

RAZVOJ NOVIH DIAGNOSTIČNIH METOD ZA IDENTIFIKACIJO POVZROČITELJEV HMELJEVE UVELOSTI

Sebastjan RADIŠEK¹, Jernej JAKŠE²

UDK/UDC 633.791 : 632.2 : 632.911 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 24. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

Identifikacija povzročiteljev hmeljeve uvelosti je izrednega pomena pri odločanju o načinu izvajanja fitosanitarnih ukrepov in v procesu žlahtnjenja odpornih sort. Klasična diagnostika temelji predvsem na osnovi morfoloških lastnosti, uporabi selektivnih gojišč, patogenih testih in analizah vegetativne kompatibilnosti. Nekatere od teh metod so delovno zahtevne, dolgotrajne in podvržene vplivom okolja, kar otežuje zanesljivost identifikacije. V prispevku je predstavljen razvoj in vpeljava novih diagnostičnih metod z uporabo molekulskih tehnik, katerih vrednost se izraža predvsem v hitrosti, občutljivosti in zanesljivosti analize.

Ključne besede: molekularni markerji, *Verticillium albo-atrum*, PCR

DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTICS METHODS FOR IDENTIFICATION OF HOP WILT INDUCERS

ABSTRACT

Identification of hop wilt inducers is very important for deciding how to carry out phytosanitary measures and for resistance breeding of new hop varieties. Traditional diagnostics is primary based on morphological features, selective media, pathogenicity tests and analysis of vegetative compatibility. Some of these methods are laborious, time consuming and influenced by environmental conditions that could hinder the reliability of identification. The article presents the development and introduction of new diagnostic methods using molecular techniques, which enable faster, more sensitive and reliable analysis.

Key words: molecular markers, *Verticillium albo-atrum*, PCR

¹ dr. znanosti, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Diagnostični laboratorij, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

² doc.dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

1 UVOD

Hitra in zanesljiva identifikacija povzročiteljev bolezni predstavlja osnovo pri preprečevanju širjenja bolezni, tako v humanem, živalskem kot v rastlinskem svetu. V Sloveniji smo na področju hmeljarstva s pojavom letalne oblike hmeljeve uvelosti v letu 1997 veliko pozornosti namenili identifikaciji izolatov talnih gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Omenjeni traheomikotični glivici spadata med povzročiteljici uvelosti mnogih rastlin, med katerimi v Evropi naredita največ škode na hmelju. Za hmeljevo uvelost sta značilna dva bolezenska sindroma in sicer blaga in letalna oblika, katerih bistvena razlika je v tem, da letalna oblika povzroča odmiranje rastlin, pri blagi pa se rastline opomorejo in naslednje leto normalno odženejo. Gliva *V. dahliae* je znana kot razmeroma redek povzročitelj blage oblike hmeljeve uvelosti, medtem ko *V. albo-atrum* povzroča večino okužb na hmelju v obeh bolezenskih oblikah. Razvoj blage ali letalne oblike je odvisen predvsem od virulence povzročitelja, velik vpliv na izražanje bolezni pa imajo tudi ekološki dejavniki in odpornost sort [10], kar otežuje zanesljivo določitev bolezni na polju.

Identifikacija povzročiteljic hmeljeve uvelosti je izrednega pomena pri odločanju o načinu izvajanja fitosanitarnih ukrepov in v procesu žlahtnjenja odpornih sort. Klasična diagnostika temelji predvsem na osnovi morfoloških lastnosti glivic, 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 tedenska inkubacija. Prav tako določanje patotipov s patogenimi testi časovno zahteva najmanj 2-3 mesečno analizo. Vpeljava molekularskih tehnik, ki omogočajo hitrejšo in neposredno analizo genoma proučevanega organizma, pomeni pomembno dopolnitev obstoječih analitičnih metod. Tako se pri molekularski identifikaciji posameznih vrst iz rodu *Verticillium* najpogosteje uporablja PCR tehnika z uporabo specifičnih začetnih oligonukletidov, ki zaznajo razlike v ITS regijah rDNA genov [5,8]. Poleg identifikacije pa imajo te tehnike veliko prednost pri omogočanju določanja prisotnosti omenjenih gliv neposredno v rastlinah, tleh in vodi.

V Sloveniji smo pri proučevanju hmeljnih izolatov glive *V. albo-atrum* s pomočjo patogenih testov in molekulske tehnike AFLP (amplified fragment length polymorphism) dokazali prisotnost dveh različno virulentnih skupin izolatov oz. patotipov, od katerih PG1 povzroča blago obliko, PG2 pa letalno obliko hmeljeve uvelosti [6]. Z identifikacijo 17 patotipsko specifičnih fragmentov se je AFLP analiza izkazala kot izredno dobra tehnika za iskanje genetskih razlik med ozko sorodnimi izolati, vendar pa je zaradi delovne zahtevnosti manj primerna za rutinske analize. Iz omenjenega smo raziskavo nadaljevali s pretvorbo patotipsko specifičnih AFLP fragmentov v SCAR diagnostične markerje, ki bi omogočili enostavnejše in hitrejšo določanje omenjenih hmeljnih patotipov.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Kulture izolatov

V raziskavo smo skupno zajeli 92 izolatov gliv iz rodu *Verticillium* iz različnih gostiteljskih rastlin in geografskih območij Evrope in Severne Amerike, ter izolate nekaterih pogostejše zastopanih talnih gliv iz rodov *Alternaria*, *Armillaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monillia*, *Penicillium* in *Trichoderma*. Največji delež so predstavljali izolati *V. albo-atrum* iz hmelja od katerih smo jih 34 izolirali na območju Slovenije, medtem ko smo ostale izolate pridobili iz Anglije (15), Nemčije (5) in Poljske (1). Od 34 slovenskih izolatov jih je 27 pripadalo letalnemu patotipu PG2, 7 pa blagemu patotipu PG1. Vsi izolati v tej raziskavi predstavljajo del mikološke zbirke Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) in se hranijo v duplikatih monospornih kultur na krompirjevem dekstroznemu agarju (PDA-potato dextrose agar; Fluka, Švica) na temperaturi 4°C in v tekočem gojišču »General fungal medium« [13] z 20 % koncentracijo glicerola pri temperaturi -80°C.

2.2 Izolacija DNA

Pred izolacijo DNA iz micelija smo izolate najprej namnožili v že omenjenem tekočem gojišču. Kulture smo 4-5 dni inkubirali v temi pri sobni temperaturi na rotacijskem stresalniku (50 vrt./min). Po inkubaciji smo micelij iz gojišča odstranili z večkratnim centrifugiranjem (5 min pri 2500 x g) in sprotnim spiranjem s sterilno bidestilirano vodo. Sledila je izolacija DNA po vpeljanem SDS protokolu, ki sta ga razvila Lee in Taylor [3], z nekaterimi modifikacijami [7]. Za izolacijo DNA iz prevodnega tkiva rastlin smo uporabili CTAB metodo [2].

2.3 Izolacija AFLP fragmentov in določanje nukleotidnega zaporedja

Patotipsko specifične AFLP fragmente smo pri treh izolatih vsakega PG1 in PG2 patotipa namnožili z ustreznimi AFLP kombinacijami začetnih oligonukleotidov in jih nato ločili z denaturacijsko poliakrilamidno elektroforezo ter detektirali s srebrom. Sledil je takojšnji izrez fragmentov iz gela in ponovno namnoževanje z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi. Reamplificirane PCR produkte smo nanесли na 1,2 % agarozni gel, ki je omogočil ločitev zelenega fragmenta od nespecifičnih PCR produktov. Nadaljnje čiščenje fragmentov iz agaroznega gela smo izvedli po metodi, ki sta jo razvila Boyle in Lew [1]. Postopek smo nadaljevali s kloniranjem fragmentov v plazmidni vektor pPCR-Script™ Amp SK(+) (Stratagene, La Jolla, USA). Rekombinatne plazmide smo iz bakterijskih kultur izolirali s komercialnim kompletom NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel) in jim na osnovi dideoksi sekvenčne reakcije (Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences) ter avtomatske laserske naprave (ALFexpress II DNA Analysis System, Amersham Biosciences) določili nukleotidno zaporedje.

2.4 Izdelava SCAR markerjev in specifičnost PCR namnoževanja

Za vsako nukleotidno zaporedje smo z uporabo programa Primer3 [9] izdelali dva para začetnih oligonukleotidov, od katerih je prvi par temeljil na terminalnem delu, drugi pa na notranjem delu sekvence. Pri določanju optimalnih pogojev PCR namnoževanja in v

začetnem pregledu specifičnosti začetnih oligonukleotidov smo v analizo vključili genomsko DNA 4 izolatov vsakega od hmeljnih patotipov PG1 in PG2, dve negativni kontroli (voda in genomska DNA hmelja) in pozitivno kontrolo (plazmidna DNA z ustreznim fragmentom). Optimizacija je potekala s spreminjanjem temperature prileganja po 2°C (v območju od 50°C do 65°C) navzgor ali navzdol od teoretične temperature prileganja in v povečevanju ali zmanjševanju števila PCR ciklov (od 30 do 35 ciklov). Reakcijske mešanice (20 µl) so vsebovale 1× PCR pufer, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 0,5 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 1,5 mM MgCl₂ in 0,6 enote encima *Taq* DNA polimeraze in 20 ng genomske DNA izolatov. V primeru kontrolnih reakcij smo namesto DNA izolatov, uporabili 2 µl sterilne vode, 20 ng genomske DNA hmelja in 1 ng plazmidne DNA. Reakcije smo izvajali v PCR napravi MWG Primus 96 po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 4 minutna denaturacija pri 94°C, Δ št. ciklov [94°C (45 s), Δ temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov (30 s) in 72°C (60)]. Vzorce smo ločevali z 1,6 % agarozno gelsko elektroforezo. Po določitvi optimalnih pogojev smo specifičnost SCAR markerjev preizkusili še na ostalih izolatih vključenih v raziskavo.

2.5 Multipleks PCR analiza

Multipleks PCR analizo smo izvedli v 20 µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala tri različne pare SCAR začetnih oligonukleotidov (Preglednica 1): 0,25 µM (9-2I-For/9-2I-Rev), 0,5 µM (9-1E-Rev/9-1I-For) in 0,5 µM (1I-For/1I-Rev), 1 PCR pufer, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 2,75 mM MgCl₂, 0,6 enote encima *Taq* DNA polimeraze in 20 ng genomske DNA izolatov. Reakcija je potekala po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 4-minutna denaturacija pri 94°C, ki ji sledi 30 ciklov pri 94°C (45 s), 60°C (30 s) in namnoževanje pri temperaturi 72°C (70 s). Vzorce smo ločevali z 2 % agarozno gelsko elektroforezo.

2.6 Sidrna (nested) PCR analiza

Sidrno PCR analizo smo uporabili za neposredno določanje letalnega patotipa PG2 v okuženem tkivu. Prvo PCR reakcijo smo izvedli z začetnimi oligonukleotidi 9-1E-For/9-1E-Rev, ki temeljijo na terminalnem delu fragmenta AFLP 9-1. Po namnoževanju smo PCR vzorce 10 × razredčili s sterilno vodo in 1 µl razredčene raztopine prenesli v nove mikrocentrifugirke, kjer je sledila druga PCR reakcija z notranjimi začetnimi oligonukleotidi 9-1I-For/9-1I-Rev fragmenta AFLP 9-1. Reakcijski pogoji so bili enaki kot za analizo izolatov (poglavje 2.4) z modifikacijo v zmanjšanju koncentracije začetnih oligonukleotidov na 0,25 µM in številu ciklov na 20 v prvi PCR reakciji.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Razvoj SCAR markerjev

Pretvorba specifičnih AFLP fragmentov v SCAR diagnostične markerje omogoča razširitev njihove uporabnosti v smeri hitrejše, delovno manj zahtevne in občutljive analize, ki je lokusno specifična [14]. Od 17 namnoženih AFLP fragmentov smo uspešno reamplificirali 11 fragmentov, medtem ko smo pri ostalih dobili nespecifične PCR produkte, ki so onemogočali

nadaljnje delo. Uspešno reamplificirane fragmente smo klonirali in jim določili nukleotidno zaporedje, pri čemer smo v primeru treh fragmentov dobili različne sekvence, ki so se razlikovale v razmerju velikosti od 0-2 nukleotidov. Vzrok za pojav različnih nukleotidnih zaporedij lahko iščemo v kontaminaciji med izolacijo fragmentov iz poliakrilamidnih gelov o čemer poročajo Xu in sod., [14] in v prisotnosti različnih sekvenc enakih velikosti v posameznem fragmentu na gelu, kar je posledica metodologije AFLP tehnike [12]. Skupno smo tako pri določanju nukleotidnega zaporedja iz 11 AFLP fragmentov dobili 16 različnih sekvenc, pri čemer so vse imele prisotna ustrezna nukleotidna zaporedja AFLP začetnih oligonukleotidov. Z namenom ohranitve specifičnosti smo za vsako izmed 16 nukleotidnih zaporedij izdelali po dva para začetnih oligonukleotidov. Prvi par smo izdelali iz terminalnega dela sekvence, ki je vključeval *EcoRI/MspI* prepoznavno mesto, selektivne nukleotide in naslednje nukleotide AFLP sekvence do dolžine 23 baznih parov (bp). Drugi par pa smo izdelali iz notranjega dela sekvence.

Po začetni optimizaciji PCR namnoževanja z izdelanimi začetnimi oligonukleotidi smo njihovo specifičnost preizkusili na 92 izolatih rodu *Verticillium* in ostalih izolatih, ki so bili vključeni v raziskavo. Pri tem sta se med PG2 specifičnimi SCAR markerji, S-9-1INT in S-9-1EXT (Preglednica 1), ki izhajata iz fragmenta AFLP-9-1, namnožila samo pri izolatih PG2 patotipa, kar potrjuje predhodne rezultate AFLP analize o specifičnosti tega fragmenta. Visoko specifičnost za patotip PG2 so prav tako ohranili SCAR markerji S-9-2INT, S-11EXT in S-11INT (Preglednica 1). V primeru SCAR markerjev specifičnih za manj virulentni hmeljni patotip PG1 so ti izrazili manjšo stopnjo specifičnosti, saj so se poleg izolatov patotipa PG1 PCR produkti namnožili tudi pri nekaterih izolatih ostalih gostiteljskih rastlin *V. albo-atrum* in *V. dahliae*.

Preglednica 1: Specifičnost, nukleotidno zaporedje, temperatura prileganja in dolžina produktov visoko specifičnih SCAR markerjev

Table 1: Specificity, nucleotide sequences, annealing temperatures, and product length of highly specific SCAR markers

Patotip	SCAR marker	SCAR začetni oligonukleotidi in nukleotidno zaporedje (5-3)	Dolžina produkta	T _a (°C)	
PG1	S-1EXT	1E-For 1E-Rev	ATTCGAGGCTCCGAGCATCC GGATAGGCCCGCACCTTGAGAA	241 bp	59
	S-1INT	1I-For 1I-Rev	CGAGCATCCGATGACACAG AAGAGATCAATAGTCGTTTGCC	175 bp	60
PG2	S-9-1EXT	9-1E-For 9-1E-Rev	GGTAAGACTCCTTACCGATGCTG ATTCACACGCTACATATCAAACA	248 bp	9
	S-9-1INT	9-1I-For 9-1I-Rev	CGATGCTGGATCTGACCAATTAC ATAAGGGCAGGCAAGGCAC	198 bp	65
PG2	S-9-2EXT	9-2E-For 9-2E-Rev	ATTCACCATCAGCCTGTGC GGTAATCCTTGACAACAATATTC	190 bp	60
	S-9-2INT	9-2I-For 9-2I-Rev	CAGCGATGCACCTTCAGTG TGACAACAATATTCTGAAGCCA	163 bp	60
PG2	S-11EXT	11E-For	ATTCTCGCCGATCGTTACTC	216 bp	63
	S-11INT	11E-Rev 11I-For 11I-Rev	GGTACAGCAGCAGTTCCTG GCCATCGCCAAAGTACCAT GCCAGATCATATACCCATTGTC	169 bp	63

3.2 Uporaba SCAR markerjev v diagnostiki

Z namenom razvitja zanesljivejšega diagnostičnega testa za identifikacijo PG1 in PG2 patotipov glive *V. albo-atrum* smo uporabili tehniko hkratnega namnoževanja več SCAR markerjev v eni PCR reakciji. Pri tem smo v metodo vključili tri pare SCAR začetnih oligonukleotidov 9-1E-Rev/9-1I-For, 9-2I-For/9-2I-Rev, 1I-For/1I-Rev. Prva dva para sta specifična za patotip PG2, pri čemer smo zaradi doseganja enotne temperature prileganja 60°C v PCR reakciji, sestavili prvi par iz kombinacije začetnih oligonukleotidov SCAR markerjev S-9-1EXE in S-9-1INT, ki namnožuje fragment dolžine 233 bp. V prvih analizah smo opazili slabše namnoževanje enega izmed PG2 specifičnih fragmentov, kar smo rešili z določitvijo razmerja koncentracij med pari začetnih oligonukleotidov in spreminjanjem koncentracije MgCl₂. Po optimizaciji reakcijskih pogojev smo multipleks PCR tehniko preizkusili na različnih izolatih, kjer se je pokazala kot zelo učinkovito in zanesljivo orodje določanja obeh omenjenih patotipov. Metodo smo ocenili kot delovno manj zahtevno, primerno za testiranje večjega števila vzorcev in časovno izvedljivo v enem dnevu ob predhodni 3-4 dnevni inkubaciji izolatov v tekočem gojišču.

Visoko specifična SCAR markerja S-9-1EXE in S-9-1INT smo uporabili tudi pri neposrednem določanju patotipa PG2 v rastlinskem tkivu. Metodo smo razvijali na genomski DNA umetno okuženih hmeljnih rastlin z vpeljavo nested PCR tehnike, ki se zaradi visoke občutljivosti detekcije uporablja pri določanju prisotnosti organizmov v različnih medijih kot so tla, voda in rastline [11]. Nested PCR analizo smo vpeljali po postopku, ki so ga opisali Mercado-Blanco in sod., [4] in pri tem v prvi PCR reakciji uporabili začetne oligonukleotide 9-1E-For/9-1E-Rev, ki izhajajo iz terminalnega dela fragmenta AFLP-9-1, druga PCR reakcija pa je vključevala začetne oligonukleotide izdelane iz notranjega dela sekvence omenjenega fragmenta. Analiza je pokazala visok nivo detekcije pri vseh okuženih rastlinah ne glede na različno odporne sorte. Pri tem smo tehniko ocenili kot delovno zahtevno, občutljivo na kontaminacijo s tujo DNA, primerno za testiranje manjšega števila vzorcev in časovno izvedljivo v enem dnevu.

4 ZAKLJUČEK

V raziskavi smo uspešno izkoristili predhodno identificirane AFLP fragmente specifične za hmeljna patotipa PG1 in PG2 glive *V. albo-atrum* in jih pretvorili v SCAR markerje, ki imajo višjo aplikativno vrednost v smislu hitrosti in enostavnosti analize. Izdelane SCAR markerje smo preizkusili na velikem številu izolatov rodu *Verticillium* in nekaterih pogosteje zastopanih saprofitskih glivah. Pri tem sta markerja S-9-1EXE in S-9-1INT ohranila specifičnost samo za določanje patotipa PG2, medtem ko so bili ostali markerji manj specifični. Visoko specifične markerje smo nadalje uporabili pri razvitju multipleks in nested PCR analize, ki predstavljata pomembno dopolnilo obstoječim diagnostičnim tehnikam. Poleg omenjenega imajo izdelani SCAR markerji potencialno vrednost pri nadaljnjih genetskih analizah izolatov iz rodu *Verticillium*, predvsem v smislu proučevanja virulence.

ZAHVALA

Testiranje diagnostičnih markerjev so z darovanimi izolati omogočili dr. Dez. J. Barbara, dr. Richard Cooper, dr. Graeme Down, dr. Jan-Kees Goud, dr. Jane Robb, dr. Elisabeth Seigner in dr. Ewa Solarska, za kar se jim avtorja iskreno zahvaljujeva.

5 VIRI

1. Boyle, J.S., Lew, A.M., An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification.- Trends in Genetics, 11(1995)1, s. 8.
2. Kump, B., Javornik, B., Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) populations by RAPD markers.- Plant Science, 114(1996), s. 149-159.
3. Lee, S.B., Taylor, J.W., Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. V: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, D.H., White, J.J., Eds. T.J. (ur).- San Diego, Academic Press, (1990), s. 282-287.
4. Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Péres-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), s. 1-13.
5. 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), s. 1-11.
6. 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), s. 633-638.
7. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B., Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*).- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 77(2001)2, s. 139-146.
8. 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), s. 423-436.
9. Rozen, S., Skaletsky, H.J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. V: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Krawetz, S., Misener, S. (ur).- Totowa, Humana Press (2000), s. 365-386 (program dostopen na: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
10. Talboys, P.W., Resistance to vascular wilt fungi.- Proceedings of the Royal Society (London) 181(1972), s. 319-333.
11. Volossiuk, T., Robb, E.J., Nazar, R.N., Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms.- Applied and Environmental Microbiology, 11(1995), s. 3972-3976.
12. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, 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), s. 4407-4414.
13. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, K. Fingerprinting in Plants and Fungi.- London, CRC Press, Inc., (1995), s. 322.
14. 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), s. 63-70.