredeljen kot neposreden (Castoria *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2018; De Lucca & Walsh, 1999). V Sloveniji je na seznamu fitofarmaceutskih sredstev na osnovi mikroorganizmov registriran fungicid Botector, ki temelji na glivi *A. pullulans* sevov DSM 14940 in 14941 (UVHVVR, 2024). Ker se potentnost posameznih lastnosti, zaželenih za posamezne načine uporabe, razlikuje med sevi znotraj vrste *A. pullulans*, je iskanje novih in učinkovitejših sevov zelo aktualno. Tradicionalne tehnike identifikacije vrste temeljijo na morfologiji z opisom morfoloških značilnosti kolonij in mikroskopskih značilnosti (Moore in sod., 2011). V mnogih primerih je določanje vrste lahko oteženo in nezanesljivo, saj se sevi iste vrste lahko razlikujejo po rasti in videzu, kar velja tudi za vrsto *A. pullulans* (Di Francesco in sod., 2023; Zalar in sod., 2008). Zaradi fenotipske plastičnosti se morfološke lastnosti glive spreminjajo glede na rastne razmere, v katerih uspeva (Slepecky in Starmer, 2009), kar otežuje tradicionalne pristope identifikacije. Novejša tehnologije in metode, ki se uporabljajo za identifikacijo gliv, pogosto presegajo tradicionalne in omogočajo hitrejšo, občutljivejšo ter bolj zanesljivo identifikacijo (Koren in sod., 2015)

2 IDENTIFIKACIJA IN RAZVRŠČANJE GLIV

Moore in sod. (2011) so identifikacijo in razvrščanje gliv razdelili v štiri osnovne koncepte. Prvi je morfološki koncept razvrščanja vrst, ki temelji na morfoloških podobnostih med vrstami. Za glivo *Aureobasidium pullulans* omenjeni način determinacije ni zanesljiv zaradi velike fenotipske plastičnosti ter zmožnosti prehajanja med hifno in kvasovkam podobno rastjo glede na okoljske razmere (Di Francesco in sod., 2023; Gostinčar in sod., 2019; Slepecky in Starmer, 2009). Poleg tega je bila vrsta *A. pullulans* dolgo obravnavana kot kompleks štirih varietet (var. *pullulans*, var. *subglaciale*, var. *melanogenum* in var. *namibiae*) s prekrivajočimi se morfološkimi in fiziološkimi značilnostmi. Šele molekularne analize skupaj z razlikami v ekologiji, odpornosti na stres ter stopnji melanizacije so privedle do njihovega ločevanja v samostojne vrste, s čimer je morfološko razlikovanje omenjenih vrst postalo nezanesljivo (Di Francesco in sod., 2023; Gostinčar in sod., 2019; Slepecky in Starmer, 2009). Drugi je biološki koncept razvrščanja vrst, kjer se upoštevajo načini parjenja. Pri tem je več omejitev, saj koncept ni veljaven za homotalične in nespolne organizme, kar izloči približno 25 % vrst gliv (Moore in

sod., 2011). Gostinčar in sod. (2019) so izpostavili, da je omenjeni način determinacije za glivo *A. pullulans* lahko zapleten, ker še ni bila ugotovljena spolna rekombinacija znotraj vrste, prav tako pa je v genomu glive prisoten lokus za homotalični način parjenja (Gostinčar in sod., 2014). Prav tako ni uporaben za glive, ki jih ni mogoče gojiti v laboratorijskih razmerah, kot so številne gospodarsko pomembne patogene glive (npr. pepelovke). Ekološki oziroma fiziološki koncept vrste temelji na opredelitvi vrst glede na njihovo ekološko nišo in fiziološke značilnosti, ki določajo možnosti njihovega preživetja, rasti in razmnoževanja v določenem okolju. Pri glivah so takšne značilnosti lahko povezane z izbiro gostitelja ali substrata, načinom prehranjevanja, temperaturnim območjem rasti, toleranco na okoljski stres, izkoriščanjem različnih virov hranil ter sposobnostjo kolonizacije specifičnih habitatov. Tako se na primer dve morfološko skoraj identični glivi obravnavata kot različni vrsti, če sta fiziološko prilagojeni različnim gostiteljem in med njima ni učinkovite izmenjave populacij. Takšen primer so pepelaste plesni (npr. iz rodu *Podosphaera*), pri katerih je gostiteljska specializacija pogosto tako izrazita, da posamezna vrsta okužuje le eno rastlinsko vrsto ali ozek krog sorodnih rastlin, kar predstavlja pomemben sistematski kriterij za njihovo razlikovanje. Pri nekaterih generalističnih vrstah pa je ekološki oziroma fiziološki koncept manj uporaben. Tak primer je vrsta *A. pullulans*, za katero je bila opisana homogena populacijska genetska struktura, ki naj bi bila posledica splošne razširjenosti in velike sposobnosti rekombinacije, ne pa jasne vezanosti na posamezne habitate ali geografske lokacije (Gostinčar in sod., 2019). Četrti je evlucijski oziroma filogenetski način razvrščanja vrst. Ta temelji na molekularnih analizah, ki predvidevajo vrsto gliv kot monofiletsko skupino organizmov, ki si delijo molekularne značilnosti, izhajajoče iz skupnega prednika. Prednost tega koncepta je, da se lahko uporablja za nespolne organizme, torej je uporaben za anamorfne in teleomorfne oblike gliv.

Kombinacija morfoloških, fizioloških in molekularnih pristopov omogoča celostno in zanesljivo identifikacijo gliv, saj združuje prednosti različnih metod. Morfološke analize so predvsem uporabne pri vrstah z jasno izraženimi in tipičnimi diagnostičnimi znaki. Pri številnih glivah je morfologija lahko zelo variabilna zaradi okoljskih dejavnikov, v katerih gliva uspeva, ali zaradi razvojnih stopenj, kar lahko vodi do napačne identifikacije (Di Francesco in sod., 2023). Fiziološki pristopi k identifikaciji gliv vključujejo proučevanje njihovih biokemijskih in presnovnih lastnosti. Pri tem je posebej pomembno asimilacijsko profiliranje, s katerim ugotovljamo sposobnost gliv za izkoriščanje različnih hranilnih virov, kot sta ogljik ali dušik (Atanasova in Druzhinina, 2010; Devadas in sod., 2017). Takšni presnovni profili

lahko pomembno prispevajo k razlikovanju med vrstami oziroma izolati gliv ter dopolnjujejo druge fiziološke podatke, kot sta rast pri različnih okoljskih dejavnikih, encimska aktivnost in odziv na kemična sredstva (Freimoser in sod., 2019). Omenjene lastnosti so lahko vrstno specifične in dopolnjujejo morfološke in molekularne analize zlasti pri določitvi funkcionalnih lastnosti gliv (Venbrux in sod., 2023). Molekularne metode identifikacije, kot je sekvenciranje DNK (npr. regije ITS, LSU, RPB2), pa zagotavljajo visoko občutljivo, objektivno in ponovljivo identifikacijo. Takšne metode omogočajo razlikovanje med kriptičnimi vrstami in spremembe v filogenetskih odnosih med taksoni. V kombinaciji z morfološkiimi analizami so molekularne metode ključne za revizije taksonomije, opredelitev novih vrst in odkrivanje glivne diverzitete (Kozel in Wickes, 2014). Kombinacija treh pristopov omogoča večslojne analize in predstavlja sodoben način identifikacije gliv, ki zagotavlja taksonomsko natančnost ter boljše razumevanje ekološke in funkcionalne raznovrstnosti gliv.

2.1 MOŽNOSTI MORFOLOŠKO-FIZIOLOŠKE IDENTIFIKACIJE GLIVE *A. PULLULANS*

2.1.1 Identifikacija vrst gliv glede na morfološke lastnosti

Morfološka identifikacija, ki temelji na opazovanju makromorfoloških in mikromorfoloških struktur, predstavlja enega izmed temeljnih tradicionalnih diagnostičnih pristopov za določanje gliv (Kozel in Wickes, 2014). Pri takšnem pristopu se rodovi in vrste gliv prepoznavajo na podlagi specifičnih lastnosti kot so oblika in barva kolonij, pigmentacija, zgradba hif, prisotnost klamidiospor, način nastajanja konidijev, oblika, velikost, septiranost in obarvanost konidijev ter morebitno izločanje pigmentov ali drugih metabolitov (Zalar in sod., 2008). Tradicionalno razvrščanje gliv, ki nimajo znanega spolnega razmnoževanja (*Fungi imperfecti*/Deuteromycetes), opredeljuje Saccardova klasifikacija na podlagi morfoloških značilnosti nespolnih struktur (odsotnost ali prisotnost trosišč, njihova struktura) ter oblike in pigmentacije konidijev (Saccardo, 1882–1931). V Saccardovem sistemu bi bila vrsta *A. pullulans* najverjetneje uvrščena med hifomicete (Hyphomycetes), saj tvori nespolne konidije na hifah, vendar bi njena variabilna pigmentacija in prehajanje med hifno ter kvasovkam podobno rastjo povzročala težave pri determinaciji. Pri vrsti *A. pullulans* so konidiogene celice pogosto slabo diferencirane ter se pojavljajo interkalarno ali terminalno na hialinih hifah. Iz njih nastajajo encelični, večinoma hialini kondiji, ki so pogosto razporejeni v skupkih in se

lahko dodatno razmnožujejo z brstenjem interkalarne ali terminalne celice, konidiji pa nastajajo na hifah oziroma drugih celicah, pogosto v skupkih ali z brstenjem (Zalar in sod., 2008). Takšna sposobnost prehajanja med hifno in kvasno obliko rasti razloži fenotipsko plastičnost rodu *Aureobasidium*, a otežuje zanesljivo identifikacijo vrst zgolj na podlagi morfoloških znakov (Slepecky in Starmer, 2009).

Na morfologijo kolonij, stopnjo melanizacije, tvorbo klamidiospor in način rasti lahko vpliva starost kulture, hranilni medij, temperatura, svetloba in drugi okoljski dejavniki. Čeprav so prednosti morfoloških metod majhni stroški, dostopnost in razmeroma hitra izvedba, te metode pogosto ne zadostujejo za zanesljivo identifikacijo na ravni vrste. Različne vrste lahko izražajo podobne morfološke značilnosti, medtem ko lahko sevi iste vrste zaradi fenotipske plastičnosti razvijejo različne strukture glede na razmere, v katerih rastejo. Zato se v sodobni diagnostiki morfološki pristopi praviloma dopolnjujejo s fiziološkimi in molekularnimi metodami, kar omogoča zanesljivejšo identifikacijo in boljše razumevanje taksonomskih, ekoloških in funkcionalnih lastnosti preučevanih gliv (Di Francesco in sod., 2023; Slepecky in Starmer, 2009).

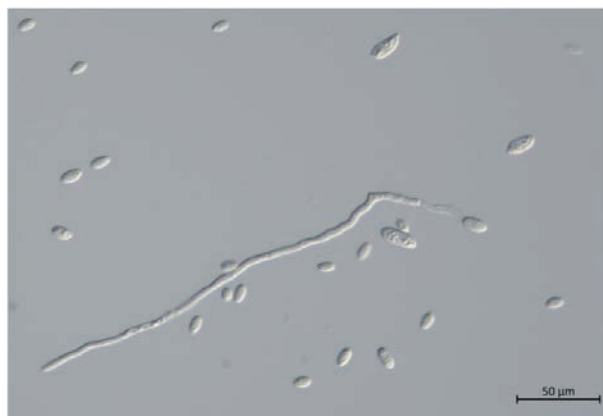
Vrsta *A. pullulans* je lahko zelo variabilna v morfoloških in fizioloških lastnostih ter ima veliko fenotipsko plastičnost (Xiao in sod., 2019). Pri preverjanju značilnosti kultur glive *A. pullulans* je pomembno upoštevati vrsto rastnega medija (npr. MEA/PDA) in razmere inkubacije (temperatura, svetloba, delež relativne zračne vlage). Na morfologijo kolonij glive *A. pullulans* vplivajo starost kolonije, substrat oziroma medij, razpoložljivost in vir ogljika, temperatura ter svetloba v okolju. Kolonije so lahko zaradi teh dejavnikov večje ali manjše, homogene ali razdeljene, lahko imajo rast podobno filamentoznim glivam ali kvasovkam (Slepecky in Starmer, 2009). Kolonije glive *A. pullulans* zrastejo do premera 4 cm pri 24 °C v 7 dneh, na gojišču s sladom (MEA). Vegetativne hife so široke od 3 do 12 µm, značilno prozorne (Slika 1). Hife se na določenih mestih pretvorijo v rjavo-črne klamidiospore z debelimi celičnimi stenami. Konidiofori (trosonosci) so zmanjšani, konidiogene celice so nediferencirane, predvsem interkalarne v prozornih hifah in imajo simpodialno rast. Konidiji, imenovani amerokonidiji nastajajo sinhrono v tesnih skupkih. Ti kasneje poženejo iz sluzastih konidiogenih celic, na katere so pritrjeni. Konidiji imajo značilno neizrazit hilus - mesto, kjer so bili pritrjeni na celico, ki tvori spore. Nastajajo lahko na različne načine na različno septiranih hifah. Konidiji so značilno prozorni in elipsoidni, njihova velikost pa je variabilna (7,5 do 16 x 3,5 do 7 µm). Endokonidiji so pogosto v interkalarnih celicah. Za konidije je značilen pojav brstenja, ki je oblika nespolnega razmnoževanja, kjer

spore nastanejo na površju hif ali celic glive (Domsch in sod., 2007; MYCOBANK database, 2025; Seifert in sod., 2011). Melanin je pri vrsti *A. pullulans* povezan z večjo odpornostjo na okoljske stresne dejavnike. V laboratorijskih razmerah so melanizirane celice pokazale večjo toleranco na UV-C žarke in toplotni stres kot nemelanizirane celice (Campana in sod., 2022). Ker je melanizacija lahko tudi induciran odziv na UV-sevanje in druge okoljske dejavnike, stopnje melanizacije v čisti kulturi ni mogoče neposredno enačiti z obnašanjem vrste ali seva na površini gostiteljske rastline. Nekateri izolati glive imajo rumene, rdeče ali vijolične pigmente, ki lahko delujejo kot pH indikatorji (se razbarvajo v kislih gojiščih) in spremenijo barvo v kombinaciji z drugimi sevi ali drugimi mikroorganizmi (Wickerham in Kurtzman, 1975).

Predhodno opredeljene varietete znotraj kompleksa *A. pullulans* so bile že pred tem podprte z multilokusnim, morfološkim, fiziološkim in ekološkim razlikami (Zalar in sod., 2008). Gostinčar in sod. (2014) so z *de novo* sekvenciranjem genomov enega predstavnika vsake od štirih varietet ter primerjavo celotnih genomskih in filogenetsko relevantnih zaporedij pokazali, da razlike v zaporedju DNK podpirajo dvig varietet znotraj vrste *A. pullulans* na raven samostojnih vrst: *A. pullulans*, *Aureobasidium melanogenum*, *Aureobasidium subglaciale* in *Aureobasidium namibiae*. Vrsta *A. pullulans* značilno tvori kolonije, ki vsaj tri tedne ostanejo rožnate ali svetlorjave in so pogosto izolirane iz osmotskih razmer rasti (Hermanides-Nijhof, 1977; Zalar in sod., 2008). Gliva *A. melanogenum* (Herm.-Nijh.) Zalar, Gostinčar & Gunde-Cim. značilno tvori kolonije, ki so temno zelene ali črne in so pogosto izolirane iz bolj vlažnih razmer rasti (de Hoog in Yurlova, 1994; Zalar in sod., 2008). Gliva *A. subglaciale* (Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.erman) Zalar, Gostinčar & Gunde-Cim., je psihrotolerantna vrsta, ki lahko uspeva pri nizkih temperaturah, omejena je na ledeniške habitate, njen metabolizem pa je prilagojen stalno ledenim razmeram v Arktičnih ledenikih (Gostinčar in sod., 2014; Zalar in sod., 2008). Gliva *A. namibiae* (Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.erman) Zalar, Gostinčar & Gunde-Cim. je monotipska vrsta, izolirana iz marmorja v Namibiji. Za zdaj je bil opisan le en sev, kar nakazuje na ožjo distribucijo vrste (Gostinčar in sod., 2019; Zalar in sod., 2008). Ponekod vrsto *Aureobasidium lini* (Laff.) Herm.-Nijh. navajajo kot *Kabatiella lini* (Laff.) Karak., ki je kot vrsta zelo podobna glivi *A. pullulans*, razlikovanje pa je opazno v večjih konidijih in specifičnosti rasti na lanu (*Linum* sp. L.) (Domsch in sod., 2007; Zalar in sod., 2008).

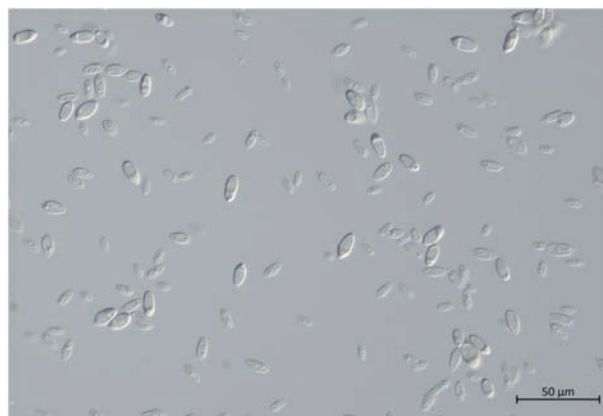
Zalar in sod. (2008) so različne izolate glive *A. pullulans*, pridobljene iz vzorcev ledu s treh lokacij okoli Kongsfjordna, morfološko razvrstili glede na naslednje značilnosti: obarvanost kulture (barva in trajanje

določene obarvanosti), tvorba in lastnosti konidijev ter način konidiogeneze, tvorba melanina na obrobju rasti kulture. Po določitvi morfoloških znakov so opisali natančne značilnosti kulture in mikroskopske značilnosti. Navedli so velikost kulture (premer rasti po določenem številu dni), videz površja (npr. gladko, sluzasto), natančen opis barve (z uporabo barvnih skal), prisotnost sporulacije in obarvanosti hif ter videz in vrsto micelija. Opozorili so tudi na odstopanja oziroma razlike med sevi. Za preverjanje mikroskopskih značilnosti so opisali vrste hif (npr. vegetativne, septirane, debelina celičnih sten, barva), videz in postavitev konidiogenih celic (npr. interkalarno ali terminalno na hife), nastajanje in videz konidijev (npr. nastajanje v tesnih skupkih, barva, velikost). Za vsak vzorec vrste *A. pullulans* so navedli



Slika 1: Gliva *A. pullulans* pri 640 x-ni povečavi; vidne so prozorne hife in enocelični konidiji. Fotografija: Klara Šavli.

Figure 1: Fungus *A. pullulans* under 640 x magnification; hyaline hyphae and unicellular conidia are seen. Photo: Klara Šavli.



Slika 2: Gliva *A. pullulans* pri 640 x-ni povečavi; vidni so enocelični konidiji. Fotografija: Klara Šavli.

Figure 2: Fungus *A. pullulans* under 640 x magnification; unicellular conidia are seen. Photo: Klara Šavli.

največjo tolerirano koncentracijo soli (od 10 do 15 %) za rast in temperaturne mejnike rasti glive.

Di Francesco in sod. (2023) so izpostavili, da morfološke značilnosti gliv iz rodu *Aureobasidium* ne zadostujejo za identifikacijo vrst zaradi njihove ekstremne fenotipske plastičnosti. Fenotipska plastičnost ni prisotna le med vrstami znotraj rodu *Aureobasidium*, temveč tudi med sevi iste vrste gliv.

2.1.2 Metode identifikacije glede na fiziološke lastnosti

Fiziološki in biokemijski testi dopolnjujejo morfološko identifikacijo, saj prav tako opisujejo fenotip glive, vendar z vidika njenih presnovnih, encimskih in rastnih značilnosti. Ti pristopi vključujejo ugotavljanje sposobnosti asimilacije različnih virov ogljika, dušika, fosforja ali žvepla, rast pri različnih temperaturah in drugih okoljskih dejavnikih, encimsko aktivnost ter odziv na izbrane kemične spojine. Izvajajo se lahko ročno ali z uporabo komercialnih kompletov in avtomatiziranih sistemov, vendar njihova uporabnost za identifikacijo na ravni vrste ni univerzalna, saj je odvisna od standardizacije razmer, podatkovne zbirke, fiziološke variabilnosti preučevanih sevov in taksonomske pokritosti sistema (Venbrux in sod., 2023). Zato fizioloških metod ni smiselno obravnavati kot nadomestilo za morfološko ali molekularno identifikacijo, temveč kot dopolnilne metode, ki so posebej uporabne za opis funkcionalnih lastnosti izolata.

2.1.2.1 Uporaba trakov API

Trakovi API (angl. analytical profile index) oziroma vdolbine reakcijskih trakov vsebujejo dehidrirane snovi za različne biokemične teste, ki zaznavajo encimsko aktivnost ter asimilacijo ali fermentacijo sladkorjev. Različni trakovi so izdelani za različne skupine organizmov, zato morajo uporabniki trakov API okvirno poznati vsaj širšo taksonomsko ali morfološko uvrstitev organizma (npr. kvasovke), ki ga preučujejo. Reagente v vdolbinah reakcijskih trakov rehidriramo s suspenzijo opazovane kvasovke in inkubiramo približno 72 ur. Nekatere tube znotraj trakov spremenijo barvo zaradi sprememb pH. Rezultati so pridobljeni kot pozitivne/potrjene ali negativne/zavrjene reakcije posameznih vdolbin, na podlagi katerih se iz pridobljenega profila rezultatov izvede identifikacija. Prednosti metode so hitrost, standardiziranost, enostavnost in dolgotrajno shranjevanje. Nekatere slabosti so možnost človeške napake zaradi ročne metodologije ter dejstvo, da metoda temelji na spremembi barve, ki jo lahko posamezniki lahko različno zaznavajo. Trakovi API so manj primerni za identifikacijo plesni, prav tako je manjša občutljivost za nekatere

vrste gliv, predvsem tiste s kompleksnimi in specifičnimi metabolnimi procesi. Za identifikacijo bolj specifičnih skupin kvasovk so potrebni dodatni testi za določanje aktivnosti fenol oksidaze, ureaze in nitrat reduktaze (Land in sod., 1979; Vikki Warren, 2023).

2.1.2.2 Uporaba VITEK 2

VITEK 2 je avtomatizirana platforma za fenotipsko identifikacijo bakterij in kvasovk ter omogoča določanje rezistence na antimikrobne snovi. Tehnika je podobna trakovom API, vendar so pri VITEK 2 namesto trakov z reakcijskimi luknjicami na voljo kartice s 64 luknjicami. Sistem zaznava presnovne spremembe z metodami, ki temeljijo na fluorescenci. Na voljo so različne kartice za identifikacijo različnih skupin organizmov, ki jih med inkubacijo odčitavajo v 15-minutnih časovnih intervalih, da ocenijo motnost in spremembo barve spojin v luknjicah. Ko so podatki zbrani, se izračuna kvantitativna vrednost, značilna za določene taksone v podatkovni zbirki VITEK. Če specifična identifikacija ni dosežena, program navede seznam možnih organizmov ali določi, da sev ne spada v podatkovno zbirko. Prednosti sistema VITEK 2 v primerjavi s trakovi API so zmanjšana možnost človeške napake zaradi manj ročnega dela in ponavljanja. Med omenjenima tehnikama je več podobnosti, saj je pri obeh potrebna inkubacija, identifikacija je omejena na vrste, vključene v podatkovno zbirko, in ni možna identifikacija plesni (Joyanes in sod., 2001; Vikki Warren, 2023).

2.1.2.3 Uporaba metode visokopretočne fenotipizacije

Za identifikacijo se lahko uporablja biokemični sistem testiranja BiologTM, ki temelji na fenotipizaciji in sposobnosti preiskovanega seva, da izkorišča določene substrate kot vir ogljika, dušika ali žvepla (Biolog, 2025; Venbrux in sod., 2023). Mikrotitrsko ploščica omogoča 95 sočasnih fenotipskih testov prek luknjic z dehidriranimi hranili in kemikalijami. Uporaba redoks barvil prek kolorimetričnih indikatorjev omogoča analizo izrabe vira ogljika in odpornosti proti inhibitornim spojinam. Če so snovi reducirane, se barva indikatorskega metabolnega barvila spremeni iz prozorne v vijolično, obarvanost v rumeno in druge barve pa so lahko posledica spremembe pH spojine (Biolog, 2025). Za ugotavljanje metabolnih sposobnosti gliv se uporabljajo tudi modra barvila resazurin (npr. alamarBlueTM), ki vstopajo v žive celice, kjer se reducirajo v rezorufin, ki je rožnato obarvan in fluorescenčen. So indikatorji celične presnovne aktivnosti, saj bolj aktivne celice pretvorijo več resazurina. Redukcija barvila omogoča ugotoviti, ali celice preučevanega organizma metabolizirajo določen vir hranil (npr. ogljik) (Monteiro in sod., 2012). Biolog omogoča identi-

fikacijo oziroma fenotipsko določanje bakterij, filamentoznih gliv in kvasovk. Po inokulaciji ploščic s suspenzijo izbrane glive ali kvasovke se te inkubirajo, potemse meri absorbanco svetlobe posameznih luknjic, nato pa se s pomočjo programske opreme preberejo rezultati in se primerjajo s podatkovno zbirko Biolog za kvasovke oziroma filamentozne glive. Sistem omogoča tudi analizo kinetičnih procesov oziroma spreminjanje kinetike med meritvami, kar omogoči natančnejše analize (tudi glede na hitrost metaboliziranja posameznih substratov) in po meri izdelane ploščice s prilagojenimi substrati. Za glivo *A. pullulans* je na voljo podatkovna zbirka za dva seva: *A. pullulans* var. *pullulans* BGA in *A. pullulans* var. *pullulans* BGB (Biolog, 2025; Vikki Warren, 2023). Blumenstein in sod. (2015) so s pomočjo fenotipizacijskih ploščic razlikovali značilnosti metabolnih procesov posameznih endofitskih gliv, med katerimi je bila gliva *A. pullulans* uvrščena med generaliste. Ugotovili so, da preučevani sev *A. pullulans* preferira manj kisle razmere, kot ostale testirane glive in bolje izkorišča fenolne spojine. Za doseganje učinkovitih rezultatov predlagajo standardizirano gojenje in določitev rastnih razmer opazovanih gliv.

2.1.2.4 Uporaba MALDI-TOF masne spektrometrije

Analitična metoda masne spektrometrije MALDI-TOF (angl. matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) omogoča identifikacijo bakterij in gliv tako, da se peptidni masni »prstni odtis« (PMF) neznanega organizma primerja s PMF v podatkovni zbirki sistema. Delci v vzorcu se ionizirajo in se ločijo glede na razmerje med maso in nabojem, izmerjeno z določanjem časa, ki ga delci potrebujejo za pot do detektorjev na koncu merilnih cevi (Rychert, 2019). Poleg identifikacije ta metoda omogoča tudi karakterizacijo proteinov in metabolitov gliv. Pogosto se za identifikacijo vrst kombinira z 2-D gelsko elektroforezo in kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR). V primerjavi z zgoraj opisanimi fenotipskimi metodami identifikacije je metoda MALDI-TOF bistveno hitrejša in lahko zagotovi identifikacijo organizma v manj kot eni uri (Kozel in Wickes, 2014; Vikki Warren, 2023). Za identifikacijo kvasovk metoda daje učinkovite rezultate in omogoča razlikovanje med vrstami oziroma kompleksi, ki jih je s konvencionalnimi metodami težje določiti. Težava pri identifikaciji gliv je lahko v različnih analizah proteinov, saj na te lahko vpliva starost kulture, iz katere je vzorec pridobljen (Chun in sod., 2022; De Carolis in sod., 2012; Siller-Ruiz in sod., 2017). Magoye in sod. (2020) so v raziskavi preučevali tolerantnost kvasovk na spojine s protiglivičnim delovanjem (kaptan, ciprodinil, difenokonazol ipd.). Z MALDI-TOF tehniko so identificirali seve vrste *A. pullulans* iz vzorcev tal, listov, cvetov in plodov česenj ter

jablane. Ugotovili so, da je bila gliva *A. pullulans* izolirana pri vseh testiranih protiglivičnih spojinah, razen pri piridinkarboksamidu, kar nakazuje, da je na te spojine tolerantna. Pri nekaterih izolatih rast glive *A. pullulans* ni bila inhibirana niti pri velikih koncentracijah fungicidov ($300 \mu\text{g ml}^{-1}$ kaptana in $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ ciprodinila). Pridobljeni rezultati omogočajo vpogled v odpornost med kvasovkami in izbiro sevov glive *A. pullulans* za potencialno uporabo v kombinacijah s kemičnimi sredstvi in kot del integriranih strategij za varstvo rastlin. Nekateri raziskovalci so poročali, da jim podatkovna zbirka MALDI-TOF MS ni omogočila diferenciacijske identifikacije med glivo *A. pullulans* in drugimi vrstami znotraj rodu *Aureobasidium* (Grandhay in sod., 2024).

2.2 TEHNIKE IDENTIFIKACIJE GLIVE *A. PULLULANS* NA PODLAGI ZAPOREDIJ DNK

Na področju mikologije je v zadnjih treh desetletjih prišlo do izjemnega napredka modernih molekularnih tehnik za identifikacijo gliv, kar je močno izboljšalo natančnost in hitrost njihovega taksonomskega razvrščanja. Ključni napredek predstavlja uvedba metod, ki temeljijo na analizi zaporedij DNK, saj te omogočajo zanesljivo ločevanje vrst, tudi v primerih morfološko podobnih ali filogenetsko sorodnih organizmov (Kozel in Wickes, 2014).

Med sodobne molekularne pristope sodijo različne izvedbe verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki omogočajo pomnoževanje specifičnih genskih označevalcev (črtnih kod). Tem v nadaljnjem koraku sekvenciranja, kot je sekvenciranje po Sangerju, določimo zaporedje nukleotidov, prek katerega lahko identificiramo neznano vrsto. Za identifikacijo vrst se uporabljajo tudi različne izvedbe PCR, kot so konvencionalni PCR, PCR v realnem času (qPCR), multipleksni (hkratni) PCR in digitalni PCR. Te tehnike omogočajo detekcijo in kvantifikacijo specifičnih genskih označevalcev. V zadnjem času se zaradi nižanja cen sekvenciranja pogosto izvaja sekvenciranje celotnega genoma (WGS), ki omogoča celovito filogenetsko analizo in odkrivanje populacijske raznolikosti znotraj vrste (Kozel in Wickes, 2014; Venbrux in sod., 2023).

2.2.1 Določanje zaporedij DNK črtnih kod

Za določanje zaporedij DNK izbranih genskih označevalcev oziroma črtnih kod je treba najprej tarčna zaporedja namnožiti z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), pri kateri se encimsko pomnoži izbrani del tarčnega zaporedja DNK. Tako se pridobi veliko število kopij izbranega zaporedja, ki ga je nato mogoče sekvenci-

rati in primerjati z referenčnimi zaporedji v podatkovnih zbirkah (Mullis, 1990).

PCR je zato osrednja tehnika pri številnih molekularnih metodah identifikacije gliv, kot glavna diagnostična strategija ali kot eden izmed preliminarnih korakov v izvedbi diagnostičnega testa. Prednosti metod, ki temeljijo na PCR in sekvenciranju, so predvsem velika občutljivost, možnost identifikacije iz majhne količine materiala, hitrost ter uporabnost tudi pri organizmih, ki jih je težko ali nemogoče gojiti v laboratorijskih razmerah. Ključna pa je izbira ustreznega genetskega označevalca, saj edinstvenega optimalnega tarčnega gena za vse fitopatogene glive in oomicete ne obstaja. Izbira markerja je zato odvisna od preučevane vrste oziroma širše taksonomske skupine gliv (Schena in sod., 2013).

Za identifikacijo vrst gliv se uporablja več pristopov genotipske identifikacije, najpogostejše z določanjem zaporedij standardnih ribosomskih in proteinsko kodirajočih označevalcev. Med ribosomskimi označevalci se najpogostejše uporabljajo regija ITS, ki predstavlja primarno glivno DNK oziroma 28S/LSU, vključno z regijo D1/D2, ter pri nekaterih skupinah tudi intergenski vmesnik IGS (Kozel in Wickes, 2014). Kadar ITS ne omogoča zadostne ločljivosti med sorodnimi vrstami, se uporabljajo dodatni proteinsko kodirajoči označevalci, kot so translacijski elongacijski faktor TEF-1 α (*TEF1 α*), β -tubulin (β -TUB ali *TUB2*) in gen za RNK-polimerazo II (*RPB2*) (Schena in sod., 2013; Zajc in sod., 2020).

Pri identifikaciji vrst iz rodu *Aureobasidium* je izbira ustreznega DNK označevalca posebej pomembna, saj lahko en sam marker omogoča le omejeno ločljivost med filogenetsko sorodnimi vrstami. Regija ITS je uporabna za začetno identifikacijo gliv, vendar pri kompleksnih sorodnih vrstah pogosto ne zadostuje za zanesljivo razmejitev na ravni vrste. Pri rodu *Aureobasidium* so bile za taksonomsko in filogenetsko razmejitev uporabljene kombinacije ribosomskih in proteinsko kodirajočih označevalcev, predvsem ITS rDNK, del velike podenote ribosomske DNK oziroma 28S/LSU rDNK, intergenski vmesnik IGS1, *TEF1 α* , β -tubulin (β -TUB) in *RPB2* (Gostinčar in sod., 2014; Zalar in sod., 2008). Zato je za potrditev vrste *A. pullulans* oziroma razlikovanje med sorodnimi vrstami, kot so *A. melanogenum*, *A. subglaciale* in *A. namibiae*, priporočljiv večlokusni pristop. Pri tem se ITS lahko uporabi kot začetni marker, za večjo ločljivost pa se ga dopolni z LSU in vsaj enim ali več proteinsko kodirajočimi geni, na primer *TEF1 α* , β -TUB in/ali *RPB2*. Pri diagnostični uporabi je pomembno tudi, da se pridobljena zaporedja primerjajo z zanesljivimi referenčnimi zaporedji tipskih oziroma dobro opredeljenih sevov (Gostinčar in sod., 2014).

Trenutno je v rutinski diagnostiki gliv pogosto uporabljen pristop sekvenciranja D1/D2 velike podenote

ribosomske DNK ali regije ITS iz DNK čiste kulture. Pridobljena zaporedja se nato analizirajo z ustreznimi bioinformatičnimi orodji in primerjajo z referenčnimi zaporedji v podatkovnih zbirkah, kot sta GenBank ali UNITE. Pri nekaterih skupinah kvasovk in kvasovkam podobnih gliv lahko že zaporedja D1/D2 LSU omogočajo identifikacijo do ravni vrste, medtem ko je pri drugih skupinah potrebna dodatna analiza ITS ali drugih markerjev. Ker imajo nekateri ribosomski označevalci omejeno ločljivost med tesno sorodnimi vrstami, se za zanesljivo vrstno identifikacijo vse pogosteje uporabljajo kombinacije več markerjev. Takšen večlokusni pristop omogoča natančnejšo filogenetsko razmejitev, zmanjšuje možnost napačne identifikacije in je posebej pomemben pri taksonomsko kompleksnih rodovih, kot je *Aureobasidium* (Gostinčar in sod., 2014; Kozel in Wickes, 2014; Venbrux in sod., 2023; Vikki Warren, 2023; Zalar in sod., 2008).

2.2.2 Specifične metode identifikacije in diagnostike na podlagi PCR (cPCR, qPCR, ddPCR, RAPD, LAMP)

Pri metodah, ki temeljijo na PCR, je smiselno razlikovati med identifikacijo neznanega izolata ter ciljno diagnostiko oziroma detekcijo vnaprej opredeljene vrste, skupine vrst ali seva. Identifikacija neznanega izolata običajno temelji na določanju zaporedij, ustreznih DNK označevalcev in primerjavi pridobljenih zaporedij z referenčnimi zaporedji v podatkovnih zbirkah. Nasprotno pa so metode, kot so konvencionalni PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, qPCR, ddPCR in LAMP, praviloma ciljno usmerjene diagnostične metode. Njihov namen je potrditi ali zaznati prisotnost vnaprej določenega organizma na podlagi specifičnega tarčnega zaporedja. Zato je pri teh metodah ključna ustrezna zasnova začetnih oligonukleotidov oziroma sond, ki morajo omogočati razlikovanje tarčnega organizma od sorodnih vrst ali netačnih mikroorganizmov v vzorcu.

Osnovni način ciljne molekularne diagnostike je konvencionalni PCR (cPCR), pri katerem se uporabljajo vrstno, skupinsko ali sevno specifični začetni oligonukleotidi za pomnoževanje izbranega dela glivne DNK. Rezultati so prikazani kot prisotnost ali odsotnost pomnožka pričakovane velikosti po ločevanju z gelsko elektroforezo. Takšen pristop je uporaben predvsem, ko je tarčni organizem že vnaprej opredeljen, metoda pa služi potrditvi njegove prisotnosti v čisti kulturi ali kompleksnem vzorcu (Kozel in Wickes, 2014). Pri rodu *Aureobasidium* so bile razvite različne metode na osnovi PCR za razlikovanje vrst ali sevov. Yurlova in sod. (1996) so nadgradili cPCR z začetnimi oligonukleotidi 5.8s-R in LR7 z restrikcijsko analizo pomnožkov z encimi *AluI*,

DdeI, *HhaI*, *MspI* in *RsaI*, pri čemer so za posamezne vrste in izolate dobili značilne vzorce fragmentov (PCR ribotipizacija).

PCR v realnem času oziroma qPCR omogoča detekcijo in kvantifikacijo tarčnih nukleinskih kislin z merjenjem fluorescence med potekom pomnoževanja. V diagnostiki gliv se uporablja predvsem za hitro potrjevanje prisotnosti znanih vrst ali sevov ter za oceno količine tarčne DNK v vzorcu (Kozel in Wickes, 2014; Mackay, 2004). Spremljanje fluorescence omogočajo nespecifična vezavna barvila, kot sta SYBR Green ali EvaGreen, ali specifične fluorescenčno označene hibridizacijske sonde, ki povečajo specifičnost detekcije (Mackay, 2004). Med fazo podaljševanja aktivnost DNK polimeraze razcepi sondo, kar se v rezultatih pokaže kot povečanje fluorescence (Heid in sod., 1996; Kozel in Wickes, 2014). Zanesljiva uporaba qPCR zaradi specifičnosti zahteva optimizacijo ekstrakcije in čiščenja DNK, izbiro ustrezne tarčne regije, preverjanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov oziroma sond ter validacijo metode glede občutljivosti, specifičnosti, ponovljivosti in natančnosti. Poleg tega je treba upoštevati možnost zaznave DNK iz odmrlih celic, prisotnost inhibitorjev PCR in vpliv kakovosti vzorca na rezultat (Lončarić in sod., 2008; Schena in sod., 2013; Venbrux in sod., 2023). Lončarić in sod. (2008) so razvili sevno specifično in občutljivo metodo za identifikacijo dveh sevov glive *A. pullulans*, ki se uporabljata kot biotična agensa proti hruševemu ožigu, s pomočjo hkratne analize PCR. Takšen pristop omogoča razlikovanje izbranih sevov znotraj vrste, vendar gre za ciljno diagnostiko znanih sevov in ne za splošno identifikacijo neznanega izolata.

Poleg omenjenih tehnik PCR se za detekcijo in determinacijo gliv uporablja tudi ddPCR (angl. digital droplet PCR), ki je novejša tehnika verižne reakcije s polimerazo. Temelji na razdelitvi reakcijske mešanice v veliko število nanolitrijskih kapljic, v katerih poteka pomnoževanje tarčne DNK. Po končani reakciji se posamezne kapljice opredelijo kot pozitivne ali negativne glede na prisotnost fluorescence, kar omogoča absolutno kvantifikacijo tarčne nukleinske kisline brez uporabe kalibracijske krivulje. V primerjavi s qPCR je ddPCR pogosto natančnejši pri majhnih koncentracijah tarče, manj občutljiv na inhibitorje PCR in uporaben za zaznavanje majhnih razlik v količini tarčne DNK (Selvaraj in sod., 2019; Taylor in sod., 2017; Venbrux in sod., 2023).

Za razvoj sevno specifičnih diagnostičnih orodij se lahko uporablja tudi tehnika naključno pomnoženih polimorfničnih DNK (angl. random amplified polymorphic DNA – RAPD), pri kateri se s kratkimi naključnimi začetnimi oligonukleotidi pomnožijo fragmenti različnih dolžin. Ti fragmenti lahko predstavljajo polimorfizme, značilne za posamezne seve ali populacije. Ker je me-

toda občutljiva na reakcijske razmere, se RAPD pogosto uporablja kot izhodišče za razvoj bolj specifičnih markerjev, na primer SCAR markerjev (Di Francesco in sod., 2018; Urzi in sod., 1999). Di Francesco in sod. (2018) so z uporabo RAPD-PCR molekularno karakterizirali seva L1 in L8 ter razvili SCAR začetne oligonukleotide, ki omogočajo razlikovanje teh dveh sevov od drugih populacij vrste *A. pullulans*. V nadaljevanju so metodo povezali z ddPCR za določanje specifičnosti in absolutne količine DNK oziroma celic izbranih sevov.

Med ciljno usmerjene molekularne diagnostične metode spada tudi LAMP (angl. loop-mediated isothermal amplification), izotermna metoda pomnoževanja nukleinskih kislin. Temelji na uporabi več začetnih oligonukleotidov, ki prepoznajo več regij tarčne DNK, in DNK-polimeraze z aktivnostjo izpodrivanja verige. Reakcija poteka pri stalni temperaturi, običajno med 60 in 65 °C, rezultati pa so lahko vidni že v 30 do 60 minutah. Produkta LAMP je mogoče zaznati z barvnimi spremembami, fluorescenco, na trakovih z lateralnim tokom, agregacijo nanodelcev ali drugimi načini detekcije. Zaradi enostavnejše opreme in hitre izvedbe je metoda potencialno uporabna za terensko diagnostiko, vendar zahteva zelo natančno zasnovo začetnih oligonukleotidov in skrbno validacijo specifičnosti, da ne pride do napačno pozitivnih rezultatov (Ivanov in sod., 2021; Niessen, 2015).

2.2.3 Sekvenciranje celotnega genoma

Sekvenciranje celotnega genoma (angl. whole genome sequencing – WGS) je tehnika, ki omogoča natančno branje in analizo celotne DNK sekvence organizma (Lu in sod., 2025). Vrste znotraj rodu *Aureobasidium* se najpogosteje določajo na podlagi večlokusnih analiz različnih regij rDNK genskih skupin. Uporaba hišnih genov se je izkazala za učinkovito pri filogenetski analizi. Gostinčar in sod. (2014) so s pomočjo *de novo* sekvenciranja celotnega genoma štiri varietete glive *A. pullulans* prevrstili v samostojne vrste. Raziskani genomi so imeli od 25.4 do 29.6 milijonov baznih parov (Mb) in so kodirali med 10.000 in 12.000 predvidenih proteinov. Večina identificiranih proteinov je bila značilna za vse štiri opazovane vrste. Proteini imajo pomembno vlogo v biotehnologiji in varstvu okolja. Ugotovili so tudi, da je ena od štirih vrst vsebovala homologe genov, ki so vključeni v biosintezo aureobasidina A (*ABA1* gen), kar nakazuje, da tvorjenje omenjene protiglivične snovi ni univerzalna značilnost med sevi glive *A. pullulans*. Uporabili so različne gene, ki kodirajo proteine: aktin (*ACT*), β -tubulin (*BtuB*), kalmodulin (*CAL*), hitin sintetazo (*CHS*), NAD-odvisno glicerol-3-fosfat dehidrogenazo (*GPD*), gene za RNK polimerazo 1 (*RPB1*), RNK polimerazo 2 (*RPB2*) in fak-

tor podaljševanja prevajanja 1 α (*TEF1 α*). Našteti geni so bili uporabljeni za prikaz razlik med štirimi vrstami glive *Aureobasidium*. Analiza 50 genomov sevov, podobnih *A. pullulans*, pridobljenih iz različnih geografskih lokacij in okoljskih razmer, je razkrila homogeno genetsko strukturo populacij vrst in visoko stopnjo rekombinacije. To je potrdilo generalistični značaj glive *A. pullulans* in njeno zmožnost uspevanja v različnih in ekstremnih okoljih, ne da bi se specializirala na habitate na ravni genoma. Takšno delovanje glive je lahko povezano z dobro razpršitvijo spor in veliko sposobnostjo rekombinacije (Gostinčar in sod., 2019).

3 ZAKLJUČEK

Poliekstremotolerantna gliva *A. pullulans* je zaradi razširjenosti, fenotipske plastičnosti, presnovne raznolikosti in antagonističnega delovanja pomembna tako v biotehnologiji kot v biotičnem varstvu rastlin. Učinkovita je pri zaviranju številnih fitopatogenih gliv, ki povzročajo bolezni na rastlinah in pridelkih po spravilu (Chen in sod., 2018; Iqbal in sod., 2023). Poleg sekundarnih metabolitov s protiglivičnim delovanjem, tvori tudi industrijsko pomemben biopolimer pululan in druge metabolite (De Lucca & Walsh, 1999; Rai et al., 2021; Yurlova & De Hoog, 1997). Zaradi fenotipske plastičnosti in prilagodljivosti na ekstremne razmere je razširjena v številnih habitatih po svetu. Posledično se gliva *A. pullulans* prilagaja različnim rastnim razmeram s spreminjanjem morfologije, ki se lahko razlikuje tudi znotraj vrste (Di Francesco in sod., 2023; Gostinčar in sod., 2011; Slepecky in Starmer, 2009). Vrsta *A. pullulans* ima nekatere značilne morfološke lastnosti, kot so prozorne vegetativne hife s širino od 3 do 12 μ m in amerokoniديه, ki so pogosto tvorjeni sinhrono v tesnih skupkih. V preteklosti je bila identifikacija glive *A. pullulans* osnovana na morfoloških ključih in mikroskopiji (Domsch in sod., 2007). Zaradi fenotipske plastičnosti in enostavne prilagodljivosti na rastne razmere zanašanje izključno na morfološke značilnosti za identifikacijo in determinacijo vrste *A. pullulans* ni priporočljivo, poleg tega pa napredek v molekularnih tehnikah identifikacije v zadnjih desetletjih omogoča zanesljive in natančne rezultate (Di Francesco in sod., 2023; Koren in sod., 2015; Moore in sod., 2011). Za doseganje zanesljivih rezultatov je potrebno slediti standardiziranim postopkom pridobivanja inokuluma in gojenja za pregledovanje morfoloških znakov ter izolacije DNK in postopka sekvenciranja za molekularno identifikacijo glive *A. pullulans* (Chen in sod., 2018; Fischer in Dott, 2002; Schena in sod., 2013). Fiziološki, biokemični in proteotipski pristopi, kot so asimilacijski testi, sistemi API, VITEK 2, Biolog, MALDI-TOF MS in

drugi omogočajo dodatno karakterizacijo presnovnih, rastnih in proteomskih značilnosti izolatov. Ti pristopi so posebej uporabni za primerjavo sevov, opis funkcionalnih lastnosti in izbiro kandidatov za biotično varstvo, vendar njihova uporabnost za identifikacijo vrst ostaja odvisna od standardizacije postopkov, razmer gojenja in kakovosti podatkovnih zbirk. Zato se obravnavajo kot dopolnilne metode, ki prispevajo k celovitejši opredelitvi izolata (Kozel in Wickes, 2014; Vikki Warren, 2023). Najzanesljivejšo identifikacijo vrste *A. pullulans* in sorodnih vrst rodu *Aureobasidium* omogočajo molekularni pristopi. Sekvenciranje regij ITS in D1/D2 LSU je uporabno za začetno identifikacijo, vendar pri sorodnih vrstah pogosto ni dovolj ločljivo. Zato je za zanesljivo razmejitev vrst priporočljiv večlokusni pristop, ki vključuje ribosomske označevalce in proteinsko kodirajoče gene, kot so TEF1 α , β -tubulin in/ali RPB2 (Gostinčar in sod., 2014; Zalar in sod., 2008). PCR osnovane metode, kot so cPCR, qPCR, multiplex PCR, ddPCR in LAMP, imajo pomembno vlogo predvsem v ciljni diagnostiki, detekciji in kvantifikaciji znanih vrst ali sevov, medtem ko sekvenciranje celotnega genoma omogoča najvišjo ločljivost pri proučevanju genetske raznolikosti, filogenetskih odnosov in razlik med sevi ter vrstami (Gostinčar in sod., 2014, 2019; Lu in sod., 2025).

4 ZAHVALA

Delo mlade raziskovalke je podprto v sklopu raziskovalne skupine P4-0431 in projekta J4-50140 in financirano s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

5 VIRI

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, Lord, Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., & Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology*, 29(3), 241–262. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>
- Atanasova, L., & Druzhinina, I. S. (2010). Global nutrient profiling by Phenotype MicroArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 11(3), 151–168. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000007>
- Ayaz, M., Li, C.-H., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y.-K., Shafiq, M., Ali, F., Yu, X.-Y., Yu, Q., Zhao, J.-T., Yu, J.-W., Qi, R.-D., & Huang, W.-K. (2023). Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: Journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives. *Molecules*, 28(18), 6735. <https://doi.org/10.3390/molecules28186735>
- Bencheqroun, S. K., Bajji, M., Massart, S., Labhilili, M., Jaafari, S. El, & Jijakli, M. H. (2007). In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.005>
- Cabi Database Index Fungorium. (2025). Pridobljeno s <https://www.speciesfungorum.org/>
- Campana, R., Fanelli, F., & Sisti, M. (2022). Role of melanin in the black yeast fungi *Aureobasidium pullulans* and *Zalaria obscura* in promoting tolerance to environmental stresses and to antimicrobial compounds. *Fungal Biology*, 126(11–12), 817–825. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.11.002>
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S., & De Cicco, V. (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 22(1), 7–17. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00186-1)
- Chen, P.-H., Chen, R.-Y., & Chou, J.-Y. (2018). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, 46(1), 33–46. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454013>
- de Hoog, G. S., & Yurlova, N. A. (1994). Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Journal of Microbiology*, 65(1), 41–54. <https://doi.org/10.1007/BF00878278>
- De Lucca, A. J., & Walsh, T. J. (1999). Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.1.1>
- Devadas, S. M., Ballal, M., Prakash, P., Hande, M., Bhat, G., & Mohandas, V. (2017). Auxanographic carbohydrate assimilation method for large scale yeast identification. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(4), DC01–DC03. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25967.9653>
- Di Francesco, A., Calassanzio, M., Ratti, C., Mari, M., Folchi, A., & Baraldi, E. (2018). Molecular characterization of the two postharvest biological control agents *Aureobasidium pullulans* L1 and L8. *Biological Control*, 123, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.005>
- Di Francesco, A., Zajc, J., & Stenberg, J. A. (2023). *Aureobasidium* spp.: Diversity, versatility, and agricultural utility. *Horticulturae*, 9(1), 59–71. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010059>
- Dik, A. J., & Elad, Y. (1999). Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 105(2), 123–137. <https://doi.org/10.1023/A:1008778213278>
- Domsch, H. K., Gams, W., & Anderson, T. H. (2007). *Compendium of soil fungi* (2nd ed.). IHW-Verlag.
- El-Baky, N. A., & Amara, A. A. A. F. (2021). Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: An updated review. *Journal of Fungi*, 7(11), 900. <https://doi.org/10.3390/jof7110900>
- FAO. (2019). Pridobljeno s <https://www.fao.org/newsroom/detail/New-standards-to-curb-the-global-spread-of-plant-pests-and-diseases/en>
- Fischer, G., & Dott, W. (2002). Quality assurance and good laboratory practice in the mycological laboratory – com-

- pilation of basic techniques for the identification of fungi. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205(6), 433–442. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00190>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Gostinčar, C., Grube, M., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Evolution of fungal pathogens in domestic environments? *Fungal Biology*, 115(10), 1008–1018. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.03.004>
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniquy, J., Ngan, C., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I. V., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, 15(1), 549. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-549>
- Gostinčar, C., Turk, M., Zajc, J., & Gunde-Cimerman, N. (2019). Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining polyextremotolerant generalist. *Environmental Microbiology*, 21(10), 3638–3652. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14693>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hermanides-Nijhof, E. J. (1977). *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 15, 141–177.
- Iqbal, M., Andreasson, E., & Stenberg, J. A. (2023). Biological control of strawberry diseases by *Aureobasidium pullulans* and sugar beet extract under field conditions. *Journal of Plant Pathology*, 105(3), 933–941. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01408-y>
- Ivanov, A. V., Safenkova, I. V., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2021). The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens. *Plants*, 10(11), 2424. <https://doi.org/10.3390/plants10112424>
- Joyanes, P., del Carmen Conejo, M., Martinez-Martinez, L., & Perea, E. J. (2001). Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting Gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3247–3253. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3247-3253.2001>
- Koren, S., Kovač, M., & Toplak, N. (2015). Who lives in our dishwasher? Preliminary results of fungal metagenomic analysis of household dishwashers. *Acta Agriculturae Slovenica*, 106(1). <https://doi.org/10.14720/aas.2015.106.1.1>
- Kozel, T. R., & Wickes, B. (2014). Fungal diagnostics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(4), 14 str. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019299>
- Land, G. A., Harrison, B. A., Hulme, K. L., Cooper, B. H., & Byrd, J. C. (1979). Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(3), 357–364. <https://doi.org/10.1128/jcm.10.3.357-364.1979>
- Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F., & Salerno, M. (1997). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10(2), 169–178. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(96\)01302-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(96)01302-6)
- Lončarić, I., Donat, C., Antlinger, B., Oberlerchner, J. T., Heisenberger, B., & Moosbeckhofer, R. (2008). Strain-specific detection of two *Aureobasidium pullulans* strains, fungal biocontrol agents of fire blight by new, developed multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1433–1441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03668.x>
- Lu, Y., Li, M., Gao, Z., Ma, H., Chong, Y., Hong, J., Wu, J., Wu, D., Xi, D., & Deng, W. (2025). Advances in whole genome sequencing: Methods, tools, and applications in population genomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1), 372. <https://doi.org/10.3390/ijms26010372>
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190–212. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011). *21st Century guidebook to fungi*. Cambridge University Press.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- MYCOBANK database. (2026). Pridobljeno s <https://www.mycobank.org/>
- Niessen, L. (2015). Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2), 553–574. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6196-3>
- Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., & Mugnai, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*, 97, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.010>
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., & Punnapayak, H. (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiologica*, 63(2), 129–140. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0561-4>
- Rai, M., Wypij, M., Ingle, A. P., Trzcińska-Wencel, J., & Gołińska, P. (2021). Emerging trends in pullulan-based antimicrobial systems for various applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13596. <https://doi.org/10.3390/ijms222413596>
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, 7(12), 1045. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>
- Santos, A., Sánchez, A., & Marquina, D. (2004). Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 159(4), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.07.001>
- Schena, L., Li Destri Nicosia, M. G., Sanzani, S. M., Faedda, R., Ippolito, A., & Cacciola, S. O. (2013). Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Plant Pathology*, 95(1), 7–24. <https://www.jstor.org/stable/23721731>
- Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Hajeri, S., & Yokomi, R. (2019). Droplet Digital PCR for Absolute Quantification of Plant Pathogens. In S. Khurana & R. Gaur (Eds.), *Plant Biotech-*

- nology: *Progress in Genomic Era* (pp. 583–595). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8499-8_25
- Slepecky, R. A., & Starmer, W. T. (2009). Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 101(6), 823–832. <https://doi.org/10.3852/08-197>
- Taylor, S. C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports*, 7(1), 2409. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>
- Urzi, C., De Leo, F., Lo Passo, C., & Criseo, G. (1999). Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, 36(1–2), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00014-7)
- UVHVVR. (2024). Pridobljeno s https://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/FFS_sezn.asp?L=1&S=4&top=1
- Venbrux, M., Crauwels, S., & Rediers, H. (2023). Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>
- Vikki Warren. (2023). *Identification Methods for Bacteria and Fungi*. NCIMB. Pridobljeno s <https://www.ncimb.com/microbial-identification/identification-methods-for-bacteria-and-fungi/>
- Xiao, H. S., Chen, R. Y., Cheng, T. L., Fang, W. T., Hsu, C. H., & Chou, J. Y. (2019). Phenotypic plasticity in *Aureobasidium pullulans* isolates. *International Journal of Agriculture and Biology*, 22(1), 167–177. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1047>
- Yurlova, N. A., & De Hoog, G. S. (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Journal of Microbiology*, 72(2), 141–147. <https://doi.org/10.1023/A:1000212003810>
- Yurlova, N. A., Uijthof, J. M. J., & de Hoog, G. S. (1996). Distinction of species in *Aureobasidium* and related genera by PCR-ribotyping. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(4), 323–329. <https://doi.org/10.1007/BF00399621>
- Zajc, J., Černoša, A., Francesco, A. Di, Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Badri, H., Jijakli, H., Ippolito, A., Gostinčar, C., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., & Janisiewicz, W. J. (2020). Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolates selected as biocontrol agents against fruit decay pathogens. *Fungal Genomics & Biology*, 10(1), 163. <https://doi.org/10.35248/2165-8056.20.10.163>
- Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhaddham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61, 21–38. <https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.02>
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010). Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*, 54(3), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.003>