

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Taja JESENIČNIK

**IDENTIFIKACIJA IN DIFERENCIACIJA  
PATOGENIH GLIV RODU *Verticillium* Z UPORABO  
NOVIH ENOSTAVNIH IN MULTIPLEKS PCR  
OZNAČEVALCEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Taja JESENIČNIK

**IDENTIFIKACIJA IN DIFERENCIACIJA PATOGENIH GLIV RODU  
*Verticillium* Z UPORABO NOVIH ENOSTAVNIH IN MULTIPLEKS  
PCR OZNAČEVALCEV**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF PATHOGENIC  
FUNGI GENUS *Verticillium* WITH NEW SIMPLEX AND MULTIPLEX  
PCR MARKERS**

M. Sc. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Biotehnologija na Biotehniški fakulteti, na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 7.2.2014 sprejela temo in za mentorja imenovala doc. dr. Natašo Štajner, za somentorja prof. dr. Jerneja Jakšeta in za recenzenta dr. Sebastjana Radiška.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Mentorica: doc. dr. Nataša ŠTAJNER  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Somentor: prof. dr. Jernej JAKŠE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Recenzent: dr. Sebastjan RADIŠEK  
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Datum zagovora: 5.9.2014

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Taja Jeseničnik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 632.4.28:601.4:577.2 (043.2)  
KG *Verticillium*/identifikacija/označevalci/regija ITS/filogenetska analiza  
KK molekularna genetika/patogene glive/*Verticillium*/ molekularni markerji/PCR označevalci/identifikacija vrst  
AV JESENIČNIK Taja  
SA ŠTAJNER Nataša (mentor)/JAKŠE Jernej (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2014  
IN IDENTIFIKACIJA IN DIFERENCIACIJA PATOGENIH GLIV RODU *Verticillium* Z UPORABO NOVIH ENOSTAVNIH IN MULTIPLEKS PCR OZNAČEVALCEV  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
OP XIII, 60, [25] str., 16 pregl., 10 sl., 5 pril., 36 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Rod *Verticillium* predstavlja heterogeno skupino gliv, ki okužujejo kmetijsko pomembne kulture. Od leta 2011 obstaja nova taksonomska razvrstitev gliv iz rodu, po novem imenovan *Verticillium* sensu stricto, ki sestoji iz desetih vrst teh fitopatogenih gliv. Inderbitzin in sod. (2013) so razvili nove pare začetnih oligonukleotidov, ki v simplex in multiplex reakcijah PCR pomnožijo izbrane odseke DNA ali PCR označevalce, specifične za posamezno vrsto, ki omogočajo natančno identifikacijo vseh desetih vrst. V raziskavi smo preverili primernost in učinkovitost novih začetnih oligonukleotidov za identifikacijo izolatov gliv rodu *Verticillium*. V analizo smo vključili 118 izolatov iz zbirke škodljivih organizmov IHPS, z novimi začetnimi oligonukleotidi pa smo lahko identificirali 89 izolatov. Hkrati smo izvedli tudi analizo markerja SCAR6-2, ki pomnoži odsek DNA pri letalnem patotipu, ki okužuje hmelj in druge gostiteljske rastline. Marker smo pomnožili pri 42 izolatih. Z analizo zaporedja regije ITS, ki smo jo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4, pa smo identificirali izolate še z drugim pristopom, s čimer smo ovrednotili predhodno identifikacijo z novimi začetnimi oligonukleotidi. Na osnovi ITS regije smo naredili tudi filogenetske analizo posameznih vrst. Izdelali smo pregleden seznam za vse izolate rodu *Verticillium* sensu stricto iz zbirke škodljivih organizmov IHPS z informacijami o vrsti glede na novo taksonomsko razvrstitev in patotipu in potrdili primernost uporabe novih začetnih oligonukleotidov za molekularno identifikacijo in diagnostiko gliv rodu *Verticillium* sensu stricto.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 632.4.28:601.4:577.2 (043.2)  
CX Verticillium/identification/primers/ITS region/phylogenetic analysis  
CC molecular genetics/pathogenic fungi/Verticillium/molecular markers/PCR  
markers/species identification  
AU JESENIČNIK Taja  
AA ŠTAJNER Nataša (supervisor)/JAKŠE Jernej (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Biotechnology  
PY 2014  
TI IDENTIFICATION AND DIFERENTIATION OF PATHOGENIC FUNGI  
GENUS *Verticillium* WITH NEW SIMPLEX AND MULTIPLEX PCR  
MARKERS  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO XIII, 60, [25] p., 16 tab., 10 fig., 5 ann., 36 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Heterogeneous genus of fungi, named *Verticillium*, consists of species, which infect many agriculturally important plant crops. In 2011 a new taxonomic classification of the genus named *Verticillium* sensu stricto was established. The genus comprises of ten species of phytopathogenic fungi. Inderbitzin et al. (2013) developed new PCR primer pairs for simplex and multiplex PCR assays for amplification of PCR markers, specific for accurate identification of the species. In present study the suitability and effectiveness of the new PCR primers for fungi identification was tested. 118 isolates from collection of harmful organisms of IHPS were included in our analysis. With new PCR primers we were able to identify 89 isolates. At the same time we analyzed SCAR6-2 marker, which amplifies region characteristic only for the lethal pathotype isolates. This marker was amplified in 42 isolates. In the second part of the work, ITS region with ITS1 and ITS4 primers was amplified and based on their sequences the phylogenetic analysis was conducted. The aim was to identify isolates with another approach and to evaluate ITS identification with newly proposed PCR markers. We were able to create an informative list for all *Verticillium* sensu stricto isolates from collection of harmful organisms of IHPS, with the information about species regarding new taxonomy and the pathotype. We can confirm the suitability of the new PCR assays for molecular identification and diagnosis of the *Verticillium* sensu stricto fungi.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 ZNAČILNOSTI RODU <i>VERTICILLIUM</i>	3
2.1.1 Taksonomija rodu <i>Verticillium</i>	3
2.1.2 Gostiteljska specifičnost vrst iz rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto	5
2.1.3 Morfološke lastnosti	6
2.1.4 Življenjski cikel	8
2.1.5 Problematika verticilijskih okužb	9
2.2 MOLEKULARNE METODE ZA IDENTIFIKACIJO VRST IZ RODU <i>VERTICILLIUM</i> SENSU STRICTO	11
2.2.1 Novi PCR označevalci za identifikacijo in diferenciacijo vrst iz rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto	13
2.2.2 Vloga regije ITS v identifikaciji in taksonomski razvrstitvi gliv rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto	14
2.2.3 Uporaba markerjev SCAR za določanje patogenosti izolatov	16
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>17</b>
3.1 PRIDOBITEV DNA MATERIALA GLIV	17
3.1.1 Izolacija DNA iz micelija gliv	20
3.1.2 Merjenje koncentracije DNA in redčenje vzorcev	21
3.1.3 Preverjanje kakovosti DNA s pomnoževanjem regije ITS	21
3.2 REAKCIJE PCR Z UPORABO NOVIH PCR OZNAČEVALCEV ZA IDENTIFIKACIJO VRST RODU <i>VERTICILLIUM</i> SENSU STRICTO	22
3.2.1 Pridobitev in priprava novih oligonukleotidov	22
3.2.2 Priprava reakcijskih mešanic in temperaturni protokoli pomnoževanja	23
3.3 REAKCIJA PCR ZA DOLOČITEV PATOGENOSTI IZOLATOV	28

3.4 ANALIZA PRODUKTOV REAKCIJE PCR	29
3.4.1 Priprava vzorcev za agarozno elektroforezo	29
3.4.2 Priprava agaroznega gela in ločevanje produktov reakcij PCR	29
3.4.3 Sekvenciranje produktov reakcij PCR	30
3.5 OBDELAVA REZULTATOV	31
3.5.1 Obdelava in interpretacija slik elektroforetskih gelov	31
3.5.2 Obdelava nukleotidnih zaporedij regije ITS	32
3.5.3 Filogenetska analiza	32
3.5.4 Obdelava nukleotidnih zaporedij produktov simplex reakcij PCR z novimi začetnimi oligonukleotidi	33
<b>4 REZULTATI Z RAZPRAVO</b>	<b>34</b>
4.1 ANALIZA REGIJE ITS	34
4.2 ANALIZA PRODUKTOV PCR, POMNOŽENIH Z NOVIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI IN ANALIZA MARKERJEV SCAR	35
4.3 FILOGENETSKA ANALIZA REGIJE ITS	42
4.4 PRIMERJAVA ZAPOREDIJ PCR OZNAČEVALCEV ZNOTRAJ VRSTE	49
<b>5 SKLEPI</b>	<b>53</b>
<b>6 POVZETEK</b>	<b>55</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>57</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Taksonomska uvrstitev rodu <i>Verticillium</i> (CBS, 2014).....	4
Preglednica 2: Opredelitev gostiteljskih rastlin posameznih vrst rodu iz <i>Verticillium</i> sensu stricto (Inderbitzin in sod., 2011).....	6
Preglednica 3: Opredelitev parov začetnih oligonukleotidov za simplex in multiplex PCR teste, ki omogočajo identifikacijo posamezne vrste iz rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto (Inderbitzin in sod., 2013) .....	13
Preglednica 4: Seznam in podatki o izolatih, uporabljenih v poskusu identifikacije z novimi PCR označevalci za identifikacijo vrst <i>Verticillium</i> sensu stricto in v filogenetski analizi	17
Preglednica 5: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje regije ITS .....	22
Preglednica 6: Oznake, nukleotidna zaporedja, temperature prileganja novih začetnih oligonukleotidov ter vrsta <i>Verticillium</i> sensu stricto, ki jo par začetnih oligonukleotidov identificira.....	23
Preglednica 7: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje lokusov, ki identificirajo posamezno vrsto <i>Verticillium</i> sensu stricto .....	24
Preglednica 8: Temperaturni protokoli za simplex reakcije PCR .....	24
Preglednica 9: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za multiplex reakcijo PCR za identifikacijo linij <i>V. longisporum</i> .....	26
Preglednica 10: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za multiplex reakcijo PCR za razločitev vrst <i>V. albo-atrum</i> , <i>V. alfalfa</i> in <i>V. nonalfalfa</i> .....	26
Preglednica 11: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za gradientni PCR .....	27
Preglednica 12: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje markerjev SCAR .....	28
Preglednica 13: Sestavine za 1,3 % agarozni gel različnih velikosti .....	30

Preglednica 14: Novi podatki o vrsti izolata <i>Verticillium</i> sensu stricto, pridobljeni s tremi pristopi identifikacije, to je z novimi PCR začetnimi oligonukleotidi, s filogenetsko analizo in primerjavo zaporedja regije ITS s podatkovno zbirko NCBI .....	36
Preglednica 15: Seznam izolatov, izločenih iz analize z novimi začetnimi oligonukleotidi .....	38
Preglednica 16: Opredelitev izolatov, ki pripadajo posamezni skupini na filogenetskem drevesu in imajo enako nukleotidno zaporedje regije ITS .....	45

## KAZALO SLIK

Slika 1: Morfološke značilnosti gliv rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto, kot primer gliva <i>V. albo-atrum</i> . a - micelij glive po 10 dneh; b - micelij viden iz spodnje strani gojišča; c - konidiofori po 29 dneh; d - sekundarno razvejanje konidiofora; e - filaida po 29 dneh; f - konidijski po 29 dneh, vidno je klitje enega konidija (desno); g - trajni micelij po 33 dneh; h - agregirane hife trajnega micelija; i - mikrosklerocij po 47 dneh; j - povečava mikrosklerocija; k - mikrosklerocij znotraj rastlinske celice; l - hifa z rumenim pigmentom po 10 dneh (Inderbitzin in sod., 2011) .....	7
Slika 2: Bolezenski znaki okužbe z glivami rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto. A) nekroza, venenje lista paradižnika; B) nekroza v-oblike; C) kloroza listov rastline <i>Arabidopsis thaliana</i> ; D) razbarvanje prevodnega tkiva; E) tvorba mikrosklerocijev na nekrotičnem tkivu (Fradin in Thomma, 2006) .....	9
Slika 3: Pričakovani produkti PCR po multiplex PCR testu za identifikacijo in diferenciacijo vrste <i>V. dahliae</i> in treh linij <i>V. longisporum</i> . Vd – produkt PCR pri vrsti <i>V. dahliae</i> (trije sevi); D1 – <i>V. longisporum</i> linija A1/D1; D2 – <i>V. longisporum</i> linija A1/D2; D3 – <i>V. longisporum</i> linija A1/D3 (Inderbitzin in sod., 2013) .....	14
Slika 4: Agarozni geli; produkti PCR so nastali s pomnožitvijo regije ITS z začetnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4; A – gel s produkti PCR vzorcev od 1 do 96; B – manjši gel s produkti PCR vzorcev od 97 do 111; C – gel s produkti PCR novo izolirane DNA vzorcev od 112 do 118, kjer je bila regija ITS vzorca 114 pomnožena iz neredčene DNA; M1 – dolžinski standard 100 bp; M2 – dolžinski standard 1kbp .....	34
Slika 5: Poravnavo reprezentativnih zaporedij vrst iz rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto ter zaporedij vrste <i>V. nigrescens</i> , premeščene v druga rodova; številke ob imenu vrste nakazujejo na število zaporedij, ki so bila med sabo identična in predstavljajo posamezno skupino.....	44
Slika 6: Filogenetsko drevo, izdelano iz reprezentativnih zaporedij vseh med sabo različnih skupin zaporedij, ki predstavljajo različne vrste iz rodu <i>Verticillium</i> sensu stricto in vrste, razdeljene na podskupine; vključeni sta zaporedji dveh predstavnikov vrste <i>G. nigrescens</i> .....	45
Slika 7: Primerjava zaporedij regije ITS izolatov PapMB in CBS 123.176 z orodjem BLAST; zaporedje »Query« predstavlja izolat CBS 123.176; zaporedje »Sbjct« predstavlja izolat PapMB; podatki o primerjavi: Vrednost S 942, Vrednost E 0,0, Identičnost 526/534 (99%), Vrzeli 0/534.....	49

Slika 8: Prikaz identificiranih SNP znotraj vrste *V. albo-atrum*; oba SNP se nahajata na 621 bp dolgi regiji gena za aktin, ki je specifična za vrsto *V. albo-atrum*; A – prvi SNP G/A na poziciji 167 bp; B – drugi SNP T/G na poziciji 273 bp. .... 50

Slika 9: Prikaz identificiranih SNP znotraj vrste *V. isaacii*; šest SNP se nahaja znotraj 168 bp dolgi regiji gena za elongacijski faktor 1-alfa; A – prvi trije SNP; B – drugi trije SNP. 51

Slika 10: Prikaz identificiranih SNP znotraj vrste *V. dahliae*; SNP se nahaja na poziciji 433 v 461 bp dolgi regiji ITS, specifični za vrsto *V. dahliae*. .... 52

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Slike elektroforetskih gelov vseh simplex in multiplex reakcij PCR.

PRILOGA B: Slike elektroforetskih gelov reakcij PCR za pomnoževanje markerjev SCAR6-2, ki pomnožijo fragment AFLP pri izolatih letalnega patotipa.

PRILOGA C: Podatki o identifikaciji izolatov v podatkovni zbirkni NCBI; podani so rezultati z najvišjo vrednostjo S.

PRILOGA D: Slika filogenetskega drevesa, ki so ga na podlagi analize regije ITS 74 izolatov izdelali Inderbitzin in sod. (2011). Drevo je bilo izdelano z algoritmom »maximum parsimony«.

PRILOGA E: Slika filogenetskega drevesa, ki so ga na podlagi analize štirih lokusov (kodirajoči gen za aktin, elongacijski faktor 1-alfa, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza in triptofan sintaza) 77 izolatov izdelali Inderbitzin in sod. (2011). Drevo je bilo izdelano s pristopom Bayesian. »Clade« pomeni skupina.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
AFLP	polimorfizem dolžine pomnoženih restrikcijskih fragmentov, angl. Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAST	bioinformacijsko orodje za lokalno primerjavo nukleotidnih ali proteinskih zaporedij s podatkovno zbirkom, angl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
C	citozin
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ddH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
dNTP	deoksinukleotid
ddNTP	dideoksinukleotid
EDTA	etilen diamin tetraacetna kislina
G	gvanin
Grp I	skupina 1 znotraj vrste <i>V. albo-atrum</i>
Grp II	skupina 2 znotraj vrste <i>V. albo-atrum</i>
HCl	klorovodikova kislina
ITS	notranja prepisana regija, angl. Internal Transcribed Spacer
kbp	tisoč baznih parov
MgCl <sub>2</sub>	magnezijev klorid
NaCl	natrijev klorid
PCR	verižna reakcija s polimerazo, angl. Polymerase Chain Reaction
PG1	blagi patotip hmeljeve uvelosti
PG2	letalni patotip hmeljeve uvelosti
RAPD	tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA, angl. Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov, angl. Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA	ribonukleinska kislina, ribosomska RNA

SCAR	sekvenčno okarakterizirana pomnožena regija, angl. Sequenced Characterized Amplified Region
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov, angl. Single Nucleotide Polymorphism
T	timin
TBE	elektroforetski pufer iz Tris-HCl, borne kisline in EDTA
TdE	pufer iz Tris in EDTA
Tris	tris hidroksimetil amino metan

### OBRAZLOŽITEV POJMOV

Lokus	mesto na kromosomu, ki ga zaseda nek gen
Označevalec	s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pomnožen del DNA
Sekvenciranje	določanje zaporedja nukleotidov nekega dela DNA

## 1 UVOD

Rod *Verticillium* je ime za skupino askomicetnih gliv, ki so pomembni rastlinski patogeni, ki povzročajo bolezen verticilijska uvelost na številnih kmetijsko pomembnih kulturnah (Klosterman in sod., 2009). V Sloveniji trenutno največji problem predstavljajo vrste, ki okužujejo hmelj in so povzročiteljice hmeljeve uvelosti. To je bolezen vaskularnega sistema hmelja ter drugih gojenih rastlin in je gospodarsko ena od najpomembnejših bolezni hmelja (Dolinar in Simončič, 1999).

V taksonomski razvrstitvi gliv rodu *Verticillium* je od leta 2011 poznanih deset različnih vrst, najbolj razširjena pa je *V. dahliae*, ki je sposobna okužiti rastline iz štirinajst različnih rastlinskih družin. Vrste iz rodu, ki se od leta 2011 imenuje *Verticillium* sensu stricto in zajema zgolj rastlinske patogene, se med seboj ločijo glede na gostitelja in patogenost, pri čemer je identifikacija posameznih gliv na osnovi morfoloških lastnosti in patogenih testov izredno zahtevna (Inderbitzin in sod., 2013). Zaradi teh dejavnikov so detekcija, kvantifikacija ter identifikacija vrst *Verticillium* sensu stricto pomembna raziskovalna dejavnost številnih znanstvenih skupin. Za izvajanje nadzora ter za preprečitev izbruha letalne oblike verticilijske uvelosti je potrebno razviti ter testirati nove začetne oligonukleotide, ki v verižni reakciji s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR) pomnožijo PCR označevalce, specifične za posamezno vrsto *Verticillium* sensu stricto. Z novimi začetni oligonukleotidi bi lahko identificirali različne vrste in patotipe rodu *Verticillium* sensu stricto in hitro potrditi prisotnost določene vrste v nasadu ter nato vršiti ustrezne ukrepe za preprečitev bolezni rastlin. Inderbitzin in sod. (2013) so uporabili zaporedja deoksiribonukleinske kisline (DNA) vrst rodu *Verticillium* sensu stricto ter jih, glede na predhodne filogenetske in taksonomske študije (Inderbitzin in sod., 2011), uporabili za zasnovno testov PCR z novimi začetnimi oligonukleotidi za identifikacijo vrst *Verticillium* sensu stricto.

Po drugi strani pa številni znanstveniki poročajo o učinkovitosti filogenetskih študij notranje prepisane regije (angl. Internal Transcribed Spacer, ITS) za razvrstitev in identifikacijo vrst *Verticillium* (Henson in French, 1993; Nazar in sod., 1991; Bidochia in sod., 1999). Pomnožitev regije ITS, ki ji sledi sekvenciranje produkta PCR in primerjava zaporedij z bioinformacijskimi orodji, lahko vodi v razvoj specifičnih začetnih oligonukleotidov znotraj regije ITS, ki prav tako omogočajo identifikacijo vrst iz rodu *Verticillium* in ostalih gliv. Nazar in sod. (1991) so prav s tovrstno študijo postavili temelje identifikaciji gliv iz rodu *Verticillium* na molekularni ravni.

Tekom raziskave smo želeli testirati ter potrditi primernost uporabe novih začetnih oligonukleotidov, ki pomnožijo odsek DNA oziroma PCR označevalcev, specifičen za posamezno vrsto, za identifikacijo različnih vrst iz rodu *Verticillium* sensu stricto. Ob tem smo postavili hipotezo, da so novi PCR označevalci specifični za posamezno vrsto ter omogočajo identifikacijo izolatov na molekularni ravni. Prav tako bomo nove PCR označevalce uporabili za identifikacijo gliv *Verticillium*, pridobljenih iz zbirke škodljivih organizmov Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), pri čemer bomo ugotavliali, kateri sevi rodu *Verticillium* glede na novo taksonomsko razvrstitev so prisotni v Sloveniji in tujini. Zastavili smo hipotezo, da novi PCR označevalci omogočajo identifikacijo ter razlikovanje izolatov, shranjenih v zbirki škodljivih organizmov IHPS in da lahko na osnovi novih PCR označevalcev pridobimo novo filogenetsko razvrstitev izolatov rodu *Verticillium*, ki se pojavljajo v Sloveniji in tujini.

V drugem delu raziskave smo izvedli filogenetsko analizo regije ITS vseh izolatov, vključenih v analizo, z namenom preveriti in potrditi uporabnost in primernost tovrstne filogenetske analize za identifikacijo in razvrstitev gliv glede na novo taksonomsko razvrstitev rodu *Verticillium* sensu stricto. Preverili smo hipotezo, da s filogenetsko analizo regije ITS lahko identificiramo posamezne vrste rodu *Verticillium* sensu stricto na osnovi razlik v zaporedju regije ITS. Prav tako smo želeli primerjati oba pristopa identifikacije gliv ter ugotoviti, ali sta oba načina enako učinkovita in zanesljiva za natančno in nedvoumno identifikacijo izolatov. Ob tem smo predpostavili, da lahko z obema pristopoma identifikacije določimo, v katero vrsto spada posamezen izolat, glede na predhodne študije, z enako učinkovitostjo in zanesljivostjo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZNAČILNOSTI RODU *Verticillium*

Rod *Verticillium* predstavlja skupino askomicetnih gliv, katere predstavniki so pomembni rastlinski patogeni, ki povzročajo bolezen prevodnega sistema rastlin, imenovano verticilijska uvelost (Klosterman in sod., 2009). Gre za eno izmed hujših bolezni rastlin, saj lahko prizadene številne kmetijsko pomembne vrste rastlin (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Rod *Verticillium* je po drugi strani zelo heterogena skupina gliv, ki lahko parazitirajo tudi žuželke, ogorčice ter druge glice (Radišek in Javornik, 2011).

#### 2.1.1 Taksonomija rodu *Verticillium*

Rod *Verticillium* velja za enega najstarejših rodov nitastih gliv. Leta 1816 je nemški mikolog Nees von Esenbeck prvi opisal rod, ko je opisal vrsto *Verticillium tenerum* (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Ime je izpeljal iz latinske besede *verticillus* ali vretence ter s tem nakazal na značilne vretenaste konidiofore gliv (Radišek in Javornik, 2011).

Leta 1879 sta Reinke in Berthold opisala prvo vrsto iz rodu *Verticillium*, ki okužuje rastline, *Verticillium albo-atrum* (*V. albo-atrum*), izolirano iz okužene rastline krompirja v Nemčiji. Leta 1913 je Klebahn opisal drugo, morfološko različno glivo, izolirano iz okužene rastline dalije, ter jo poimenoval *Verticillium dahliae* (*V. dahliae*) (Klosterman in sod., 2009). Skoraj pol stoletja je trajala razprava, ali gre za dve ločeni vrsti, ali pa je vrsta, izolirana iz dalije, podvrsta *V. albo-atrum*. Obsežnejša raziskava, objavljena leta 1949, je jasno ločila obe vrsti na osnovi morfoloških, fizioloških in patoloških značilnosti (Radišek in Javornik, 2011).

Taksonomska proučevanja so pokazala, da rod *Verticillium* predstavlja izrazito heterogeno skupino nespolnih gliv, saj je bilo tekom let v rod vključenih okoli 190 vrst, ki okužujejo rastline ter tudi druge glice in živali (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Pri večini vrst ni bilo odkritih spolnih oblik, zato je bil rod uvrščen v ne-filogenetsko skupino Deuteromycota, razred Hyphomycetes, red Hyphomycetales in družino Moniliaceae. Zaradi izrazite heterogenosti vrst pa je bila skupina nadaljnje morfološko razdeljena na 4 sekcije. Sekcija Nigrescentia vključuje vrste s temnimi trajnimi organi, kamor je bilo uvrščenih šest fitopatogenih vrst, *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *Verticillium tricorpus* (*V. tricorpus*), *Verticillium nigrescens* (*V. nigrescens*), *Verticillium nubilum* (*V. nubilum*) in *Verticillium theobromae* (*V. theobromae*). Molekularne tehnike so kasneje omogočile revizijo taksonomije gliv in na podlagi molekularnih analiz je nastala nova klasifikacija gliv (Preglednica 1). Rod *Verticillium* je uvrščen v družino Plectosphaerellaceae, podrazred Hypocreomycetidae, razred Sordariomycetes, poddebelo Pezizomycotina ter deblo Ascomycota (CBS, 2014).

Preglednica 1: Taksonomska uvrstitev rodu *Verticillium* (CBS, 2014)

Taksonomski niz	Ime
<b>Domena</b>	Eukarya
<b>Kraljestvo</b>	Fungi
<b>Deblo</b>	Ascomycota
<b>Poddeblo</b>	Pezizomycotina
<b>Razred</b>	Sordariomycetes
<b>Podrazred</b>	Hypocreomycetidae
<b>Red</b>	Hypocreales
<b>Družina</b>	Plectosphaerellaceae
<b>Rod</b>	<i>Verticillium</i>

#### 2.1.1.1 Novo opredeljeni rod *Verticillium* sensu stricto

Leta 2011 so Inderbitzin in sod. predstavili novo filogenetsko razdelitev gliv iz rodu *Verticillium*, ki okužujejo rastline ter rod poimenovali *Verticillium* sensu stricto. Vrste gliv, ki so bližje vrsti *V. dahliae*, sedaj spadajo v rod *Verticillium* sensu stricto. Manj sorodne gliche iz rodu so bile premeščene v druge rodove. Med rastlinskimi patogeni, prej uvrščenimi v rod *Verticillium*, sta bili, na podlagi filogenetske analize regije ITS, zaporedja velike podenote ribosomske DNA in gena za elongacijski faktor 1-alfa, v drug rod premeščeni vrsti *V. theobromae*, sedaj *Musicillium theobromae*, ter *V. nigrescens*, sedaj *Gibellulopsis nigrescens* (Zare in sod., 2007; Inderbitzin in Subbarao, 2014). Z izvedbo filogenetskih analiz na petih različnih lokusih, ki so regija ITS, kodirajoči gen za aktin (ACT), elongacijski faktor 1-alfa (EF), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GPD) in triptofan sintaza (TS), preučevanjem morfologije, analizami herbarijev 74 izolatov rodu *Verticillium* ter študijo obstoječe literature so Inderbitzin in sod. (2011) določili taksonomijo gliv rodu *Verticillium* sensu stricto, ki sedaj sestoji iz desetih vrst, od katerih je pet vrst na novo določenih in do tedaj še ne poznanih znanosti. Te vrste so: *V. albo-atrum*, *Verticillium alfalfae* (*V. alfalfaef*), *V. dahliae*, *Verticillium isaacii* (*V. isaacii*), *Verticillium klebahnii* (*V. klebahnii*), *Verticillium longisporum* (*V. longisporum*), *Verticillium nonalfalfaef* (*V. nonalfalfaef*), *V. nubilum*, *V. tricorpus* in *Verticillium zaregamsianum* (*V. zaregamsianum*) (Inderbitzin in sod., 2011).

Nadaljnje filogenetske analize so razdelile gliche rodu *Verticillium* sensu stricto v dve skupini, glede na prisotnost ali odsotnost rumene pigmentacije hif. Vrste *V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, *V. isaacii*, *V. klebahnii* ter *V. zaregamsianum* tvorijo hife, ki vsebujejo rumeni pigment in so uvrščene v skupino Flavexudans, medtem, ko so ostale vrste, ki ne tvorijo rumeno obarvanih hif, uvrščene v skupino Flavonexudans (Inderbitzin in Subbarao, 2014).

Vrsti *V. alalfae* in *V. nonalalfae* sta morfološko nerazločljivi, prav tako sta bili zaradi morfoloških lastnosti ter značilne tvorbe trajnega micelija pogosto zamenjani ali napačno identificirani kot *V. albo-atrum*, ki je daljni sorodnik obeh vrst. Predhodne filogenetske analize regije ITS več sevov, ki so bili glede na morfologijo identificirani kot *V. albo-atrum*, so znotraj vrste *V. albo-atrum* odkrile razdelitev na dve skupini, Grp I in Grp II (Robb in sod., 1993). Skupina Grp I se naprej deli na dve podskupini, od katerih je ena patogena za lucerno, druga pa je skupina gliv, ki so patogene za vse druge gostitelje. Skupina Grp II pa je skupina sevov *V. albo-atrum*, ki so povezane z vrsto *V. tricorpus* (Klosterman in sod., 2009). Novejše molekularne in filogenetske analize na petih lokusih so omogočile diferenciacijo ter razdelitev sevov v tri različne vrste. Po novi razvrstitvi samo skupina Grp II predstavlja vrsto *V. albo-atrum*, druga skupina pa je razdeljena v dve novi vrsti, *V. alalfae* in *V. nonalalfae*. Kljub enakim morfološkim lastnostim, se vrsti *V. alalfae* in *V. nonalalfae* razlikujeta na nivoju DNA v posameznih zamenjavah oziroma polimorfizmih nukleotidov (SNP) v štirih preiskovanih lokusih ter gostiteljskih rastlinah, ki jih okužujeta. *V. nonalalfae* povzroča uvelost na številnih različnih rastlinah, okužbe z *V. alalfae* pa so omejene na lucerno (Inderbitzin in sod., 2011).

Vrsta *V. longisporum* je diploidni hibrid, ki je nastala s hibridizacijami različnih vrst rodu *Verticillium*. Starševske vrste so *V. dahliae*, liniji D2 in D3, ter dve neznani vrsti, ki še nista bili najdeni, razen kot starša *V. longisporum*, imenovani Vrsta A1 ter Vrsta D1. Tri linije *V. longisporum* so nastale z neodvisnimi hibridizacijami Vrste A1 z Vrsto D1, nastala je linija *V. longisporum* A1/D1, Vrste A1 z *V. dahliae* linija D2, nastala je linija *V. longisporum* A1/D2, ter Vrste A1 z *V. dahliae* linija D3, pri čemer je nastala linija *V. longisporum* A1/D3 (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Značilna za linije *V. longisporum* je prisotnost podaljšanih mikrosklerocijev ter konidijev ter zmanjšano število filaid na konidioforih, kar je lahko eden izmed načinov, kako razločiti *V. dahliae* ter *V. longisporum*. Vendar zaradi spremenljivosti teh značilnosti kriterij velikosti mikrosklerocijev ter konidijev ni povsem zanesljiv (Inderbitzin in sod., 2011).

### 2.1.2 Gostiteljska specifičnost vrst iz rodu *Verticillium* sensu stricto

Predstavniki rodu *Verticillium* sensu stricto okužujejo mnogo različnih rastlin iz različnih rodov in lahko povzročajo obsežne izgube pridelka. Vrste skupaj okužujejo več kot 400 rastlinskih vrst iz 80 rodov, predvsem dvokaličnice. Ekonomsko pomembnejši rastlinski gostitelji gliv med kmetijskimi ter okrasnimi vrstami so krompir, solata, paprika, bombaž, hmelj, oljka, okrasno drevje ter nekatere sadne rastline (Radišek in Javornik, 2011). Največ škode povzroča vrsta *V. dahliae*, ki je sposobna okužiti rastline iz 14 rastlinskih družin. Ostale vrste imajo ožji gostiteljski razpon, *V. albo-atrum* večinoma okužuje rastline krompirja, za vrsto *V. alalfae* je značilno, da okužuje zgolj lucerno.

V Sloveniji problem predstavlja predvsem vrsta *V. nonalfalfa*, ki med drugim okužuje tudi hmelj, ki je med pomembnejšimi kmetijskimi kulturami v Sloveniji.

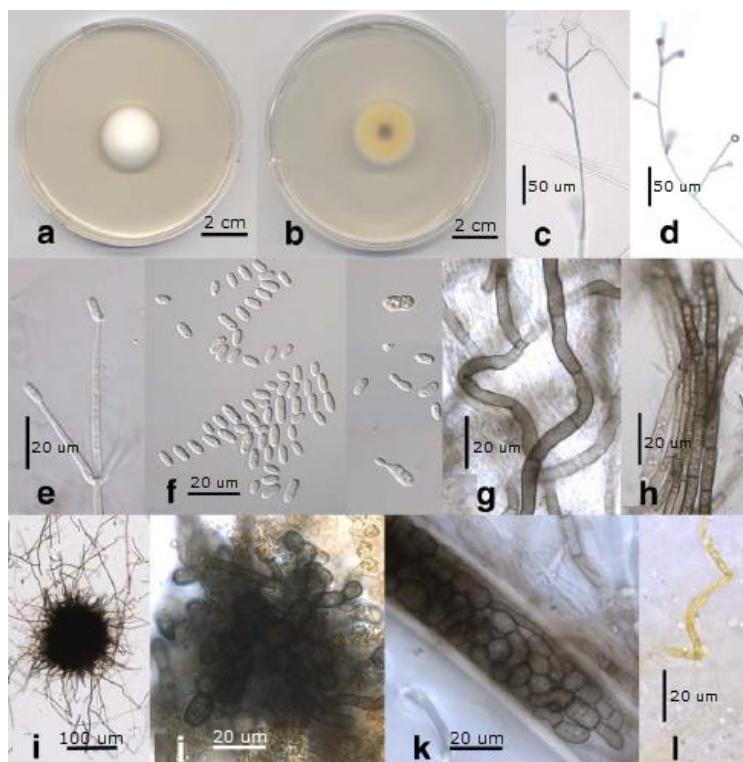
Preglednica 2: Opredelitev gostiteljskih rastlin posameznih vrst rodu iz *Verticillium* sensu stricto (Inderbitzin in sod., 2011)

<b>Vrsta</b>	<b>Gostitelji</b>
<i>V. albo-atrum</i>	krompir, zemlja krompirjevih polj
<i>V. alfalfa</i>	lucerna
<i>V. dahliae</i>	Rastlinske družine: Aceraceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Araliaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Linaceae, Malvaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae
<i>V. isaacii</i>	paradižnik, artičoka, solata, špinača, zemlja
<i>V. klebahnii</i>	solata
<i>V. longisporum</i>	oljna ogrščica, zelje, cvetača, hren, redkev, sladkorna pesa, divja redkev
<i>V. nonalfalfa</i>	hmelj, krompir, špinača, petunija
<i>V. nubilum</i>	kompost gojenih gob, krompir, zemlja
<i>V. tricorpus</i>	paradižnik, krompir, nagelj
<i>V. zaregamsianum</i>	solata

### 2.1.3 Morfološke lastnosti

Vrste rodu *Verticillium* sensu stricto so talne glive, ki okužujejo rastline v hladnih in zmernih klimatskih regijah, prav tako pa se lahko pojavljajo v subtropskih ter tropskih regijah (Pegg in Brady, 2002). Glive lahko v tleh preživijo več let zaradi tvorbe različnih dormantnih struktur (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Predstavniki rodu tvorijo bel puhat micelij, ki je sestavljen iz hialinih, to je steklasto obarvanih hif. Hife so večinoma haploidne, celice, ki tvorijo hife, pa so večinoma enojedrne. Na hifah nastajajo vretenasti konidiofori iz več vretenc, iz katerih krožno okoli septe poganjajo filaide. Na koncu filaid se tvorijo sluzaste sferične glavice, v katerih se nahajajo skupki konidijev oziroma trosov. Pri vrsti *V. albo-atrum* pogosto prihaja do sekundarnega razvejanja konidioforov, ki so temno obarvani oziroma melanizirani pri bazi razvejanja. Sekundarno razvejanje je značilno samo za to vrsto. Konidiji ali trosi so večinoma enocelični, elipsoidne oblike in manjši pri vrsti *V. dahliae* (Smith, 1965; Pegg in Brady, 2002; Radišek, 2004). Morfološke značilnosti gliv so prikazane na sliki 1.

Za vrste *V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, *V. isaacii*, *V. klebahnii* in *V. zaregamsianum* je značilna tvorba rumeno obarvanih hif (Slika 1, L). Gre za tvorbo rumenega pigmenta, ki se v obliki kroglic nahaja znotraj hif, občasno pa se lahko nahaja v obliki kristalov zunaj celic. Pri ostalih vrstah tvorba rumenega pigmenta ni prisotna (Inderbitzin in sod., 2011).



Slika 1: Morfološke značilnosti gliv rodu *Verticillium* sensu stricto, kot primer gliva *V. albo-atrum*. a - micelij glive po 10 dneh; b - micelij viden iz spodnje strani gojišča; c - konidiofori po 29 dneh; d - sekundarno razvejanje konidiofora; e - filaida po 29 dneh; f - konidiji po 29 dneh, vidno je klitje enega konidia (desno); g - trajni micelij po 33 dneh; h - agregirane hife trajnega micelija; i - mikrosklerocij po 47 dneh; j - povečava mikrosklerocija; k - mikrosklerocij znotraj rastlinske celice; l - hifa z rumenim pigmentom po 10 dneh (Inderbitzin in sod., 2011)

#### 2.1.3.1 Trajne strukture

Predstavniki rodu *Verticillium* sensu stricto tvorijo tri tipe trajnih struktur, ki jim omogočajo preživetje neugodnih razmer v tleh (Inderbitzin in sod., 2011). Trajni micelij je temno rjav do črn micelij, ki nastane z diferenciacijo hif v melanizirane strukture z debelo celično steno ter z združevanjem teh hif v micelije. Prvič je bil opisan pri glivi *V. albo-atrum*. Mikrosklerocij je skupek melaniziranih celic z debelo celično steno, ki nastanejo z nabrekanjem ter ločevanjem hif od starševskega micelija do posameznih celic (Pegg in Brady, 2001). Za vrsto *V. albo-atrum* je značilen nekoliko drugačen mikrosklerocij, gre za gosto prepletene melanizirane hife, v skupku pa so prisotne okrogle ali podaljšane posamezne celice. Klamidospore pa so povečane vegetativne spore z odebeleno celično steno, temne barve, ki se tvorijo znotraj ali na koncu hif. Na hifah so lahko prisotne posamezne klamidospore ali pa je v verigah nanizanih več struktur. Tvorba klamidospor je značilna na vrste *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. tricorpus* ter *V. nubilum*, ki tvori samo to obliko trajnih struktur, medtem, ko ostale vrste lahko tvorijo še trajni micelij ali mikrosklerocij (Inderbitzin in sod., 2011; Lin in Hetiman, 2005).

## 2.1.4 Življenjski cikel

Razvojni krog gliv rodu *Verticillium* sensu stricto je sestavljen iz več faz, dormantne, parazitske ter saprofitske (Fradin in Thomma, 2006). Med dormantno fazo, trajne strukture v tleh glivam omogočajo, da prezimijo in ob pojavu ugodnih pogojev začnejo nov življenjski krog. Takrat pride do vzklitra trajnih struktur, infekcije ter kolonizacije gostiteljskih rastlin ter do tvorbe novih trajnih struktur, s katerimi bodo glive preživele do naslednje sezone. V tleh glive prezimijo na in v odmrlih rastlinah v obliki trajnega micelija, mikrosklerocija ali klamidospor, kjer preživijo tudi do nekaj let, od vseh oblik pa mikrosklerocij obstane tudi do 13 let (Pegg in Brady, 2002).

Klitje trajnih struktur se prične, ko so v tleh prisotni rastlinski koreninski izločki. Fenomen izločanja je prisoten pri vseh višje razvitih rastlinah. V izločkih se nahajajo večje količine ogljikovih in dušikovih spojin, ki stimulirajo razvoj ter rast hif iz trajnih struktur (Pegg in Brady, 2002; Fradin in Thomma, 2006). Do infekcije pride, če je korenina v neposredni bližini glive (Sewell, 1959, cit. po Pegg in Brady, 2002). Zaradi abrazivne narave tal ter organizmov, ki poškodujejo korenine ter koreninske laske, nastane mnogo točk, kjer lahko pride do infekcije z glivo. Okužba se zgodi na mlajših koreninskih delih ali poškodovanih delih, kjer penetracijska hifa, ki najverjetneje potuje v smeri gradienca hrani (Fradin in Thomma, 2006), prodre v korenino. Do penetracije in vzpostavitve infekcije pride v štirih dneh (Pegg in Brady, 2002). Z infekcijo gostiteljske rastline gliva vstopi v parazitko fazo.

Infekciji sledi kolonizacija prevodnega sistema. Gliva mora prečkati endodermis, da doseže prevodni sistem. Prečka ga v mlajših koreninskih delih, kjer ta še ni dobro razvit, ali pa na poškodovanih delih. Iz hif poganjajo konidiofori, na katerih se tvorijo filaide s konidiji. Konidiji s transpiracijskim tokom potujejo po rastlini navzgor in se ujamejo v predelih nepopolne perforacije žil. Tam ujeti konidiji vzklijejo ter tvorijo nov micelij (Fradin in Thomma, 2006).

Ponovna tvorba trajnih organov se začne, ko rastlina propade ter gliva kolonizira ostala tkiva. V saprofitski fazi gliva poleg prevodnega sistema kolonizira tudi korenine ter poganjke. Gliva namreč, kljub temu, da je prevodni sistem s hranili dokaj revno okolje, okoliških tkiv ne kolonizira, dokler del rastline ali cela rastlina ne propade (Fradin in Thomma, 2006; Radišek, 2004).

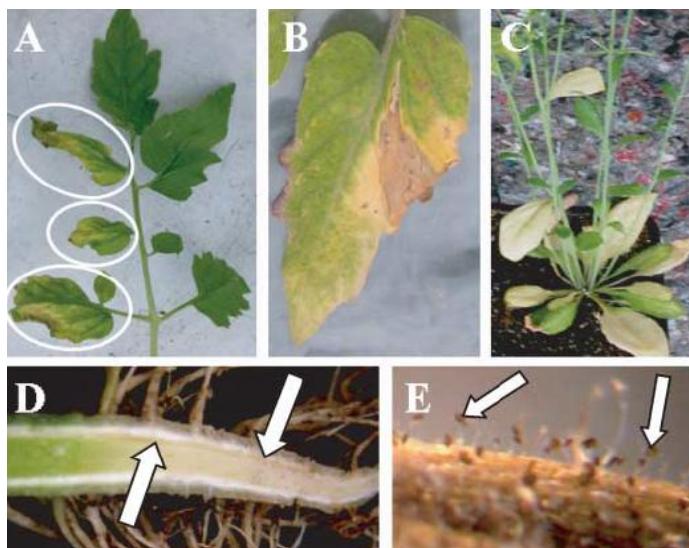
Hife izločajo številne hidrolitične encime, ki razgrajujejo celične stene in so ključni za patogenost gliv. Pektinolitični encimi omogočajo prehod hif preko membran, obdanih s pektinom (Fradin in Thomma, 2006). S tem omogočajo penetracijo micelija v nove žile. Intenzivna kolonizacija namreč korelira z aktivnostjo pektinaz ter glukanaz (Pegg in Vesey, 1973, cit. po Pegg in Brady, 2002), prav tako pa je od količine encimov odvisna stopnja virulence posameznih vrst gliv (Fradin in Thomma, 2006).

## 2.1.5 Problematika verticilijskih okužb

Verticilijska uvelost je bolezen prevodnega sistema rastlin, ki jo povzročajo glive rodu *Verticillium* sensu stricto. Različne vrste gliv okužujejo različne rastline, med njimi mnogo gospodarsko pomembnih rastlih, zaradi česar predstavljajo verticilijske okužbe gospodarski problem ter povzročajo ekonomske izgube po celiem svetu (Fradin in Thomma, 2006). Izgube pridelka zaradi pojava okužb se gibljejo med 10 in 50 % (Pegg in Brady, 2002).

### 2.1.5.1 Bolezenski znaki

Okužbe na različnih rastlinskih vrstah, ki so gostitelji različnih vrst gliv, se kažejo z različnimi bolezenskimi znaki, zato ne moremo določiti enotnih simptomov, ki bi bili značilni za verticilijsko uvelost vseh rastlin (Fradin in Thomma, 2006). Običajno se okužba kaže z venenjem rastlin, ki se začne v spodnjem delu rastline, okužene rastline nazadujejo v rasti, pojavljajo se kloroze in nekroze tkiv listov, ki odpadajo, nekrotične spremembe se pojavijo tudi v prevajalnih tkivih (Pegg in Brady, 2002). Na listih lahko opazimo okužbe na polovici lista rastline, po navadi gre za starejše liste. Pri nekaterih rastlinskih vrstah spodnji listi postanejo rumeni od roba proti sredini zaradi odmiranja celic na konicah in robovih lista. Sčasoma uveni cel list. V nekaterih primerih pa se lahko na listu pojavijo rumene pege, ki nato postanejo nekrotične ter temnejše barve. Poganjki ter mlade korenine lahko postanejo rjavkaste barve, saj pride do razbarvanja prevodnih tkiv (Slika 2) (Fradin in Thomma, 2006).



Slika 2: Bolezenski znaki okužbe z glivami rodu *Verticillium* sensu stricto. A) nekroza, venenje lista paradižnika; B) nekroza v-oblike; C) kloriza listov rastline *Arabidopsis thaliana*; D) razbarvanje prevodnega tkiva; E) tvorba mikrosklerocijev na nekrotičnem tkivu (Fradin in Thomma, 2006).

Ob okužbi se v rastlinah dogajajo različne obrambne reakcije, ki jih prav tako lahko štejemo med bolezenske znake. Zaradi prisotnosti penetracijskih hif se v aktivnih epidermalnih celicah tvorijo lignin ter podobne snovi, ki oblikujejo ligninske gomoljčke, ki utrdijo celične stene. V takih celicah hifa propade ali pa se njena rast upočasni. Ob vdoru micelija v prevodno tkivo je opazna tvorba gelov iz pektinskih ter hemiceluloznih snovi, ki na zgornjem delu žilnih lamel preprečujejo nadaljnje prodiranje hif po prevodnem sistemu. Dodatno zaprtje žil povzročijo še sosednje parenhimske celice s tvorbo izrastkov v lumen žile, imenovanih tile. Oba mehanizma povzročita blokado žil, ki lahko ustavi ali omeji napredovanje bolezni. V rastlinah se inducirajo tudi biokemijske reakcije, kot so povečana produkcija fitoaleksinov (toksini), produkcija inhibitorjev fitotoksinov, ki jih sintetizirajo rastline, produkcija hormonov ter fenolnih substanc. Prisotnost spojin vpliva neposredno na glive, ali pa na hidrolitične encime, ki jih izločajo glive. Posledice reakcij lahko opazimo kot rjavenje prevodnega tkiva (Radišek, 2004).

#### 2.1.5.2 Hmeljeva uvelost

Hmeljeva uvelost je verticilijska bolezen hmelja, ena izmed gospodarsko najpomembnejših bolezni hmelja. Z ozirom na novo razvrstitev gliv v deset vrst (Inderbitzin in sod., 2011, 2013) sta glavna povzročitelja bolezni vrsti *V. dahliae* ter *V. nonalfafae*. V Sloveniji sta prisotni tako blaga kot letalna oblika bolezni, slednja je bila v Sloveniji prvič ugotovljena leta 1997 na območju Gomilskega (Dolinar in Simončič, 1999). Bolezen je nevarna, ker je težko obvladljiva, za obvladovanje bolezni še vedno ni na voljo učinkovitih fitofarmacevtskih sredstev, povzročiteljici pa se v tleh lahko ohranita več let ter hitro širita v nasadih ter izven njih (Radišek in sod., 2006b). Problem predstavljajo tudi pogoste reinfekcije nasadov, ki tudi v Sloveniji omejujejo predelavo hmelja ter povzročajo s tem povezane ekonomske izgube v slovenskem gospodarstvu (Posebni nadzor ..., 2009).

Pri blagi in letalni obliki so prisotni nekateri splošni bolezenski znaki, kot so rumenenje ter venenje listov, najprej na spodnjem delu rastlin. Na okuženih listih se pojavi porjavelo tkivo, predvsem na robovih ter med žilami. Značilno za hmeljevo uvelost je, da se listi obrnejo navzgor ter ob dotiku odpadejo. Ob prerezu trte lahko opazimo rjavo nekrotično prevajalno tkivo (Radišek, 2004). Bistvena razlika med obema oblikama je odmiranje celotne rastline pri letalni obliku, medtem, ko si rastline, okužene z blago obliko, opomorejo ter naslednje leto rastejo naprej (Dolinar in Simončič, 1999).

Blaga oblika hmeljeve uvelosti naj bi se domnevno v Sloveniji prvič pojavila leta 1955, v večjem obsegu pa je bila ugotovljena leta 1974 (Dolinar in Simončič, 1999). Znaki okužbe se razvijejo pri okužbah z manj virulentnimi patotipi glive *V. dahliae* in *V. nonalfalfa*e ali pri okužbah odpornih sort z bolj virulentnimi patotipi *V. nonalfalfa*e. Znamenja bolezni so sprva rumenenje primarnih listov od tal navzgor. Nato se pojavijo nekroze na robovih listov in med žilami. Robovi listov se obrnejo navzgor in ob dotiku odpadejo. Bolezensko znamenje, značilno samo za blago obliko, je odebelitev trt od tal navzgor, kar je obrambna reakcija rastline. Skorja začne pokati in postane hrapava. Ob prerezu je opazno nekrotično prevajalno tkivo. Naslednje leto rastlina, okužena z blago obliko, normalno odganja ter raste naprej (Dolinar in Simončič, 1999).

Letalna oblika pa se je v Sloveniji prvič pojavila leta 1997. Pojavi se pri okužbah občutljivih kultivarjev hmelja z bolj virulentnimi patotipi glive *V. nonalfalfa*e (Radišek, 2004). Okužba hitro napreduje, v dveh do treh tednih prizadene tudi stranske poganjke, kar povzroči sušenje rastline in odpadanje listov (Radišek in sod., 2006b). Znamenja bolezni zajemajo rumenenje in venenje listov, pojav nekroz, vihanje robov listov navzgor ter odpadanje listov ob dotiku, nekrozo celotnega prevajalnega tkiva. V naslednji stopnji odpadejo vsi listi, rastlina se posuši ter propade. Proces se zgodi pri vseh rastlinah v nasadu (Dolinar in Simončič, 1999).

## 2.2 MOLEKULARNE METODE ZA IDENTIFIKACIJO VRST IZ RODU *Verticillium* sensu stricto

Prva poročila o aplikaciji orodij molekularne genetike za študije rodu *Verticillium* so bila predstavljena leta 1990 na Petem mednarodnem simpoziju o rodu *Verticillium* (Pegg in Brady, 2002). Med pomembnejšimi aplikacijami molekularnih metod je potrebno izpostaviti raziskavo Nazarja in sod. (1991), ki so na podlagi polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov (RFLP) določili razmerja ter homologije med različnimi sevi iz rodu ter na podlagi zaporedij regije ITS izdelali začetne oligonukleotide, ki so razlikovali med vrstama *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Tudi Robb in sod. (1993) so na podlagi razlik nukleotidnega zaporedja regije ITS gena za ribosomske ribonukleinsko kislino (rRNK) razvili specifične začetne oligonukleotide, ki so omogočili določitev vrst *V. albo-atrum* ter *V. dahliae*. Kening in sod. (1949, cit. po Pegg in Brady, 2002) pa so razvili par začetnih oligonukleotidov, ki pomnoži odsek mitohondrijske DNA, ki je ohranjena pri sevih rodu *Verticillium*.

Novejše raziskave rastlinskih patogenov z orodji molekularne genetike pa večinoma temeljijo na pomnoževanju določenega odseka DNA v reakciji PCR ter aplikaciji bioinformacijskih orodij za študije odnosov med rodovi in vrstami znotraj rodu. Usmerjene so predvsem v proučevanje različnih podskupin posameznih vrst rodu *Verticillium* v povezavi s patogenostjo podskupin ali različnimi gostiteljskimi patotipi, ki jih kolonizirajo podskupine. Na ta način so molekularne metode omogočile določitev vrst *V. albo-atrum* in *V. dahliae* ter razvoj hitrih metod za identifikacijo in diagnostiko verticilijskih okužb (Maruthachalam in sod., 2010; Radišek in sod., 2004, 2006; Inderbitzin in sod., 2013).

Med orodji molekularne genetike je verižna reakcija s polimerazo ali metoda PCR ena izmed najpomembnejših in nujno potrebnih metod, ker je relativno enostavno in poceni laboratorijsko orodje, ki omogoča »izolacijo« in pomnožitev specifičnega dela DNA *in vitro*. PCR uporablja v laboratorijih za diagnostiko bolezni, identifikacijo bakterij, virusov, gliv, v forenzičnih laboratorijih ter v številnih drugih aplikacijah (Polymerase ... 2013; PCR, 2014).

Pri metodi PCR gre za sintezo specifičnega zaporedja DNA (Mullis in sod., 1986). Metodo je v 1980-ih razvil ameriški biokemik Kary Mullis, ki je za svoje delo leta 1993 prejel Nobelovo nagrado za kemijo. Razvoj ter množično uporabo metode je omogočila izolacija termostabilnega encima polimeraza DNA (Taq) iz bakterije *Thermus aquaticus* ter ekspresija encima v bakteriji *Escherichia coli* (Lawyer in sod., 1989).

Številni znanstveniki poročajo o uporabnosti ter nepogrešljivosti metode PCR v molekularnih analizah in detekciji rastlinskih patogenov (Mullis in sod., 1986; Nazar in sod., 1991; Robb in sod., 1993; Kageyama in sod., 2003; Kuchta in sod., 2008; Platt in Mahuku, 2000). Reakcija temelji na uporabi dveh začetnih oligonukleotidov, ki se hibridizirata na komplementarno mesto na obeh enojnih verigah DNA po denaturaciji, ter encima polimeraza DNA, ki katalizira reakcijo dodajanja komplementarnih nukleotidov enojni verigi DNA, ki je v reakciji matrica za sintezo DNA (Innis in sod., cit. po Pokorn, 2011; Henson in French, 1993). Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v metodi PCR, lahko specifično označijo oziroma se hibridizirajo na DNA pri samo eni vrsti znotraj rodu organizmov, lahko so izdelani v ohranjeni regiji, ki je prisotna pri vseh vrstah nekega rodu, lahko pa celo ločujejo med posameznimi podtipi organizmov znotraj vrste. Izdelava začetnih oligonukleotidov temelji na identifikaciji specifičnih karakteristik v zaporedju DNA, ki omogočajo razločevanje enega organizma, vrste ali rodu od drugega (Mullis in sod., 1986). Ob uporabi ustreznih začetnih oligonukleotidov je identifikacija z metodo PCR hitra, učinkovita, zanesljiva ter ponovljiva in omogoča identifikacijo patogenega organizma v dveh dneh (Platt in Mahuku, 2000).

### **2.2.1 Novi PCR označevalci za identifikacijo in diferenciacijo vrst iz rodu *Verticillium* sensu stricto**

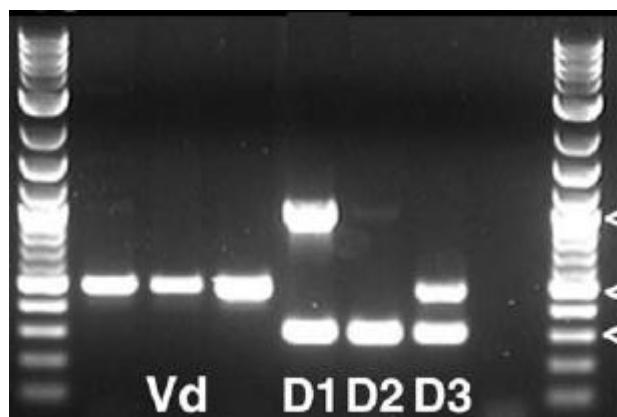
Uspešna kontrola rastlinskih patogenov in obvladovanje okužb ni mogoče brez natančne in zanesljive identifikacije prisotnega patogena (Inderbitzin in sod., 2013). že od leta 1990 poteka intenzivni razvoj metod za identifikacijo ter diferenciacijo vrst gliv iz rodu *Verticillium*, ki veljajo za težavne, če jih želimo identificirati samo na podlagi morfoloških značilnosti (Mullis in sod., 1986; Nazar in sod., 1991; Robb in sod., 1993; Pegg in Brady, 2002). Leta 2011 je bila postavljena nova taksonomska razvrstitev gliv iz rodu *Verticillium*, ki po novem sestoji iz desetih vrst. Gre za vrste, patogene za rastline, ki so uvrščene v rod, po novem imenovan *Verticillium* sensu stricto (Inderbitzin in sod., 2011, 2013). Z ozirom na novo taksonomsko razvrstitev so Inderbitzin in sod. (2013) razvili enajst enostavnih (simplex PCR) testov PCR ter štiri multipleks teste PCR hkratnega pomnoževanja (multiplex PCR) za identifikacijo in diferenciacijo vseh desetih vrst ter treh linij vrste *V. longisporum*.

Identifikacijo omogoča osemajst novo razvitih začetnih oligonukleotidov, povezanih v enajst parov, izdelanih na podlagi poravnav nukleotidnih zaporedij petih lokusov. Ti lokusi so: regija ITS, ACT - kodirajoči gen za aktin, EF - elongacijski faktor 1-alfa, GPD - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, TS - triptofan sintaza. Skupno so bila v izdelavo začetnih oligonukleotidov vključena zaporedja lokusov iz 257 izolatov rodu *Verticillium*. Različne kombinacije začetnih oligonukleotidov pomnožijo produkte PCR, ki služijo kot PCR označevalci, specifični za posamezno vrsto (Preglednica 3) in so bile analizirane s simplex PCR testi, v katere so bili vključeni različni izolati kot pozitivne in negativne kontrole. Prav tako je bila preverjena uporabnost kombinacij novih začetnih oligonukleotidov v multiplex PCR testih.

Preglednica 3: Opredelitev parov začetnih oligonukleotidov za simplex in multiplex PCR teste, ki omogočajo identifikacijo posamezne vrste iz rodu *Verticillium* sensu stricto (Inderbitzin in sod., 2013)

<b>Vrsta</b>	<b>Par začetnih oligonukleotidov, ki omogoča identifikacijo</b>	<b>Dolžina produkta PCR [bp]</b>	<b>Tarčni lokus</b>
<i>V. albo-atrum</i>	Aaf/AaTr	725	ACT
<i>V. alfalfaef</i>	AlfF/AlfD1r	1060	GPD
<i>V. dahliae</i>	Df/Dr	490	ITS
<i>V. isaacii</i>	If/IKr	195	EF
<i>V. klebahnii</i>	Kf/IKr	230	EF
<i>V. nonalfalfaef</i>	NoF/NoNuR	1310	TS
<i>V. nubilum</i>	NuF/NoNuR	1150	TS
<i>V. tricorpus</i>	Tf/AaTr	415	ACT
<i>V. zaregamsianum</i>	Zf/Zr	360	GPD
Vrsta A1	A1f/A1r	310	EF
Vrsta D1	D1f/AlfD1r	1020	GPD

Multiplex test PCR omogoča identifikacijo ter razlikovanje vrste *V. dahliae* od vrste *V. longisporum* ter razlikovanje med posameznimi linijami *V. longisporum*. Razlikovanje med vrstami *V. dahliae* ter linijami *V. longisporum* omogoča pomnožitev alela EF Vrste A1, ki je prisoten samo pri *V. longisporum*, saj je Vrsta A1 ena izmed staršev vseh linij *V. longisporum*. Za linijo *V. longisporum* A1/D1 je značilna pomnožitev alela GPD Vrste D1, pri liniji *V. longisporum* A1/D3 pa se pomnoži odsek regije ITS, ki izhaja iz *V. dahliae* linija D3. V obeh primerih na elektroforetskem gelu vidimo dve lisi (Slika 3). Pri liniji *V. longisporum* A1/D2 pa se v multiplex PCR testu pomnoži samo alel EF Vrste A1, zato na gelu opazimo samo eno elektroforetsko črto (Slika 3) (Inderbitzin in sod., 2013).



Slika 3: Pričakovani produkti PCR po multiplex PCR testu za identifikacijo in diferenciacijo vrste *V. dahliae* in treh linij *V. longisporum*. Vd – produkt PCR pri vrsti *V. dahliae* (trije sevi); D1 – *V. longisporum* linija A1/D1; D2 – *V. longisporum* linija A1/D2; D3 – *V. longisporum* linija A1/D3 (Inderbitzin in sod., 2013)

### 2.2.2 Vloga regije ITS v identifikaciji in taksonomski razvrstitvi gliv rodu *Verticillium* sensu stricto

Glivni rRNK cistron sestoji iz genov 18S, 5.8S ter 28S, med njimi pa se nahajata dve regiji ITS, ITS1 ter ITS2. Znano je, da so zaporedja genov 18S, 5.8S ter 28S med vrstami zelo ohranjena, obe regiji ITS pa sta bolj variabilni in omogočata razlikovanje posameznih vrst (Henson in French, 1993; White in sod., 1990). Cistron se v genomu gliv pojavlja v velikem številu kopij in vsebuje ohranjene ter variabilne regije, ki jih lahko pomnožimo in sekvenciramo z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi, zato se že več kot 20 let uporablja za molekularno diagnostiko ter filogenetske analize gliv (Henson in French, 1993; Collopy in sod., 2002; Schoch in sod., 2012).

Pomnožitev zaporedja DNA z metodo PCR ter direktno sekvenciranje produkta PCR za filogenetsko analizo ima številne prednosti: metode priprave DNA za analizo so robustne in enostavne, zadostujejo že majhne koncentracije DNA, obe verigi DNA pomnoženega zaporedja lahko sekvenciramo, kar izboljša natančnost zaporedja (White in sod., 1990).

Pri tovrstnih analizah uporabljamo univerzalne začetne oligonukleotide, ki so izdelani na podlagi zaporedij ohranjenih genov cistrona rRNK. Ena izmed prvih razvitih tovrstnih začetnih oligonukleotidov, ki sta še danes uveljavljena, sta bila oligonukleotid ITS1, katerega zaporedje se nahaja znotraj 18S gena, ter oligonukleotid ITS4, katerega zaporedje se nahaja znotraj 28S gena. Pomnožita del DNA, ki vsebuje regiji ITS1 in ITS2 ter med njima nahajajoči se gen 5.8S. Splošno uveljavljeno ime za pomnoženi odsek je regija ITS (White in sod., 1990; Martin in Rygiewicz 2005).

Pomnoževanju regije ITS sledi sekvenciranje dobljenega produkta PCR ter filogenetska analiza zaporedij, kjer lahko na podlagi razlik v zaporedjih določimo razmerja in odnose med različnimi vrstami in organizmi. Celotno metodologijo, vključno z uporabo opisanih začetnih oligonukleotidov, lahko uporabimo v taksonomskeh študijah gliv rodu *Verticillium* sensu stricto (Henson in French, 1993; Nazar in sod., 1991).

Bidocha in sod. (1999) so s filogenetsko analizo regije ITS iz 18 izolatov določili štiri skupine znotraj rodu *Verticillium* ter opazili, da se izolati *V. albo-atrum* iz lucerne razlikujejo v zaporedju regije ITS od ostalih izolatov *V. albo-atrum*. Podobno so Tran in sod. (2013) preučevali regijo ITS pri virulentnih linijah *V. longisporum* A1/D1 in avirulentnih linijah *V. longisporum* A1/D3 in ugotovili, da se liniji med seboj razlikujeta v dedovanju regije ITS, kajti linija A1/D1 vsebuje zaporedje regije ITS iz starševske Vrste A1, medtem, ko linija A1/D3 vsebuje zaporedje regije ITS iz starševske vrste *V. dahiae*. Collopy in sod. (2002) pa so s študijo regije ITS pri vrsti *Verticillium fungicola* (*V. fungicola*), ki okužuje gojišča gob, na izolatih iz Evrope in Severne Amerike, ugotovili, da se izolati glede na geografsko območje oziroma izvor razlikujejo v regiji ITS in se zato delijo v podskupine znotraj vrste *V. fungicola*. *V. fungicola* var. *fungicola* je podskupina vrste, kamor spadajo vsi evropski izolati *V. fungicola* in ki imajo popolnoma identično regijo ITS. V podskupino *V. fungicola* var. *aleophilum* pa spadajo vsi izolati iz Severne Amerike, ki imajo prav tako popolnoma identično zaporedje regije ITS.

Regijo ITS lahko uporabimo tudi za izdelavo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za posamezno vrsto in s tem izdelamo diagnostične teste za identifikacijo vrst. Nazar in sod. (1991) so pri primerjavi regij ITS1 in ITS2 med vrstama *V. albo-atrum* ter *V. dahiae* odkrili tri oziroma dva SNP. Na podlagi teh zaporedij nukleotidov regij ITS so razvili specifične začetne oligonukleotide in tako postavili enega izmed prvih načinov molekularne detekcije ter diferenciacije vrst *Verticillium*.

### 2.2.3 Uporaba markerjev SCAR za določanje patogenosti izolatov

Na osnovi predhodnih študij virulence izolatov glive *V. albo-atrum* z umetnimi okužbami hmelja ter molekularnih analiz genomske DNA izolatov iz hmeljišč sta bili identificirani dve, za hmelj patogeni skupini znotraj vrst, PG1, ki je skupina izolatov, ki povzročajo blago obliko hmeljeve uvelosti, ter PG2 skupino, ki zajema izolate, ki povzročajo letalno obliko bolezni (Radišek in sod., 2003). Pojavnost obeh oblik bolezni je odvisna od virulence, občutljivosti kultivarja hmelja ter okoljskih dejavnikov (Radišek in sod., 2006).

Bolj in manj virulentni patotipi novo opisanih vrst *V. nonalfafae*, *V. alfalfaef* ter že prej znanih vrst *V. albo-atrum*, *V. dahliae* ter *V. longisporum* pa se pojavljajo tudi na drugih gostiteljskih rastlinah: lucerna, krompir, paradižnik, zeleni poper (Radišek in sod., 2006; Inderbitzin in sod., 2011). Hitra detekcija ter identifikacija patotipov je nujna za obvladovanje okužb ter preprečevanje večjih gospodarskih izgub (Radišek in sod., 2004).

Namnožen fragment z določenim zaporedjem ali marker SCAR (sekvenčno okarakterizirana pomnožena regija) je zaporedje DNA v genomu, ki ga lahko določimo z metodo PCR ob uporabi specifičnih začetnih oligonukleotidov. Razvoj markerja temelji na določenih zaporedjih nukleotidov specifičnih markerjev RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA) ali AFLP (dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov), ki omogočajo izdelavo za to zaporedje specifičnih začetnih oligonukleotidov. Markerji SCAR predstavljajo nove možnosti v diagnostiki rastlinskih patogenov. Razvoj markerja, specifičnega za en patotip rastlinskega patogena, namreč omogoča hitro in natančno detekcijo povzročiteljev bolezni rastlin v tleh, vodi ter tudi v/na rastlinah (Radišek, 2004).

Radišek in sod. (2004) so aplicirali metodologijo markerjev in razvili marker SCAR, specifičen za letalni patotip PG2 glive *V. albo-atrum*. V študiji molekularne variabilnosti izolatov *V. albo-atrum* so identificirali 17 markerjev AFLP, povezanih z virulenco izolatov. Na podlagi nukleotidnih zaporedij markerjev AFLP so razvili potencialne začetne oligonukleotide za markerje SCAR za PG1 in PG2 patotipe, od katerih sta specifičnost pri testiranju na večjem številu izolatov obdržala dva para začetnih oligonukleotidov za dva markerja SCAR, to sta S-9-1INT in S-9-1EXT, razvita iz enega zaporedja AFLP. Oba razvita markerja SCAR pomnožita produkt PCR specifične dolžine samo pri PG2 patotipih povzročiteljev hmeljeve uvelosti (Radišek in sod., 2004).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 PRIDOBITEV DNA MATERIALA GLIV

V poskus identifikacije ter umestitve izolatov po novi taksonomski razvrstitvi gliv rodu *Verticillium* sensu stricto smo zajeli 118 izolatov, od katerih je bilo 30 izolatov izoliranih iz okuženih rastlin hmelja, paprike, kumarice in surfinije iz Slovenije, 80 izolatov izoliranih iz okuženih rastlin hmelja, artičoke, krompirja, paradižnika, lucerne, cigarovca, oljk, bombaža, mete, zelja, cvetače, lipe in krizanteme iz drugih držav po celi svetu, geografski izvor 8 izolatov pa je bil neznan. Glivni material smo pridobili iz zbirke škodljivih organizmov Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu.

Preglednica 4: Seznam in podatki o izolatih, uporabljenih v poskusu identifikacije z novimi PCR označevalci za identifikacijo vrst *Verticillium* sensu stricto in v filogenetski analizi

Št. vzorca	Morfološka identifikacija	Oznaka	Gostitelj	Geografsko območje	Patotip	Izvor materiala
1	<i>V.albo-atrum</i>	P10	hmelj	Nemčija	letalen	5
2	<i>V.albo-atrum</i>	P114/1	hmelj	Nemčija	letalen	5
3	<i>V.albo-atrum</i>	P34/1	hmelj	Nemčija	letalen	5
4	<i>V.albo-atrum</i>	P15	hmelj	Nemčija	letalen	5
5	<i>V.albo-atrum</i>	P55	hmelj	Nemčija	blag	5
6	<i>V.albo-atrum</i>	P83	hmelj	Nemčija	blag	5
7	<i>V.albo-atrum</i>	6/99	hmelj	Nemčija	blag	4
8	<i>V.albo-atrum</i>	14/93	hmelj	Nemčija	blag	4
9	<i>V.albo-atrum</i>	15/98	hmelj	Nemčija	blag	4
10	<i>V.albo-atrum</i>	P84/2	hmelj	Nemčija	blag	5
11	<i>V.albo-atrum</i>	16/00	hmelj	Nemčija	blag	4
12	<i>V.albo-atrum</i>	T2	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
13	<i>V.albo-atrum</i>	TABOR 6	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
14	<i>V.albo-atrum</i>	KV11 URŠIČ	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
15	<i>V.albo-atrum</i>	Ciz/DED	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
16	<i>V.albo-atrum</i>	BIZ	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
17	<i>V.albo-atrum</i>	VranBis09	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
18	<i>V.albo-atrum</i>	Sent4	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
19	<i>V.albo-atrum</i>	MO 3	hmelj	Slovenija	blag	IHPS
20	<i>V.albo-atrum</i>	OCer	hmelj	Slovenija	blag	IHPS
21	<i>V.albo-atrum</i>	zup	hmelj	Slovenija	blag	IHPS
22	<i>V.albo-atrum</i>	Rec91	hmelj	Slovenija	blag	IHPS
23	<i>V.albo-atrum</i>	KRES98	hmelj	Slovenija	blag	IHPS
24	<i>V.albo-atrum</i>	CIG3	hmelj	Slovenija	blag	IHPS
25	<i>V.albo-atrum</i>	1985a	hmelj	Anglija	letalen	2
26	<i>V.albo-atrum</i>	11041	hmelj	Anglija	letalen	1
27	<i>V.albo-atrum</i>	11055	hmelj	Anglija	letalen	1
28	<i>V.albo-atrum</i>	11047	hmelj	Anglija	letalen	1
29	<i>V.albo-atrum</i>	11097	hmelj	Anglija	letalen	1
30	<i>V.albo-atrum</i>	11100	hmelj	Anglija	letalen	9
31	<i>V.albo-atrum</i>	1974	hmelj	Anglija	letalen	2
32	<i>V.albo-atrum</i>	298099	hmelj	Anglija	letalen	CABI

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 4: Seznam in podatki o izolatih, uporabljenih v poskusu identifikacije z novimi PCR označevalci za identifikacijo vrst *Verticillium* sensu stricto in v filogenetski analizi«

Št. vzorca	Morfološka identifikacija	Oznaka	Gostitelj	Geografsko območje	Patotip	Izvor materiala
33	<i>V.albo-atrum</i>	298100	hmelj	Anglija	letalen	CABI
34	<i>V.albo-atrum</i>	298101	hmelj	Anglija	letalen	CABI
35	<i>V.albo-atrum</i>	298102	hmelj	Anglija	letalen	CABI
36	<i>V.albo-atrum</i>	11052	hmelj	Anglija	blag	1
37	<i>V.albo-atrum</i>	1953	hmelj	Anglija	blag	2
38	<i>V.albo-atrum</i>	298092	hmelj	Anglija	blag	CABI
39	<i>V.albo-atrum</i>	298095	hmelj	Anglija	blag	CABI
40	<i>V.albo-atrum</i>	Sol	hmelj	Poljska	blag	3
41	<i>V.albo-atrum</i>	CBS 393.91	hmelj	Belgija	blag	CBS
42	<i>V.albo-atrum</i>	kum	kumare	Slovenija	n.t.	IHPS
43	<i>V.albo-atrum</i>	Surf	surfinija	Slovenija	n.t.	IHPS
44	<i>V.albo-atrum</i>	11077	rogovilček	Anglija	n.t.	1
45	<i>V.albo-atrum</i>	11081	krizantema	Anglija	n.t.	1
46	<i>V.albo-atrum</i>	CBS 102.464	artičoka	Italija	n.t.	CBS
47	<i>V.albo-atrum</i>	CBS 241.82	catalpa	Italija	n.t.	CBS
48	<i>V.albo-atrum</i>	CBS 454.51	krompir	Anglija	n.t.	CBS
49	<i>V.albo-atrum</i>	CBS 682.88	krompir	Nizozemska	n.t.	CBS
50	<i>V.albo-atrum</i>	11066	krompir	Anglija	n.t.	1
51	<i>V.albo-atrum</i>	T 179	paradižnik	Anglija	blag	2
52	<i>V.albo-atrum</i>	CBS 321.91	paradižnik	Nizozemska	n.t.	CBS
53	<i>V.albo-atrum</i>	AR01/067	paradižnik	Anglija	letalen	2
54	<i>V.albo-atrum</i>	AR0/140	paradižnik	Anglija	letalen	2
55	<i>V.albo-atrum</i>	AR01/JS1	paradižnik	Anglija	n.t.	2
56	<i>V.albo-atrum</i>	PD 83/53a	paradižnik	Nizozemska	n.t.	2
57	<i>V.albo-atrum</i>	PD 2000/4186a	paradižnik	Nizozemska	n.t.	2
58	<i>V.albo-atrum</i>	Luc	lucerna	Anglija	letalen	7
59	<i>V.albo-atrum</i>	41	lucerna	Kanada	n.t.	6
60	<i>V.albo-atrum</i>	CBS 392.91	lucerna	Nizozemska	n.t.	CBS
61	<i>V.albo-atrum</i>	107	lucerna	ZDA	n.t.	6
62	<i>V.albo-atrum</i>	314193	krompir	Avstralija	n.t.	CABI
63	<i>V.albo-atrum</i>	340646	krompir	Španija	n.t.	CABI
64	<i>V.albo-atrum</i>	Kanada 11	lucerna	Kanada	n.t.	6
65	<i>V. dahliae</i>	JKG 2	catalpa	Nizozemska	n.t.	8
66	<i>V. dahliae</i>	JKG1	krompir	Nizozemska	n.t.	8
67	<i>V. dahliae</i>	JKG 8	krompir	Nizozemska	n.t.	8
68	<i>V. dahliae</i>	A56	krompir	ZDA	n.t.	10
69	<i>V. dahliae</i>	DJK	krizantema	Nizozemska	n.t.	8
70	<i>V. dahliae</i>	MAI	Krizantema	Nizozemska	n.t.	8
71	<i>V. dahliae</i>	Mint	meta	ZDA	n.t.	10
72	<i>V. dahliae</i>	GAJ09	hmelj	Slovenija	n.t.	IHPS
73	<i>V. dahliae</i>	PDRENU/MAR	hmelj	Slovenija	n.t.	IHPS
74	<i>V. dahliae</i>	CasD	hmelj	Slovenija	n.t.	IHPS
75	<i>V. dahliae</i>	KresD	hmelj	Slovenija	n.t.	IHPS
76	<i>V. dahliae</i>	MoD	hmelj	Slovenija	n.t.	IHPS
77	<i>V. dahliae</i>	Ledina09	hmelj	Slovenija	n.t.	IHPS
78	<i>V. dahliae</i>	Oset	hmelj	Slovenija	n.t.	IHPS
79	<i>V. dahliae</i>	12099	hmelj	Anglija	n.t.	1
80	<i>V. dahliae</i>	12042	hmelj	Anglija	n.t.	1
81	<i>V. dahliae</i>	PAPmb	paprika	Slovenija	n.t.	IHPS

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 4: Seznam in podatki o izolatih, uporabljenih v poskusu identifikacije z novimi PCR označevalci za identifikacijo vrst *Verticillium* sensu stricto in v filogenetski analizi«

Št. vzorca	Morfološka identifikacija	Oznaka	Gostitelj	Geografsko območje	Patotip	Izvor materiala
82	<i>V. dahliae</i>	PAP	paprika	Slovenija	n.t.	IHPS
83	<i>V. dahliae</i>	Pap99	paprika	Slovenija	n.t.	IHPS
84	<i>V. dahliae</i>	Pap2008	paprika	Slovenija	n.t.	IHPS
85	<i>V. fungicola</i>	CBS 171.80	Dvotrosni kukmak	Nizozemska	n.t.	CBS
86	<i>V. nubilum</i>	CBS 456.51	krompir	Anglija	n.t.	CBS
87	<i>V. tricorpus</i>	CBS 227.84	krompir	Nizozemska	n.t.	CBS
88	<i>V. tricorpus</i>	JKG 20	lipa	Nizozemska	n.t.	8
89	<i>V. lecanii</i>	CBS 122.175	hrošč	Španija	n.t.	CBS
90	<i>V. lecanii</i>	B 560	čriček	Slovenija	n.t.	IHPS
91	<i>V. nigrescens</i>	CBS 123.176	izolacijska volna	Finska	n.t.	CBS
92	<i>V. longisporum</i>	CBS 110218	oljna ogrščica	Švedska	n.t.	CBS
93	<i>V. albo-atrum</i>	115	krompir	Nizozemska	n.t.	6
94	<i>V. dahliae</i>	14V	oljka	Grčija	VCG2	13
95	<i>V. albo-atrum</i>	110	krompir	Otoki princa Edwarda, Kanada	n.t.	13
96	<i>V. dahliae</i>	141	oljka	Bari, Italija	tomato race2	13
97	<i>V. dahliae</i>	3V	oljka	Grčija	VCG4	13
98	<i>V. albo-atrum</i>	166	krompir	Nizozemska	n.t.	6
99	<i>V. dahliae</i>	802-1	oljka	Kreta, Grčija	VCG4, tomato race2	13
100	<i>V. albo-atrum</i>	112	krompir	Otoki princa Edwarda, Kanada	n.t.	6
101	<i>V. albo-atrum</i>	110	krompir	Otoki princa Edwarda, Kanada	n.t.	6
102	<i>V. albo-atrum</i>	112	krompir	Otoki princa Edwarda, Kanada	n.t.	6
103	<i>V. albo-atrum</i>	115	krompir	Nizozemska	n.t.	6
104	<i>V. albo-atrum</i>	166	krompir	Nizozemska	n.t.	6
105	<i>V. dahliae</i>	V-138 I	bombaž	Dolina zgornjega Guadalquivirja, Španija	letalen	11
106	<i>V. dahliae</i>	V-176 I	bombaž	Dolina spodnjega Guadalquivirja, Španija	blag	11
107	<i>V. albo-atrum</i>	PETROL	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
108	<i>V. longisporum</i>	PD330	zelje	ZDA	n.t.	12
109	<i>V. dahliae</i>	PD335	meta	ZDA	n.t.	12
110	<i>V. dahliae</i>	PD584	zelje	Japonska	n.t.	12
111	<i>V. albo-atrum</i>	PD693	paradižnik	Anglija	n.t.	12
112	<i>V. albo-atrum</i>	SN 10	hmelj	Slovenija	letalen	IHPS
113	<i>Verticillium</i> spp.	ČEH	hmelj	Češka	n.t.	14
114	<i>V. tricorpus</i>	EX5 F7	tla	Nizozemska	n.t.	8
115	<i>V. tricorpus</i>	EX5 F8	tla	Nizozemska	n.t.	8
116	<i>V. dahliae</i>	A III 25	cvetača	ZDA	n.t.	10
117	<i>V. theobromae</i>	B 23	ni znano	ni znano	n.t.	MZKI
118	<i>V. dahliae</i>	PD 337	bombaž	ZDA	n.t.	12

Opomba: n.t. – izolat ni bil testiran za patogenost; IHPS – Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije; CABI – CABI Bioscience, Genetics Resources Collection, VB; CBS – CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Nizozemska; MZKI – Mikrobiološka zbirka Kemijskega inštituta, Slovenija; 1 – dr. G. Down, Horticulture Research International, VB; 2 – dr. D. J. Barbara, Horticulture Research International, VB;

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 4: Seznam in podatki o izolatih, uporabljenih v poskusu identifikacije z novimi PCR označevalci za identifikacijo vrst *Verticillium* sensu stricto in v filogenetski analizi«

3 – dr. E. Solarska, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Poljska; 4 – dr. E. Seigner, Bayer Landesanstalt fur Bodenkultur und Pflanzenbau, Nemčija; 5 – dr. Stefan Seefelder, Bayer Landesanstalt fur Bodenkultur und Pflanzenbau, Nemčija; 6 – dr. J. Robb, University of Guleph, Kanada; 7 – dr. R. Cooper, University of Bath, VB; 8 – dr. J. K. Goud, Biological Farming Systems, Nizozemska; 9 - dr. David Yohalem, Horticulture Research International, VB; 10 - dr. Cindy Ocambo, Oregon State University, ZDA; 11- dr. Rafael M. Jiménez-Díaz, University of Córdoba and Institute of Sustainable Agriculture, CSIC, Španija; 12 – dr. Krishna V. Subbarao and Patrik Inderbitzin, Department of Plant Pathology, University of California Davis, ZDA; 13- dr. Milton A. Typas, University of Athens, Grčija; 14 – Josef Vostrel, Hop Research Institute Co. Ltd., Češka.

### 3.1.1 Izolacija DNA iz micelija gliv

Za izvedbo poskusov smo potrebovali genomsko DNA izolatov. Na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin je bila shranjena DNA nekaterih vzorcev iz predhodnih raziskav, DNA preostalih vzorcev pa smo izolirali. Protokol izolacije smo povzeli po metodi Kump in sod. (1992).

V brezprašni komori smo iz gojišča v sterilnih pogojih izrezali košček glivnega micelija ter ga prenesli v terilnico. Nadaljnje delo ni potekalo v sterilnih pogojih. Košček v terilnici smo zmleli ter dodali 800 µl ekstrakcijskega pufra CTAB [CTAB (Duchefa), 1 M Tris-HCl (Duchefa), 0,5 M EDTA (Kemika), 1,4 M NaCl (Duchefa), ddH<sub>2</sub>O]. Premešano suspenzijo smo prelili v 1,5 ml ependorfovovo centrifugirko ter vsebino inkubirali v vodni kopeli na 68 °C 90 minut. Nato smo suspenziji dodali 800 µl zmesi kloroform (Merck) : izoamilalkohol (Merck) v razmerju 24 : 1, močno premešali ter centrifugirali na 10000 obratih/minuto (Eppendorf centrifuges 5804/R) pri 4 °C 10 minut. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo 1,5 ml ependorfovovo centrifugirko, dodali 70 µl 3M natrijevega acetata s pH 5,2 (Merck) in 700 µl ledeno hladnega izopropanola (Merck) ter premešali. Vzorce smo 30 minut inkubirali na -20 °C. Nato smo vzorce centrifugirali na 10000 obratih/minuto pri 4 °C 10 minut. Supernatant smo odlnili in oborino sprali s 1000 µl 70 % etanola (Merck). Ponovno smo vzorce centrifugirali na 10000 obratih/minuto pri 4 °C 10 minut. Nato smo odstranili ves etanol, oborino popolnoma posušili na sobni temperaturi ter dodali 60 µl pufra TE [1M Tris-HCl (Duchefa), 0,5 M EDTA (Kemika), ddH<sub>2</sub>O]. Vzorce smo shranili pri 4 °C čez noč, da se je DNA raztopila v pufru.

### 3.1.2 Merjenje koncentracije DNA in redčenje vzorcev

Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili z napravo DNA fluorometer DyNA QuantTM 200 (GE Helathcare). Po priloženih navodilih smo pripravili raztopino za merjenje koncentracije iz 10 x koncentrirane raztopine TNE [100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7], ki smo jo 10-krat redčili v destilirani vodi. Raztopino smo prefiltrirali skozi filter s porami velikosti 0,2 µm ter v raztopino dodali barvilo Hoechts 33258 do končne koncentracije 0,1 µg/ml. Steklenico z delovno raztopino za merjenje koncentracije smo zavili v aluminijasto folijo, ker je barvilo občutljivo na svetlobo.

Pred merjenjem koncentracije smo napravo kalibrirali z DNA telečjega timusa, 1 mg/ml DNA v 1 x pufru TNE. Pri merjenju DNA smo v kiveto dodali 2 ml pripravljene delovne raztopine, v katero smo odpipetirali 2 µl DNA enega vzorca ter dobro premešali. Kiveto smo vstavili v fluorometer, ki je izmeril koncentracijo DNA, ki smo jo prepisali v tabelo z informacijami o vzorcih. Nato smo vsebino kivete izlili v čašo, kiveto dobro sprali z destilirano vodo ter ponovili postopek merjenja pa vse preostale vzorce.

Izolirano DNA glivnih izolatov smo, ne glede na izmerjeno koncentracijo, redčili v razmerju 1 µl DNA + 49 µl ddH<sub>2</sub>O (IDT), saj v nadaljevanju uporabljeni novi začetni oligonukleotidi pomnožujejo DNA v širokem koncentracijskem območju (od 1 do 100 ng/µl). Samo pri nekaj vzorcih, kjer je bila izmerjena koncentracija DNA izjemno nizka, smo v reakciji PCR uporabili DNA redčeno v razmerju 1 µl DNA + 19 µl ddH<sub>2</sub>O (IDT) ali pa neredčeno DNA.

### 3.1.3 Preverjanje kakovosti DNA s pomnoževanjem regije ITS

Kakovost že izolirane ter na novo izolirane DNA smo preverili s pomnožitvijo regije ITS z univerzalnima ter uveljavljenima začetnima oligonukleotidoma ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3') in ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White in sod., 1990). Temperatura prileganja oligonukleotidov je 53 °C. Delovni raztopini obeh začetnih oligonukleotidov (IDT) smo pripravili iz 500 µM založne raztopine v pufru TdE (IDT) tako, da je bila končna koncentracija 10 µM.

Za pripravo reakcijske mešanice za PCR reakcijo smo uporabili 5x PCR pufer (Promega), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 10 mM deoksinukleotide (dNTP; Promega), 10 µM delovni raztopini obeh začetnih oligonukleotidov, vodo brez prisotnih nukleaz (IDT) ter polimerazo DNA v koncentraciji 5 U/µl. Končni volumen reakcije je znašal 20 µl, reakcijsko mešanico smo pripravili za 122 vzorcev (Preglednica 5) in jo ves čas hranili na ledu.

Preglednica 5: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje regije ITS

Reagent	Volumen na vzorec [µl]	Končna koncentracija na vzorec	Volumen za 122 vzorcev [µl]
dH <sub>2</sub> O	6,1		744,2
5 x PCR pufer	4,0	1x	488,0
MgCl <sub>2</sub>	1,2	1,5 mM	146,4
dNTP (2,5mM vsakega)	1,6	0,2 mM	195,2
Začetni oligonukleotid ITS1	1,0	0,5 µM	122,0
Začetni oligonukleotid ITS4	1,0	0,5 µM	122,0
Polimeraza	0,1	0,025 U/µL	12,2
Skupaj volumen	15	/	1830

Pomnoževanje DNA je potekalo v 0,2 ml ependorfovih epruvetah za PCR (PCR tubice), zloženih v okvirje 96-mestne plošče. V posamezno PCR tubico smo odpipetirali 5 µl DNA vsakega vzorca, po vrsti vzorce od 1 do 8 v prvi stolpec (1A do 1H), vzorce od 9 do 16 v drugi stolpec (2A do 2H) in po istem sistemu vse preostale vzorce. Plošči s tubicami smo kratko centrifugirali, da je DNA odtekla iz sten tubic na dno. Nato smo k vsakemu vzorcu dodali 15 µl reakcijske mešanice, jih hitro premešali, centrifugirali ter plošči prenesli v dve napravi PCR za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720. Pomnoževanje je potekalo po sledečem temperaturnem protokolu: začetna denaturacija na 94 °C 5 minut; 13 ciklov: 93 °C 35 sekund, 53 °C 55 sekund, 72 °C 45 sekund; 13 ciklov: 93 °C 35 sekund, 53 °C 55 sekund, 72 °C 59 sekund; 9 ciklov: 93 °C 35 sekund, 53 °C 55 sekund, 72 °C 118 sekund; končno podaljševanje verig na 72 °C 10 minut.

### 3.2 REAKCIJE PCR Z UPORABO NOVIH PCR OZNAČEVALCEV ZA IDENTIFIKACIJO VRST RODU *Verticillium sensu stricto*

#### 3.2.1 Pridobitev in priprava novih oligonukleotidov

Za izvedbo poskusa identifikacije izolatov smo 18 začetnih oligonukleotidov (Preglednica 6), ki omogočajo identifikacijo posamezne vrste rodu *Verticillium sensu stricto*, naročili pri podjetju Integrated DNA Technologies (IDT) v liofilizirani obliki. V posamezno tubico z DNA oligonukleotida smo dodali določen volumen pufra TdE (IDT), da smo pridobili 500 µM založno raztopino oligonukleotida. Iz založne raztopine smo pripravljali 10 µM delovne raztopine oligonukleotida z redčenjem v vodi brez prisotnih nukleaz (IDT) v razmerju založna raztopina oligonukleotida : voda brez nukleaz je 1 : 49. Pripravili smo večje količine delovne raztopine, saj smo s posameznim parom oligonukleotidov pomnoževali DNA pri vseh 118 vzorcih, ker smo sistematično pomnoževali in pregledovali produkte pri vseh izolatih.

Preglednica 6: Oznake, nukleotidna zaporedja, temperature prileganja novih začetnih oligonukleotidov ter vrsta *Verticillium* sensu stricto, ki jo par začetnih oligonukleotidov identificira

Oznaka oligonukleotida	Lokus, ki ga pomnoži	Nukleotidno zaporedje (5' -> 3')	Temperatura prileganja [°C]	Par identificira vrsto
AaF	ACT	GGCCTCGATAGCATCGCC	58	
AaTr	ACT	CTGGATGGAGACGTAGAAGGC	55	
Tf	ACT	CGTGCTGTCTCCGTAAGTTG	56	
A1f	EF	AAGTGGAGCCCCGTATCTGAAT	56	
A1r	EF	CAACTGGCAACAGGGCTTGAAT	56	
If	EF	CGATGTCGCGATGACCTCG	57	
IKr	EF	CGGCAGCCTCCTAAACATGG	56	
Kf	EF	ACATCCTGAGGGCTGCTTGAGA	56	
Alff	GPD	TCATGCCCTTGTTCATCGAT	57	
AlfD1r	GPD	TGCCGGCATCGACCTTGG	56	
D1f	GPD	CCCCGGCCTTGGTCTGAT	54	
Zf	GPD	GGTTCCCTCCCTCACACG	53	
Zr	GPD	CCACCCCTGATGTGGCGGA	57	
Df	ITS	CCGGTCCATCAGTCTCTTG	54	
Dr	ITS	CTGTTGCCGCTTCACTCG	55	
NoF	TS	CCTCGAAAAATCCACCAGCTCA	56	
NoNuR	TS	GTGGTTGAGATCCTCACGCTTC	56	
Nuf	TS	GGTCCCCCTCGTTCATGCAATC	56	

### 3.2.2 Priprava reakcijskih mešanic in temperaturni protokoli pomnoževanja

Reakcijske mešanice za pomnoževanje lokusov, ki omogočajo identifikacijo posamezne vrste s parom specifičnih začetnih oligonukleotidov, smo pripravili s 5x PCR pufom (Promega), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 10 mM dNTP (Promega), 10 µM delovnima raztopinama obeh specifičnih začetnih oligonukleotidov (IDT), vodo brez prisotnih nukleaz (IDT) ter s polimerazo DNA v koncentraciji 5 U/µl. Končni volumen reakcije je znašal 20 µl, reakcijsko mešanico smo pripravili za 125 vzorcev (Preglednica 7) in jo ves čas hranili na ledu.

Preglednica 7: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje lokusov, ki identificirajo posamezno vrsto *Verticillium* sensu stricto

Reagent	Volumen na vzorec [µl]	Končna koncentracija na vzorec	Volumen za 125 vzorcev [µl]
dH <sub>2</sub> O	5,7		712,5
5 x PCR pufer	4,0	1x	500,0
MgCl <sub>2</sub>	1,6	2,0 mM	200,0
dNTP (2,5 mM vsakega)	1,6	0,2 mM	200,0
Začetni oligonukleotid F	1,0	0,5 µM	125,0
Začetni oligonukleotid R	1,0	0,5 µM	125,0
Polimeraza	0,1	0,025 U/µL	12,5
Skupaj volumen	15	/	1875

Pomnoževanje je potekalo v PCR tubicah, v vsako tubico smo odpipetirali 5 µl izolirane DNA vsakega vzorca oziroma izolata. Tubice smo kratko centrifugirali, nato smo v tubice dodali po 15 µl reakcijske mešanice. Tubice smo hitro premešali ter centrifugirali ter jih prenesli v dve napravi PCR za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720. Pomnoževanje je potekalo po temperaturnih protokolih, prikazanih v preglednici 8. Za vsak par začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo identifikacijo ene vrste, smo izvedli enak postopek priprave reakcijske mešanice z enakimi reagenti, skupno smo pripravili in izvedli 11 simplex PCR reakcij, po potrebi smo reakcije ponovili ter optimizirali temperaturni protokol pomnoževanja.

Preglednica 8: Temperaturni protokoli za simplex reakcije PCR

Forward primer	Reverse primer	Začetna denaturacija [min in °C]	Število ciklov	Čas in temperatura denaturacije, prileganja, izdolževanja [sek in °C]	Končno pomnoževanje [min in °C]	
Aaf	AaTr	2 min na 94°C	35	10 sek 94°C	7 min na 72°C	
				20 sek 62°C		
				1 min na 72°C		
Alff	AlfD1r		35	10 sek 94°C	7 min na 72°C	
				20 sek 64°C		
				1 min na 72°C		
Df	Dr		35	10 sek 94°C	7 min na 72°C	
				20 sek 67°C		
				1 min na 72°C		
If	IKr		35	10 sek 94°C	»se nadaljuje«	
				20 sek 64°C		
				1 min na 72°C		

» nadaljevanje preglednice 8: Temperaturni protokoli za simplex reakcije PCR«

Forward primer	Reverse primer	Začetna denaturacija [min in °C]	Število ciklov	Čas in temperatura denaturacije, prileganja, izdolževanja [sek in °C]	Končno pomnoževanje [min in °C]	
Kf	IKr	<b>2 min na 94 °C</b>	35	10 sek 94°C	<b>7 min na 72 °C</b>	
				<b>20 sek 62°C</b>		
				1 min na 72°C		
				10 sek 94°C		
Nof	NoNur		35	<b>20 sek 64°C</b>		
				1 min na 72°C		
				10 sek 94°C		
Nuf	NoNur		35	<b>20 sek 62°C</b>		
				1 min na 72°C		
				10 sek 94°C		
Tf	AaTr		35	<b>20 sek 64°C</b>		
				1 min na 72°C		
				10 sek 94°C		

### 3.2.2.1 Multiplex reakciji PCR za identifikacijo linij *V. longisporum* in razločitev vrst *V. albo-atrum*, *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*

Pripravili smo multiplex reakcijo PCR hkratnega pomnoževanja več lokusov s tremi pari začetnih oligonukleotidov, s katero smo želeli razločiti in identificirati *V. dahliae* ter tri linije *V. longisporum*. Uporabili smo pare oligonukleotidov Df/Dr, D1f/AlfD1r in A1f/A1r, ki omogočajo razlikovanje glede na število elektroforetskih lis, ki predstavljajo različne pomnožene odseke DNA.

Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili 5x PCR pufer (Promega), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 10 mM dNTP (Promega), 10 µM delovne raztopine začetnih oligonukleotidov (IDT), vodo brez prisotnih nukleaz (IDT) ter polimerazo DNA v koncentraciji 5 U/µl. Končni volumen multiplex reakcije je bil 20 µl. Multiplex reakcijo PCR smo izvedli na 35 vzorcih, ki so bili glede na zaporedje ITS regije po primerjavi s podatkovno zbirkо NCBI, identificirani kot *V. dahliae*.

Preglednica 9: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za multiplex reakcijo PCR za identifikacijo linij *V. longisporum*

Reagent	Volumen na vzorec [µl]	Končna koncentracija na vzorec	Volumen za 40 vzorcev [µl]
dH <sub>2</sub> O	2,7		108,0
5 x PCR pufer	4,0	1x	160,0
MgCl <sub>2</sub>	1,6	2,0 mM	64,0
dNTP (2,5 mM vsakega)	1,6	0,2 mM	64,0
Začetni oligonukleotid A1f	1,0	0,5 µM	40,0
Začetni oligonukleotid A1r	1,0	0,5 µM	40,0
Začetni oligonukleotid D1f	1,0	0,5 µM	40,0
Začetni oligonukleotid AlfD1r	1,0	0,5 µM	40,0
Začetni oligonukleotid Df	0,5	0,25 µM	20,0
Začetni oligonukleotid Dr	0,5	0,25 µM	20,0
Polimeraza	0,1	0,025 U/µl	4,0
Skupaj volumen	15	/	600

Pomnoževanje je potekalo v PCR tubicah, kamor smo odpipetirali 5 µl DNA vsakega vzorca, jih kratko centrifugirali in dodali 15 µl reakcijske mešanice (Preglednica 9). Vsebino tubic smo premešali, centrifugirali in prenesli v napravo PCR za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720. Pomnoževanje je potekalo po temperaturnem protokolu: začetna denaturacija na 94 °C 2 minuti; 35 ciklov: 94 °C 10 sekund, 64 °C 20 sekund, 72 °C 1 minuta; končno pomnoževanje na 72 °C 7 minut.

Na enak način smo pripravili multiplex reakcijo PCR za razločitev vrst *V. albo-atrum*, *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*. Uporabili smo pare začetnih oligonukleotidov Aaf/AaTr, AlfF/AlfD1r in Nof/NoNur (Preglednica 10). Pomnoževanje smo izvedli na 48 vzorcih, ki so predstavljeni vzorce, ki jih še nismo uspeli pomnožiti ali pa so se zelo slabo pomnožili, ter referenčne vzorce. Pomnoževanje je potekalo po temperaturnem protokolu: začetna denaturacija na 94 °C 2 minuti; 35 ciklov: 94 °C 10 sekund, 64 °C 20 sekund, 71 °C 1 minuta; končno podaljševanje na 72 °C 7 minut.

Preglednica 10: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za multiplex reakcijo PCR za razločitev vrst *V. albo-atrum*, *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*

Reagent	Volumen na vzorec [µl]	Končna koncentracija na vzorec	Volumen za 48 vzorcev [µl]
dH <sub>2</sub> O	1,6		81,6
5 x PCR pufer	4,0	1x	192,0
MgCl <sub>2</sub>	1,6	2,0 mM	76,8
dNTP (2,5 mM vsakega)	1,6	0,2 mM	76,8
Začetni oligonukleotid Aaf	1,0	0,5 µM	48,0
Začetni oligonukleotid AaTr	1,0	0,5 µM	48,0
Začetni oligonukleotid AlfF	1,0	0,5 µM	48,0
Začetni oligonukleotid AlfD1r	1,0	0,5 µM	48,0
Začetni oligonukleotid Nof	1,0	0,5 µM	48,0
Začetni oligonukleotid NoNur	1,0	0,5 µM	48,0
Polimeraza	0,1	0,025 U/µl	4,8
Skupaj volumen	15	/	720

### 3.2.2.2 Gradientni PCR za preverjanje specifičnosti produktov reakcij PCR z novimi začetnimi oligonukleotidi

Izvedli smo reakcijo PCR določenih vzorcev pri različnih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov. Želeli smo preveriti, ali so šibkejše elektroforetske črte produktov PCR na gelu posledica specifičnega pomnoževanja in jih moramo upoštevati pri analizi, ali pa gre za nespecifične produkte, ki pri višji temperaturi prileganja izginejo (vezava začetnih označevalcev na DNA ne poteče). Take črte lahko pri analizi zanemarimo.

Na podlagi intenzitete lis smo izbrali sedem vzorcev, pomnoženih v reakciji PCR z začetnimi označevalci Tf/AaTr (*V. tricorpus*), kjer smo na gelu detektirali šibkejše črte, ter vzorec 87 kot referenčni vzorec, kjer je bila intenziteta črte zelo močna ter dolžina specifična, ker gre za izolat vrste *V. tricorpus*. Po 5 µl vsakega vzorca smo odpipetirali v pet PCR tubic, da smo pripravili pet kolon vzorcev za pet različnih temperturnih protokolov reakcije PCR.

Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili 5x PCR pufer (Promega), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 10 mM dNTP (Promega), 10 µM delovne raztopine začetnih oligonukleotidov (IDT), vodo brez prisotnih nukleaz (IDT) ter polimerazo DNA v koncentraciji 5 U/µl (Preglednica 11). Končni volumen multiplex reakcije je bil 20 µl.

Preglednica 11: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za gradientni PCR

Reagent	Volumen na vzorec [µl]	Končna koncentracija na vzorec	Volumen za 44 vzorcev [µl]
dH <sub>2</sub> O	5,7		250,8
5 x PCR pufer	4,0	1x	176,0
MgCl <sub>2</sub>	1,6	2,0 mM	70,4
dNTP (2,5 mM vsakega)	1,6	0,2 mM	70,4
Začetni oligonukleotid Tf	1,0	0,5 µM	44,0
Začetni oligonukleotid AaTr	1,0	0,5 µM	44,0
Polimeraza	0,1	0,025 U/µL	4,4
Skupaj volumen	15	/	660

PCR tubice z DNA in reakcijsko mešanico smo prenesli v napravo za ciklično termostatiranje Biometra T Gradient (Biometra), kjer smo PCR izvedli po temperturnem protokolu, ki za vsako kolono v napravi PCR predvidi višjo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. PCR tubice smo vstavili v 1. kolono (65 °C), 4. kolono (65,8 °C), 6. kolono (66,8 °C), 9. kolono (68,2 °C) in 12. kolono (69 °C). Pomnoževanje je potekalo po sledečem protokolu: začetna denaturacija na 94 °C 2 minuti; 35 ciklov: 94 °C 10 sekund, določena temperatura prileganja začetnih označevalcev 20 sekund, 72 °C 1 minuta; končno podaljševanje 72 °C 7 minut.

### 3.3 REAKCIJA PCR ZA DOLOČITEV PATOGENOSTI IZOLATOV

Patogenost izolatov smo določali z markerji SCAR oziroma začetnimi oligonukleotidi (Radišek in sod., 2006), ki so specifični za izolate *Verticillium*, ki povzročijo letalno obliko verticilijske uvelosti. Uporabili smo dva para začetnih oligonukleotidov, izdelana na odseku DNA, ki je bila v preteklosti pridobljena na osnovi AFLP analize :

SCAR 6-2\_1F (5'-GTCCTGAGCGGGAACGGCAG-3')

SCAR 6-2\_1R (5'-AGCCACCCCCGCCTGAGAG-3'),

SCAR 6-2\_2F (5'-CCCGTGTGAGCGACCGACAG-3')

SCAR 6-2\_2R (5'-GCCACCCCCGCCTTGAGAGA-3').

Začetne oligonukleotide smo pridobili iz podjetja Sigma v liofilizirani obliki. V posamezno tubico, kjer se je nahajala DNA oligonukleotida, smo dodali določen volumen pufra TdE (IDT) in pridobili 500 µM založno raztopino. Iz založne raztopine oligonukleotida smo pripravili 10 µM delovne raztopine oligonukleotida z redčenjem v vodi brez nukleaz (IDT). Reakcijsko mešanico za posamezen par začetnih oligonukleotidov smo pripravili z 10x PCR pufrom (ABI), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 10 mM dNTP (Promega), 10 µM delovnima raztopinama obej specifičnih začetnih oligonukleotidov (IDT), vodo brez prisotnih nukleaz (IDT) ter s polimerazo DNA v koncentraciji 5 U/µl. Končni volumen reakcije je znašal 20 µl. Reakcijsko mešanico smo pripravili za 124 vzorcev (Preglednica 12).

Preglednica 12: Potrebni reagenti za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje markerjev SCAR

Reagent	Volumen na vzorec [µl]	Končna koncentracija na vzorec	Volumen za 124 vzorcev [µl]
dH <sub>2</sub> O	7,7		954,8
10 x PCR pufer	2,0	1x	248,0
MgCl <sub>2</sub>	1,6	2,0 mM	198,4
dNTP (2,5 mM vsakega)	1,6	0,2 mM	198,4
Začetni oligonukleotid F	1,0	0,5 µM	124,0
Začetni oligonukleotid R	1,0	0,5 µM	124,0
Polimeraza	0,1	0,025 U/µl	12,4
Skupaj volumen	15	/	1860

Pomnoževanje je potekalo v PCR tubicah, kamor smo odpipetirali 5 µl DNA vsakega vzorca, kratko centrifugirali in dodali 15 µl reakcijske mešanice. Tubice smo premešali, centrifugirali in prenesli v dve napravi PCR za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720. Pomnoževanje markerjev SCAR6-2\_1 in SCAR6-2\_2 je potekalo po sledеčem temperaturnem protokolu: začetna denaturacija na 94 °C 4 minute; 30 ciklov: 94 °C 45 sekund, 60 °C 30 sekund, 72 °C 1 minuta; končno podaljševanje na 72 °C 10 minut.

### 3.4 ANALIZA PRODUKTOV REAKCIJE PCR

Pomnoževanju lokusov v simplex in multiplex reakcijah PCR z novimi začetnimi oligonukleotidi, pomnoževanju ITS regije ter pomnoževanju novih markerjev SCAR je sledila analiza pomnoženih delov DNA na agarozni elektroforezi. Gre za ločevanje DNA oziroma produktov reakcij PCR v agaroznem gelu, ki v vzpostavljenem električnem polju potujejo proti pozitivno nabitim elektrodi. Pot, ki jo prepotuje vsak produkt reakcije PCR, je odvisna od dolžine produkta. Daljši produkti PCR v določenem času prepotujejo krajšo razdaljo v gelu z določeno zamreženostjo.

#### 3.4.1 Priprava vzorcev za agarozno elektroforezo

V nove PCR tubice smo prenesli 5 µl oziroma 10 µl (produkti PCR reakcij za določanje patogenosti) produkta pomnoževanja. Nato smo vzorcem dodali 2 µl oziroma 5 µl barvila »bromfenolmodro« [Ficol 400 (Sigma), bromfenol modro (Sigma), 5x TBE, ddH<sub>2</sub>O] ter centrifugirali, da je barvilo steklo na dno in se premešalo s produkтом pomnoževanja. Barvilo PCR reakcijo naredi gostejšo od vode in tako omogoča, da se le-ta potopi v luknjico gela. Ker potuje kot krajsa molekula DNA, nakazuje fronto potovanja v gelu in omogoča sledenje potovanju DNA v električnem polju.

#### 3.4.2 Priprava agaroznega gela in ločevanje produktov reakcij PCR

Uspešnost pomnoževanja vsake reakcije PCR smo preverili z agarozno elektroforezo na 1,3 % agaroznem gelu, kot je bilo navedeno v literaturi (Inderbitzin in sod., 2013). Pripravili smo dva gela, večji in manjši, da smo lahko nanesli vseh 118 vzorcev.

Pred izdelavo gelov smo pripravili 2 litra 5 x TBE elektroforetskega pufra (108 g Tris (Duchefa), 55 g borove kisline (Duchefa), 3,7 g EDTA (Kemika), destilirana voda do volumena dveh litrov). Vsebino čaše smo dobro zmešali na magnetnem mešalu, jo prelimili v reagentno steklenico ter avtoklavirali 15 minut na temperaturi 212 °C in tlaku 1,3 bar.

Večji in manjši agarozni gel smo pripravili iz sestavin, navedenih v preglednici 13. Zatehtali smo določeno količino agaroze ter jo stresli v 500 mL reagentno steklenico. Dodali smo TBE pufer in destilirano vodo ter vsebino steklenice dobro premešali. Nato smo v mikrovalovni pečici agarozo popolnoma raztopili. Tekoči gel smo delno ohladili ter vanj dodali etidijev bromid in ga dobro premešali. Gel smo prelimili v sestavljen kalup. V 20 minutah se je gel strdil, zato smo odstranili glavnice ter prenesli gel z nosilcem v elektroforezno kadičko (Agagel Maxi, Biometra), kamor smo predhodno nalili 10 x redčen TBE pufer.

Preglednica 13: Sestavine za 1,3 % agarozni gel različnih velikosti

<b>Gel, volumen = 306 ml</b>		<b>Gel, volumen = 125 ml</b>	
Agaroza	4 g	Agaroza	1,6 g
TBE pufer	61,2 ml	TBE pufer	25 ml
Etidijev bromid	15,3 µl	Etidijev bromid	6,3 µl
Destilirana voda	244,8 ml	Destilirana voda	100 ml

Na gel smo nanesli vzorce ter dolžinska standarda 100 bp (ThermoScientific) in 1 kb (Fermentas). Elektroforeza je potekala pri 120 do 130 V približno eno uro. Po končani elektroforezi smo gel prenesli na UV transiluminator, kjer smo lahko vizualizirali produkte PCR reakcije zaradi vgradnje barvila etidijev bromid v dvovertično DNA. Gel smo slikali s fotoaparatom Nikon ter sliko prenesli na računalnik, kjer smo v programu Microsoft Word dopisali številke vzorcev na sliko za lažjo določitev vzorcev in interpretacijo pomnoževanja.

### 3.4.3 Sekvenciranje produktov reakcij PCR

Naslednji nivo analize produktov simplex PCR reakcij je bil določitev nukleotidnega zaporedja pomnoženim delom DNA ter pregled in primerjava določenih nukleotidnih zaporedij. Nukleotidno zaporedje smo določevali z metodo sekvenciranja po Sangerju, ki uporablja dideoksi terminatorske nukleotide (ddNTP), vsakega izmed štirih označenega s svojo fluorescentno barvo. Po vgradnji ddNTP se veriga DNA ne pomnožuje več, zato dobimo številne fragmente iste molekule DNA, ki se med sabo, zaradi naključnega vgrajevanja ddNTP, razlikujejo za eno bazo. Sledi ločevanje fragmentov po velikosti s sistemom, ki temelji na metodi kapilarne elektroforeze, ob prehodu posameznega fragmenta mimo detektorja pa se zazna emisija fluorescentnega barvila vgrajenega ddNTP. Fluorescentne oznake ddNTP omogočajo določitev posameznega nukleotida.

V prvi fazи smo očistili produkte PCR. Pripravili smo mešanico encimov za čiščenje za določeno število vzorcev iz ExoI (0,1 µl/vzorec; ThermoScientific), FastAP (0,5 µl/vzorec) ter 1 x pufra PCR (1,4 µl/vzorec), ki smo ga predhodno pripravili z redčenjem 10 x pufra PCR (ABI) v vodi brez nukleaz. V nove PCR tubice smo prenesli po 5 µl produkta PCR vsakega vzorca in dodali 2 µl mešanice za čiščenje. Tubice so premešali in centrifugirali ter prenesli v napravo PCR za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720. Čiščenje je potekalo po sledečem temperaturnem protokolu: delovanje encimov pri 37 °C 45 minut in njihova deaktivacija pri 80 °C 15 minut, ohlajanje 10 °C.

Sledila je priprava sekvenčne reakcije. Pripravili smo dve mešanici za sekvenčno reakcijo, za začetni oligonukleotid »forward« in za začetni oligonukleotid »reverse«. Vsako mešanico smo pripravili za določeno število vzorcev iz 5 x pufra BD (2 µl/vzorec; ABI), raztopine BigDye (0,4 µl/vzorec; ABI), ustreznega začetnega oligonukleotida (0,2 µl/vzorec; uporabili smo enak začetni oligonukleotid, s katerim smo izvedli pomnoževanje PCR vzorca, ki ga želimo sekvencirati) in vode brez nukleaz (3,9 µl/vzorec; IDT). Iz vsake PCR tubice z očiščenim produktom PCR smo prenesli 3,5 µl vzorca v nove PCR tubice. Nato smo k očiščenim produktom v enem setu PCR tubic dodali po 6,5 µl/vzorec mešanice za sekvenciranje z začetnim oligonukleotidom »forward«, v drugi set PCR tubic pa smo dodali po 6,5 µl/vzorec mešanice za sekvenciranje z začetnim oligonukleotidom »reverse«. Tubice smo premešali, centrifugirali in prenesli v dve napravi PCR za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720. Sekvenciranje je potekalo po temperaturnem protokolu: 96 °C 3 minute; 99 ciklov: 96 °C 10 sekund, 50 °C 10 sekund, 60 °C 4 minute; 72 °C 7 minut. Sekvenčna reakcija je tekla čez noč. Naslednji dan smo očistili produkte sekvenčne reakcije. Celotno vsebino tubic smo prenesli v 96-mestno ploščo MicroAmp (Applied Biosystems). K vsakemu vzorcu smo dodali 2,5 µl 125 mM EDTA (Kemika), kratko centrifugirali in dodali še 30 µl 100 % etanola (Merck). Ploščo smo prelepili s samolepilno folijo (Brand) in inkubirali v temni 15 minut. Nato smo ploščo s sekvenciranimi vzorci centrifugirali na najvišji hitrosti (Eppendorf centrifuges 5804/R) pri 4 °C 55 minut. Po koncu centrifugiranja smo odstranili ves etanol ter k posameznemu vzorčku dodali 12 µl formamida (Fermentas), centrifugirali ploščo, jo prelepili s samolepilno folijo, označili in poslali na Oddelek za zootehniko (Groblje 3, Domžale), kjer so na avtomatskem sekvencatorju ABI 3130XL (Applied Biosystems) ločili produkte sekvenciranja vsakega vzorca po velikosti in na podlagi emisije fluorescentnih barvil ddNTP določili nukleotidno zaporedje posameznega produkta PCR. Podatke o sekvencah smo pridobili v obliki kromatogramskih datotek AB1.

### 3.5 OBDELAVA REZULTATOV

#### 3.5.1 Obdelava in interpretacija slik elektroforetskih gelov

Slike vseh gelov smo uvozili v program Microsoft Word, kjer smo slike obdelali ter dopisali številke vzorcev. Sočasno smo v programu Microsoft Excel izdelali tabelo s podatki o vsakem vzorcu (številka vzorca, predvidena vrsta izolata, oznaka izolata, gostiteljska rastlina). Za vsak vzorec oziroma izolat smo pregledali slike vseh 11 simplex reakcij PCR in na podlagi intenzitete elektroforetske črte, če je bila prisotna, ter dolžine produkta PCR (vsak par začetnih oligonukleotidov pomnoži produkt določene karakteristične dolžine) predvideli, za katero vrsto gre. Nato smo ta podatek primerjali s podatkom o vrsti izolata in tako potrdili ali ovrgli določitev vrste z novimi začetnimi oligonukleotidi. Ker so za posamezne vrste rodu *Verticillium* sensu stricto značilni različni

gostiteljski sevi, smo tudi na podlagi te informacije lažje določili in potrdili vrsto izolata, določeno z novimi PCR označevalci (na primer: izolat se je pomnožil v simplex PCR z začetnimi oligonukleotidi PCR označevalca za identifikacijo vrste *V. alfalfa*; gostitelj tega izolata je lucerna; lucerna je gostitelj samo za *V. alfalfa*, torej je izolat vrsta *V. alfalfa*). Nato smo podatek, za katero vrsto pri posameznem izolatu gre, glede na novo taksonomsko razdelitev, vpisali v pripravljeno Excelovo datoteko. Za posamezno simplex reakcijo PCR smo izpisali, pri katerih vzorcih smo pomnožili specifičen produkt, s katerim smo lahko nedvomno identificirali sev in pripravili seznam vzorcev, katerih produkte PCR bomo sekvencirali (sekvencirali bomo vse specifično namnožene produkte PCR).

### **3.5.2 Obdelava nukleotidnih zaporedij regije ITS**

Po sekvenciranju smo pridobili nukleotidna zaporedja v obliki kromatogramskega datoteka AB1. Za vsak vzorec smo pridobili dve datoteki, ena je predstavljala zaporedje določeno z leve strani z začetnim oligonukleotidom »forward«, druga pa zaporedje določeno z desne strani z začetnim oligonukleotidom »reverse«. Datoteke smo uvozili v licenčni programski paket CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). V omenjenem programu smo pregledali vse kromatograme oziroma določena nukleotidna zaporedja in odstranili slabe dele zaporedja. Nato smo sestavili soseske za vsak vzorec z ukazom Assemble, ki združi oba določena zaporedja za posamezen vzorec. Zaporedje soseske smo primerjali s podatkovno zbirkijo NCBI v orodju BLAST (National Library of Medicine), kjer smo na podlagi ujemanja zaporedja z zaporedji v podatkovni zbirkah dobili informacijo, za katero vrsto na podlagi ITS regije gre. Če ujemanje zaporedij ni bilo 100 %, smo pregledali sošesko ter popravili morebitne napake v zaporedju. V pripravljeno Excelovo datoteko smo dopisali, kot katero vrsto smo identificirali posamezen vzorec (izolat) po primerjavi s podatkovno zbirkijo NCBI. Nato smo vse sošeske oziroma zaporedja izvozili v datoteke formata FASTA za nadaljnjo filogenetsko analizo.

### **3.5.3 Filogenetska analiza**

Analizo homologije oziroma podobnosti med nukleotidnimi zaporedji regije ITS vseh izolatov smo izvedli z licenčnim programskim paketom CLC Genomic Workbench (CLC;Qiagen), ki omogoča primerjavo in poravnavo nukleotidnih zaporedij ter izdelavo filogenetskih dreves z različnimi izbranimi algoritmi. Nukleotidna zaporedja v formatu FASTA smo uvozili v program CLC, kjer smo poravnali zaporedja z algoritmom Muscle, ki omogoča hkratno poravnavo več zaporedij (Edgar, 2004) z merjenjem razdalj med nukleotidi različnih zaporedij. Poravnana zaporedja smo pregledali in jih skrajšali na enake dolžine. Nato smo iz vseh zaporedij izdelali filogenetsko drevo največjega verjetja (angl. Maximum likelihood, ML) z metodo združevanja Neighbor Joining (NJ) ter modelom Kimura80. Iz vsake skupine smo izbrali po eno reprezentativno nukleotidno zaporedje (skupaj smo izbrali 13 zaporedij, ki so bila med sabo različna in predstavljajo regijo ITS

pri posamezni vrsti iz rodu *Verticillium* sensu stricto ter regijo ITS pri vrsti *V. nigrescens*, ki je v novi klasifikaciji premeščena v rod *Gibellulopsis*). Izbrana zaporedja smo ponovno poravnali z algoritmom Muscle ter izdelali filogenetsko drevo, ki smo ga koreninili/orientirali (rooting) glede na nukleotidno zaporedje *G. nigrescens* 1.

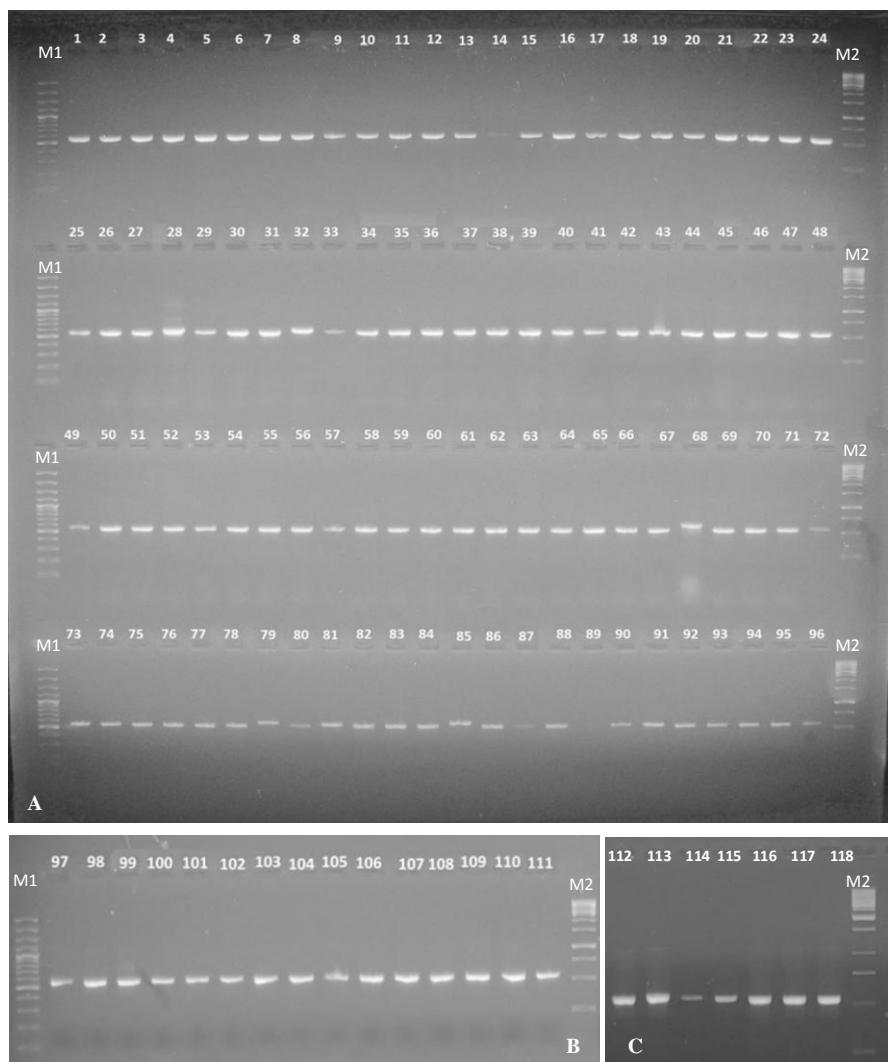
### **3.5.4 Obdelava nukleotidnih zaporedij produktov simplex reakcij PCR z novimi začetnimi oligonukleotidi**

Enako, kakor pri obdelavi kromatogramskih datotek nukleotidnih zaporedij regije ITS, smo kromatogramske datoteke AB1 določenih nukleotidnih zaporedij specifičnih produktov simplex reakcij PCR uvozili v program CodonCode ter pregledali zaporedja in jih združili v soseske. Nato smo v skupine združili soseske vzorcev, ki predstavljajo izolate, ki spadajo v isto vrsto. Sledila je primerjava sosek znotraj posamezne skupine (ukaz Compare Contigs), s čimer smo želeli pregledati, ali se pojavljajo razlike v nukleotidnem zaporedju lokusa med predstavniki iste vrste in ali se zaradi tega vrste delijo na podskupine. Nato smo razlike v nukleotidnem zaporedju interpretirali v kombinaciji z gostiteljskimi sevi ter geografskim območjem posameznega izolata, s čimer smo želeli ugotoviti, ali so razlike v nukleotidnem zaporedju znotraj skupine posledica specializacije izolata na dano okolje.

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 ANALIZA REGIJE ITS

V prvem delu naloge smo preverili kvaliteto genomske DNA izolatov *Verticillium*, ki je bila dostopna na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin ter kvaliteto novo izolirane DNA iz micelija sedmih izolatov. V reakciji PCR smo skušali pomnožili regijo ITS iz cistrona rRNK z začetnima oligonukleotidoma ITS 1 in ITS 4 pri vseh 118 vzorcih.



Slika 4: Agarozni geli; produkti PCR so nastali s pomnožitvijo regije ITS z začetnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4; A – gel s produkti PCR vzorcev od 1 do 96; B – manjši gel s produkti PCR vzorcev od 97 do 111; C – gel s produkti PCR novo izolirane DNA vzorcev od 112 do 118, kjer je bila regija ITS vzorca 114 pomnožena iz neredčene DNA; M1 – dolžinski standard 100 bp; M2 – dolžinski standard 1kbp.

Slika 4 prikazuje črte na agaroznem gelu, ki predstavljajo regijo ITS, ki smo jo z izbranimi začetnima oligonukleotidoma pomnožili pri vseh vzorcih. Uspešna pomnožitev regije ITS pomeni, da imamo kvalitetno, nerazgrajeno DNA, ki jo lahko uporabimo v nadaljnji analizi. Pri nekaterih vzorcih je intenziteta produkta PCR slabša, zaradi manjšega števila kopij DNA, kar je posledica nižje koncentracije DNA v izhodišnjem vzorcu. Slednje je opazno predvsem pri vzorcu 114, kjer smo, zaradi zelo nizke koncentracije DNA po izolaciji, reakcijo PCR izvedli na neredčeni DNA iz izhodiščnega vzorca. Regijo ITS smo pomnožili tudi iz novo izolirane DNA, zato sklepamo, da je bila izolacija uspešna in da novi vzorci (vzorci 112, 113, 114, 115, 116, 117 in 118) vsebujejo kvalitetno DNA.

Produkti PCR so dolžine okoli 500 – 600 bp, kar je po pregledu literature v skladu s pričakovano dolžino regije ITS pri rodu *Verticillium* sensu stricto (Bidocha in sod. 1999; Collopy in sod., 2002). Med produkti PCR različnih vzorcev je opazen dolžinski polimorfizem, ki nakazuje na dolžinske razlike v regiji ITS pri različnih izolatih. Tovrstni polimorfizem oziroma razlike v regiji ITS so lahko posledica diferenciacije rodu v različne vrste, zato smo v naslednjem koraku sekvencirali produkte PCR oziroma pomnožene regije ITS vseh vzorcev ter izvedli filogenetsko analizo za določitev sorodnosti med vzorci.

#### 4.2 ANALIZA PRODUKTOV PCR, POMNOŽENIH Z NOVIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI IN ANALIZA MARKERJEV SCAR

V drugem delu naloge smo z novimi PCR označevalci v simplex in multiplex reakcijah PCR skušali identificirati slovenske in tuje izolate. Prav tako smo na DNA vseh izolatov izvedli pomnoževanje markerja SCAR6-2, ki pomnoži odsek DNA, značilen samo za hmeljev letalni patotip. Na ta način bi dobili celostno informacijo, ali je marker prisoten tudi pri izolatih izoliranih iz drugih gostiteljskih rastlin in v katero vrsto in patotip spada posamezen izolat, vključen v analizo. Po pregledu slik elektroforetskih gelov (Priloga 1) simplex in multiplex reakcij PCR smo informacijo, za katero vrsto pri posameznem izolatu gre, vpisali v izdelano preglednico v Excelov dokument, kamor smo dopisali tudi, ali se je namnožil DNA fragment specifičen za letalni patotip PG2 glive *V. albo-atrum* (Preglednica 14). Po posvetu z dr. Sebastjanom Radiškom z IHPS smo preimenovali nekaj izolatov ter iz seznama izločili izolate, ki so se dvakrat pojavili med vzorci in izolate, ki so bili najverjetneje posledica okužbe vzorcev v genski banki. Izolate, ki so posledica okužbe v zbirki škodljivih organizmov, smo prav tako izločili iz nadaljnje analize (Preglednica 15).

Preglednica 14: Novi podatki o vrsti izolata *Verticillium* sensu stricto, pridobljeni s tremi pristopi identifikacije, to je z novimi PCR začetnimi oligonukleotidi, s filogenetsko analizo in primerjavo zaporedja regije ITS s podatkovno zbirko NCBI<sup>1</sup>

Št. vzorca	Oznaka izolata	Gostitelj	Vrsta (morphološka identifikacija)	Vrsta (identifikacija z novimi PCR označevalci)	Vrsta (identifikacija glede na podatkovno zbirko NCBI)	Vrsta (identifikacija glede na filogenetsko analizo)	Patotip (identifik- acija z markerjem SCAR6_2)
46	CBS 102.464	artičoka	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alboatrum</i>	<i>V. albo-atrum</i> sev VICVaal	<i>V. albo-atrum</i>	/
49	CBS 682.88	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alboatrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	/
95	110	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alboatrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	/
111	PD693	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alboatrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	/
98	166	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	/
100	112	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	/
58	Luc	lucerna	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	letalni
59	41	lucerna	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	letalni
60	CBS 392.91	lucerna	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	letalni
61	107	lucerna	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	letalni
64	Kanada 11	lucerna	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. alfafae</i>	letalni
24	CIG3	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	letalni
65	JKG 2	catalpa	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum/</i> <i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
66	JKG1	krompir	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum/</i> <i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
67	JKG 8	krompir	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum/</i> <i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
69	DJK	krizantema	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
70	MAI	krizantema	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
71	Mint	meta	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
72	GAJ09	hmelj	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
73	PDRENU/MAR	hmelj	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
74	CasD	hmelj	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
75	KresD	hmelj	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
76	MoD	hmelj	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	letalni
78	Oset	hmelj	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
80	12042	hmelj	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
81	PAPmb	paprika	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>Gibellulopsis</i> <i>nigrescens</i> <i>strain BM-1</i>	<i>G. nigrescens</i>	/
82	PAP	paprika	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
83	Pap99	paprika	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
84	Pap2008	paprika	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	letalni
94	14	olive	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae sev</i> <i>Le1344</i>	<i>V. dahliae</i>	/
96	141	olive	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
97	3V	olive	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
99	802-1	olive	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	Slabo zaporedje	/
105	V 138 I	bombaž	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	letalni
106	V 176 I	bombaž	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae sev</i> <i>Le1344</i>	<i>V. dahliae</i>	/
109	PD335	meta	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	/
110	PD584	zelje	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. dahliae</i>	/
116	A III 25	cvetača	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	letalni
118	PD337	bombaž	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. dahliae</i>	letalni
88	JKG 20	lipa	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. isaacii</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. isaacii</i>	/
93	115	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. isaacii</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. isaacii</i>	/

»se nadaljuje«

<sup>1</sup> / - pomeni, da se DNA ni pomnožila v simplex in multiplex reakcijah PCR

»nadaljevanje preglednice 14: Novi podatki o vrsti izolata *Verticillium* sensu stricto, pridobljeni s tremi pristopi identifikacije, to je z novimi PCR začetnimi oligonukleotidi, s filogenetsko analizo in primerjavo zaporedja regije ITS s podatkovno zbirkovo NCBI

Št. vzorca	Oznaka izolata	Gostitelj	Vrsta (morphološka identifikacija)	Vrsta (identifikacija z novimi PCR označevalci)	Vrsta (identifikacija glede na podatkovno zbirkovo NCBI)	Vrsta (identifikacija glede na filogenetsko analizo)	Patotip (identifikacija z markerjem SCAR6_2)
115	EX5 F8	tla	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. isaaci</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. isaaci</i>	/
92	CBS110218	brassica napus	<i>V. longisporum</i>	<i>V. longisporum AI/DI</i>	<i>V. dahliae var. longisporum</i>	<i>V. longisporum</i>	letalni
108	PD330	zelje	<i>V. longisporum</i>	<i>V. longisporum AI/DI</i>	<i>V. longisporum</i>	<i>V. longisporum</i>	letalni
1	P10	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
2	P114/1	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
3	P34/1	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
4	P15	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
6	P83	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
7	6/99	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
8	14/93	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
9	15/98	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
12	T2	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
13	TABOR 6	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
15	Ciz/DED	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
16	BIZ	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
19	MO 3	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
20	OCer	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
21	zup	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
22	Rec91	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
23	KRES 98	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
25	1985a	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
26	11041	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
27	11055	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
28	11047	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	Slabo zaporedje	letalni
30	11100	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
31	1974	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
34	298101	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
35	298102	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
37	1953	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
38	298092	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
39	298095	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
40	Sol	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
43	Surf	surfinija	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
45	11081	kizantema	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
50	11066	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
51	T 179	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	
52	CBS 321.91	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
53	AR01/067	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
54	AR0/140	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
55	AR01/JS1	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni
56	PD 83/53a	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
57	PD 2000/4186a	paradižnik	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
62	314193	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
112	SN 10	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
86	CBS 456.51	krompir	<i>V. nubilum</i>	<i>V. nubilum</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nubilum</i>	/
87	CBS 227.84	krompir	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. tricorpus</i>	/
114	EX5 F7	tla	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. tricorpus</i>	/
10	P84/2	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	/
14	KV11 URŠIČ	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfalfae</i>	letalni

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 14: Novi podatki o vrsti izolata *Verticillium* sensu stricto, pridobljeni s tremi pristopi identifikacije, to je z novimi PCR začetnimi oligonukleotidi, s filogenetsko analizo in primerjavo zaporedja regije ITS s podatkovno zbirko NCBI

Št. vzorca	Oznaka izolata	Gostitelj	Vrsta (morphološka identifikacija)	Vrsta (identifikacija z novimi PCR označevalci)	Vrsta (identifikacija glede na podatkovno zbirko NCBI)	Vrsta (identifikacija glede na filogenetsko analizo)	Patotip (identifikacija z markerjem SCAR6_2)
17	VranBis09	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	letalni
18	Sent4	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	letalni
29	11097	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	letalni
33	298100	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	/
41	CBS 393.91	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	/
42	kum	kumare	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	/
44	11077	rogovilček	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	letalni
48	CBS 454.51	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	/
63	340646	krompir	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	/
91	CBS 123.176	izolacijska volna	<i>V. nigrescens</i>	/	<i>Unknown Verticillium</i>	<i>G. nigrescens</i>	/
107	PETROL	hmelj	<i>V. albo-atrum</i>	/	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. nonalfafae</i>	letalni

Preglednica 15: Seznam izolatov, izločenih iz analize z novimi začetnimi oligonukleotidi

Št. vzorca	Oznaka izolata	Vzrok za izločitev
5	P55	Okužba v zbirki škodljivih organizmov ali napaka pri vzorčenju
11	16/00	Okužba v zbirki škodljivih organizmov ali napaka pri vzorčenju
32	298099	Okužba v zbirki škodljivih organizmov; glede na regijo ITS gre za <i>Sarocladium</i>
36	11052	Okužba v zbirki škodljivih organizmov ali napaka pri vzorčenju
68	A56	Okužba v zbirki škodljivih organizmov; glede na regijo ITS gre za <i>Debaromyces</i>
77	Ledina09	Rezultati značilni za dve vrsti; okužba kulture z drugo vrsto
79	12099	Okužba v zbirki škodljivih organizmov; glede na regijo ITS gre za <i>Paecilomyces</i>
85	CBS 171.80	Gre za <i>V. fungicola</i> , ki ne spada v rod <i>Verticillium</i> sensu stricto
89	CBS 122.175	Gre za <i>V. lecanii</i> , ki ne spada v rod <i>Verticillium</i> sensu stricto
90	B 560	Gre za <i>V. lecanii</i> , ki ne spada v rod <i>Verticillium</i> sensu stricto
91	CBS 123.176	Gre za <i>V. nigrescens</i> , premeščen v rod <i>Gibellulopsis</i>
113	ČEH	Nepravilna morfološka identifikacija; glede na regijo ITS gre za glivo iz rodu <i>Acremonium</i>
117	B 23	Okužba v zbirki škodljivih organizmov ali napaka pri vzorčenju

Z novimi začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje PCR označevalcev, specifičnih za posamezno vrsto *Verticillium* sensu stricto, smo lahko identificirali 89 izolatov. DNA 12 izolatov nismo uspeli pomnožiti dovolj učinkovito s simplex ali multiplex reakcijami PCR, da bi lahko na podlagi elektroforetske črte identificirali vrsto. Med izolati, zajetimi v analizo, ni bilo prisotnih predstavnikov vrst *V. klebahnii* in *V. zaregamsianum*.

Inderbitzin in sod. (2013) so izdelane začetne oligonukleotide za simplex in multiplex reakcije PCR validirali s pomnoževanjem DNA tarčnih izolatov in ustreznih negativnih kontrol glede na sorodnost med vrstami (negativna kontrola za *V. albo-atrum* je *V. nubilum*; za *V. alfalfaefae* je *V. nonalfalfaefae*; za *V. dahliae* in *V. longisporum* so *V. albo-atrum*, *V. alfalfaefae*, *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. nonalfalfaefae*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* in *V. zaregamsianum*; za *V. isaacii* sta *V. klebahnii* in *V. tricorpus*; za *V. klebahnii* je *V. isaacii*; za *V. nonalfalfaefae* je *V. alfalfaefae*; za *V. nubilum* je *V. nonalfalfaefae*; za *V. tricorpus* so *V. albo-atrum*, *V. alfalfaefae*, *V. dahliae*, *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. longisporum*, *V. nonalfalfaefae*, *V. nubilum*, in *V. zaregamsianum*; za *V. zaregamsianum* je *V. tricorpus*). Pri pregledu slik elektroforetskih gelov (Priloga 1) smo za posamezno simplex reakcijo PCR pregledali, ali smo dobili produkte PCR pri ustreznih negativnih kontrolah. Ugotavljamo, da se rezultati analize ujemajo s pričakovanimi rezultati posamezne simplex reakcije PCR, ki so jo validirali Inderbitzin in sod. (2013), saj v analizi izolatov pri simplex reakcijah PCR nismo pomnožili negativne kontrole za posamezen test. Zato lahko potrdimo primernost in uporabnost izdelanih začetnih oligonukleotidov za identifikacijo in diferenciacijo vrst *Verticillium* sensu stricto.

Izolati so bili pred molekularnimi analizami identificirani na podlagi morfoloških značilnosti gliv (Preglednica 4 – Morfološka identifikacija), ki jih vidimo, ko glivo namnožimo v čisti kulturi na ustremnem trdnem gojišču. Tovrstne metode identifikacije temeljijo na mikroskopskem pregledu mikrosklerocija ali temno obarvanega micelija (Platt in Mahuku, 2000). Identifikacija z novimi začetnimi oligonukleotidi je omogočila razlikovanje na molekularnem nivoju, zaradi česar smo določene izolate uvrstili v druge vrste rodu *Verticillium* sensu stricto.

Vzorci od 1 do 40 ter vzorec 112 predstavljajo izolate, izolirane iz okuženega hmelja. Predhodno so bili vsi izolati identificirani kot *V. albo-atrum* (Preglednica 4), z novimi PCR označevalci in glede na novo filogenetsko razvrstitev (Inderbitzin in sod., 2011) pa smo večino teh izolatov uvrstili v vrsto *V. nonalfalfaefae*, ki večinoma okužuje hmelj (Inderbitzin in sod., 2011). To je v skladu s pričakovanji, saj je vrsta *V. albo-atrum* daljni sorodnik vrste *V. nonalfalfaefae* in ta izhaja iz skupine Grp I vrste *V. albo-atrum*. Obe vrsti imata zelo podobne morfološke značilnosti glede na opise značilnosti posamezne vrste iz rodu *Verticillium* sensu stricto (Inderbitzin in sod., 2011). Zaradi tega sta vrsti glede na morfologijo zelo slabo razločljivi, kar je vzrok, da so bili izolati *V. nonalfalfaefae* po stari taksonomski razvrstitvi morfološko identificirani kot *V. albo-atrum*. Izolat vzorca 24 je z novimi PCR označevalci identificiran kot *V. dahliae*, kar nakazuje na napačno identifikacijo izolata s tradicionalnimi metodami. Kot *V. nonalfalfaefae* smo z novimi PCR označevalci identificirali tudi vzorce 43, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 in 62. Gre za izolate iz surfinije, krizanteme, paradižnika in krompirja.

Vsi izolati, ki so bili izolirani iz okuženih rastlin lucerne (vzorci 58, 59, 60, 61, 64), so bili glede na novo filogenetsko razvrstitev z novimi PCR označevalci identificirani kot *V. alfalfa*, kar je v skladu s pričakovanji, saj vrsta *V. alfalfa* okužuje zgolj rastline lucerne (Inderbitzin in sod., 2011). Tudi ti izolati so bili glede na staro filogenetsko razvrstitev (Isaac, 1949, cit. po Radišek in Javornik, 2011; Gams in Van Zaayen, 1982, cit. po Radišek in Javornik, 2011) identificirani kot *V. albo-atrum*, saj tudi vrsta *V. alfalfa* izhaja iz skupine Grp I.

Vzorci od 65 do 84 ter vzorci 94, 96, 97, 99, 105, 106, 109, 110, 116 in 118 predstavljajo izolate, ki so bili glede na morfološke značilnosti predhodno identificirani kot *V. dahliae*. Identifikacija z novimi PCR označevalci je potrdila, da gre za izolate iz te vrste, saj smo pri vseh vzorcih pomnožili PCR označevalc, specifičen za vrsto *V. dahliae* (Priloga 1, Preglednica 14). Vzorce 68, 77 in 79, ki smo jih v podatkovni zbirki NCBI glede na regijo ITS identificirali kot predstavnike drugih rodov (Preglednica 15) in za katere smo predvidevali, da so posledica okužb v zbirki, smo izključili iz nadaljnje analize. Preostale izolate pa smo v podatkovni zbirki NCBI identificirali kot *V. dahliae* (Priloga 3, vzorci 69, 72, 80, 83, 84, 94, 96, 106, 109 in 116), *V. longisporum* (Priloga 3, vzorec 97) ali pa kot *V. dahliae* in *V. longisporum* (Priloga 3, vzorci 65, 66, 67, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 78, 82, 105, 110 in 118). Ugotavljamo, da na podlagi regije ITS in primerjave v podatkovni zbirki NCBI nismo razločevali med vrstama *V. dahliae* in *V. longisporum*, saj smo pri določenih vzorcih z enako verjetnostjo določili obe vrsti. Identifikacija omenjenih vrst na osnovi primerjave ITS regij v podatkovni zbirki NCBI torej ne zagotavlja zanesljivih rezultatov.

Kot vrsto *V. longisporum* smo z novimi PCR označevalci v simplex in multiplex PCR reakcijah identificirana le dva izolata (vzorec 92 in vzorec 108), oba predstavnika linije A1/D1, za ostale izolate (Preglednica 17; vzorci 65, 66, 67, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 78, 82, 97, 105, 110) pa smo z novimi PCR označevalci v multiplex PCR reakciji potrdili, da so predstavniki vrste *V. dahliae*. Od obeh izolatov, ki smo ju s PCR označevalci identificirali kot *V. longisporum* A1/D1, je bil v podatkovni zbirki NCBI glede na regijo ITS vzorec 92 identificiran kot *V. dahliae* var. *longisporum*, vzorec 108 pa kot *V. longisporum* izolat SDV2066 in pri teh dveh izolatih nismo prejeli dvojnega zadetka z enako verjetnostjo za vrsti *V. longisporum* in *V. dahliae*, ker vrsta *V. dahliae* starševska linija linije *V. longisporum* A1/D1. Linijo *V. longisporum* A1/D1 smo identificirali s PCR označevalci za Vrst A1 in Vrst D1, ki sta starša te linije. Multiplex test PCR za identifikacijo in razločitev vrst *V. dahliae* in treh linij *V. longisporum* so Inderbitzin in sod. (2013) razvili zato, ker vrste *V. longisporum* oziroma vseh treh linij *V. longisporum* ni mogoče identificirati in razlikovati od *V. dahliae* s simplex testi PCR. Na podlagi rezultatov analize (Priloga 1, Preglednica 14) ugotavljamo, da multiplex reakcija PCR, zasnovana v študiji Inderbitzna in sod. (2013), omogoča jasno identifikacijo vrste *V. longisporum* in razločitev linije *V. longisporum* A1/D1, ker lahko na podlagi števila elektroforetskih lis in dolžine produkta PCR razločimo posamezne linije.

Produkt PCR simplex reakcije za identifikacijo vrste *V. dahliae* je bil pri izolatu PapMB šibkejši. Pri tem izolatu smo z ostalimi analizami (rezultati analiz podani v nadaljevanju) odkrili, da gre za drugo vrsto, to je *G. nigrescens*, predhodno *V. nigrescens* (vrsta po novi taksonomski razvrstitevi ter filogenetskih analizah premeščena v rod *Gibellulopsis* (Zare in sod., 2007; Inderbitzin in sod., 2011). To pomeni, da identifikacija z novimi začetnimi oligonukleotidi ni popolnoma zanesljiva in lahko privede do napačnih sklepov. Iz tega lahko sklepamo, da začetni oligonukleotidi za identifikacijo vrste *V. dahliae* (Df in Dr), izdelani v regiji ITS, niso popolnoma specifični za to vrsto in bi bilo potrebno pregledati zaporedja obeh začetnih oligonukleotidov, ju preveriti v zaporedju regije ITS pri obeh vrstah ter po možnosti izdelati nove, bolj specifične začetne oligonukleotide, ki bi omogočili razlikovanje teh dveh vrst. Tezo lahko potrdimo, saj smo z začetnimi oligonukleotidi pomnožili PCR označevalce za identifikacijo *V. dahliae* tudi pri izolatu CBS 123.176 (Priloga 1, vzorec 91), ki je bil že predhodno identificiran kot *V. nigrescens* (sedaj *G. nigrescens*) in smo s filogenetsko analizo regije ITS njegovo identiteto tudi potrdili.

Z analizo novih PCR označevalcev smo identificirali dva izolata, ki sta predstavnika vrste *V. tricorpus* (Preglednica 14). Identifikacija je skladna s predhodno morfološko identifikacijo (Preglednica 4). Iz vrste *V. tricorpus* izhaja vrsta *V. isaacii*, ki je morfološko nerazločljiva od vrste *V. tricorpus* (Inderbitzin in sod., 2011). Z novimi PCR označevalci smo med vsemi izolati identificirali tri predstavnike vrste *V. isaacii* (Preglednica 14). Izolata JKG 20 in EX5 F8 sta bila predhodno morfološko identificirana kot *V. tricorpus*, kar je v skladu s pričakovanji predhodnih študij (Inderbitzin in sod., 2011, 2013). Izolat 115 pa je bil glede na morfološke značilnosti identificiran kot *V. albo-atrum* (Preglednica 4). Zmotna morfološka identifikacija je najverjetneje posledica gostiteljske rastline (krompir, značilen gostitelj vrste *V. albo-atrum* (Inderbitzin in sod., 2011), od koder je bil izolat izoliran, ter podobne morfologije vrst *V. isaacii* in *V. albo-atrum*, ki oba tvorita rjavu obarvan trajni micelij in mikrosklerocij ter rumeno pigmentirane hife (Inderbitzin in sod., 2011).

Med izolati, zajetimi v analizo, smo z novimi PCR označevalci identificirali šest izolatov kot predstavnike vrste *V. albo-atrum*, ki je sedaj ime za vrsto, ki izhaja iz Grp 2 predhodne vrste *V. albo-atrum* (Robb in sod., 1993). Rezultati za te izolate (vzorci 46, 49, 95, 98, 100 in 111) so skladni s predhodno morfološko identifikacijo (Preglednica 14). Glede na novo filogenetsko razvrstitev (Inderbitzin in sod., 2011) vrsta *V. albo-atrum* okužuje predvsem rastline krompirja. To lahko potrdimo pri štirih izolatih (vzorci 49, 95, 98 in 100), ki so bili izolirani iz okuženih sadik krompirja. Preostala dva izolata sta bila izolirana iz sadike artičoke in paradižnika. Izolat CBS 102.464 iz artičoke se od ostalih razlikuje v zaporedju regije ITS.

Marker SCAR6-2 specifičen za letalni patotip PG2 glice *V. albo-atrum* smo pomnožili pri 42 izolatih, uvrščenih v različne vrste rodu *Verticillium* sensu stricto (Preglednica 14) in sicer pri vrstah *V. alfalfa*, *V. nonalfalfa*, *V. dahliae* in *V. longisporum*. Pri preostalih vzorcih markerja nismo pomnožili. Prisotnost markerja SCAR je potrdila, da gre pri izolatih iz različnih gostiteljskih rastlin, predhodno določenih kot letalni patotip, nedvomno za letalni patotip, razen pri izolatih P55, 16/00 in 11052, pri katerih smo na osnovi te analize odkrili, da gre verjetno za zamenjavo oziroma okužbo vzorca, ki se hrani v zbirkri škodljivih organizmov in smo jih zato izločili iz analize. Tako nam omenjeni marker lahko služi tudi za nedvoumno identifikacijo izolatov glice znotraj posamezne vrste *Verticillium* sensu stricto glede na njihovo virulenco.

Marker SCAR smo pomnožili tako pri vrstah *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*, saj oba izhajata iz *V. albo-atrum*, ki je bila modelna vrsta za razvoj markerja SCAR6-2 (Radišek in sod., 2006). Čeprav je bil marker SCAR6-2 razvit na podlagi fragmenta AFLP pri vrsti *V. albo-atrum* (Radišek in sod., 2006), smo marker specifično in zanesljivo pomnožili tudi pri predhodno določenih visoko virulentnih izolatih drugih vrst (*V. dahliae*, *V. longisporum*; Preglednica 4), kar nakazuje na prisotnost ohranjenih specifičnih delov DNA med visoko virulentnimi izolati rodu *Verticillium* sensu stricto. Marker SCAR6-2 tako ohranja specifičnost za letalni patotip in se pomnoži pri zelo virulentnih izolatih ne glede gostitelja, ker se je namnožil tudi pri zelo virulentnem oziroma »defoliating« izolatu *V. dahliae* (Preglednica 14, vzorec 105), medtem ko se pri manj virulentnem oziroma »non-defoliating« izolatu *V. dahliae* ni pomnožil (Preglednica 14, vzorec 106). Slika elektroforetskega gela je prikazana v prilogi 2.

#### 4.3 FILOGENETSKA ANALIZA REGIJE ITS

V tretjem delu analize smo pomnoženim regijam ITS pri vseh izolatih določili nukleotidno zaporedje ter pridobili podatke o sekvenkah, ki smo jih pretvorili v format FASTA in uporabili v filogenetski analizi s programsko opremo CLC. Izdelali smo poravnavo in filogenetsko drevo iz reprezentativnih nukleotidnih zaporedij regije ITS za vse vrste *Verticillium* sensu stricto, ki smo jih identificirali v naši zbirkri izolatov, ter vrsto *Gibellulopsis nigrescens* (prej poimenovano *V. nigrescens*). Prav tako smo nukleotidna zaporedja vseh vzorcev primerjali s podatkovno zbirko NCBI z orodjem BLAST in preverili, za katero vrsto glede na podatkovno zbirko gre. Na ta način smo identificirali vrste izolatov še z drugim pristopom ter naredili primerjavo in ovrednotili rezultate identifikacije z novimi PCR označevalci.

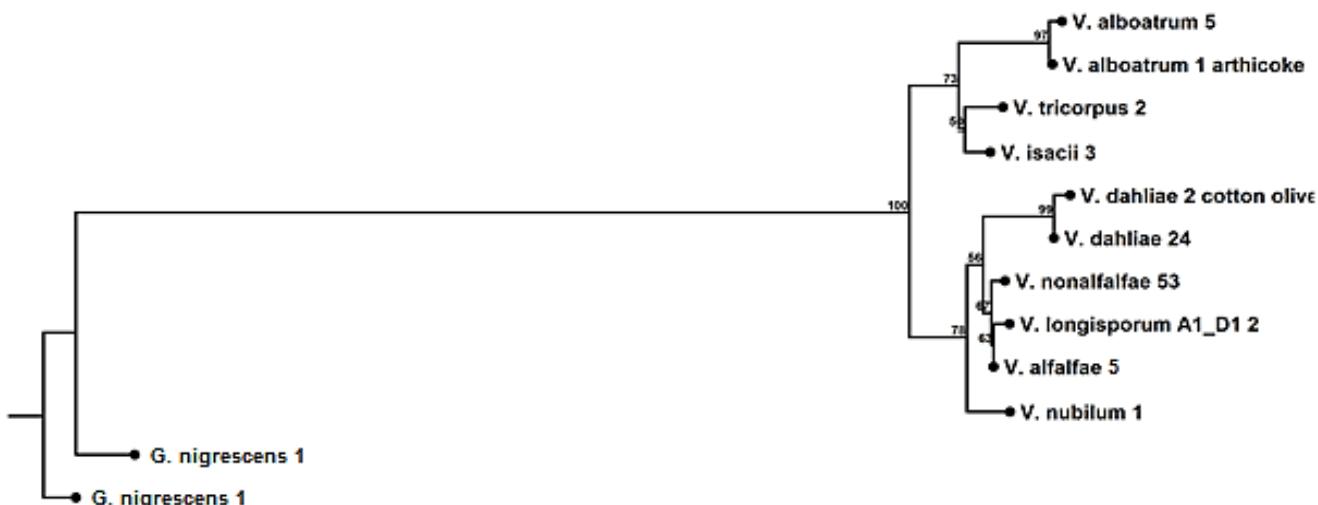
Prvi korak v analizi je bil pregled in ureditev vseh zaporedij v programu CodonCode Aligner. Ker nismo uspeli pridobiti kvalitetnega zaporedja regije ITS, smo iz analize izključili izolata 11047 in 802-1. Urejeno zaporedje vsakega izolata smo primerjali s podatkovno zbirkovo NCBI in podatek o identifikaciji vrste zapisali v preglednico v Excelovem dokumentu (Priloga 3, Preglednica 14). Vrste rodu *Verticillium* v podatkovni zbirkovi še niso poimenovane glede na novo taksonomsko razvrstitev, zato smo vrste lahko identificirali samo glede na staro taksonomsko razporeditev in sicer kot *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. longisporum* ali *V. tricorpus*. Za večino izolatov se identifikacija glede na morfološke značilnosti ujema z identifikacijo glede na podatkovno zbirkovo NCBI. Pri vzorcu 24, to je izolat CIG3, pa je verjetno prišlo do napačne morfološke identifikacije, kjer je bil izolat morfološko identificiral kot *V. albo-atrum*, medtem, ko je bil na molekularnem nivoju z novimi PCR označevalci in filogenetsko analizo identificiran kot *V. dahliae*.

Pri večini izolatov vrste *V. dahliae* smo po primerjavi zaporedja regije ITS s podatkovno zbirkovo NCBI prejemali zadetke o sto-odstotnem ujemanju zaporedja z vrsto *V. dahliae*, kot tudi z vrsto *V. longisporum* (Priloga 3). Na osnovi filogenetske analize in identifikacije z novimi PCR označevalci smo kot *V. longisporum* določili dva izolata (vzorec 92 in vzorec 108), ostali izolati pa so bili identificirani kot vrsta *V. dahliae*. Do zmede v podatkovni zbirkovi najverjetnejše prihaja zaradi dejstva, da so linije *V. dahliae* starši linij *V. longisporum* (Inderbitzin in sod., 2011, 2013). Zato imajo linije *V. longisporum* zaporedje DNA regije ITS identično ali zelo podobno (eden ali nekaj SNP v zaporedju regije ITS med vrstama *V. dahliae* in *V. longisporum*), kot vrsta *V. dahliae* in lahko pri takih zaporedjih dobimo dobro ujemanje z dvema zaporednjema v podatkovni zbirkovi NCBI.

Nato je sledila poravnava zaporedij regije ITS ter izdelava filogenetskega drevesa v programu CLC. V prvo poravnavo smo vključili nukleotidna zaporedja regije ITS vseh izolatov, katerih kvalitetna zaporedja smo pridobili s sekvenciranjem po Sangerjevi metodi. V poravnavo nismo vključili zaporedij izolatov 11047 in 802-1, ker s sekvenciranjem nismo uspeli pridobiti kvalitetnih zaporedij. Prav tako v poravnavo nismo vključili že prej izločenih izolatov, ki so posledica okužb v zbirkovi škodljivih organizmov. Na podlagi poravnave smo izdelali filogenetsko drevo. V filogenetskem drevesu je bilo opaženo združevanje izolatov v več skupin oziroma vej, ki so dobro podprtia z visokimi bootstrap vrednostmi. Pregledali smo poravnana zaporedja izolatov z ozirom na združene skupine in odkrili sto-odstotno identičnost zaporedij regije ITS znotraj skupin, medtem, ko smo v zaporedjih med skupinami odkrili več SNP, delecij in insercij nukleotidov. V nadaljevanju smo preverili identiteto posameznih izolatov, določeno z novimi začetnimi oligonukleotidi, ter ugotovili, da skupine na filogenetskem drevesu predstavljajo različne vrste iz rodu *Verticillium* sensu stricto. Glede na to ugotovitev smo iz vsake skupine zaporedij oziroma vrste rodu *Verticillium* sensu stricto izbrali eno najdaljše reprezentativno nukleotidno zaporedje, ki smo ga uporabili v končni filogenetski analizi.



Slika 5: Poravnavo reprezentativnih zaporedij vrst iz rodu *Verticillium* sensu stricto ter zaporedij vrste *V. nigrescens*, premešcene v druga rodova; številke ob imenu vrste nakazujejo na število zaporedij, ki so bila med sabo identična in predstavljajo posamezno skupino.



Slika 6: Filogenetsko drevo, izdelano iz reprezentativnih zaporedij vseh med sabo različnih skupin zaporedij, ki predstavljajo različne vrste iz rodu *Verticillium* sensu stricto in vrste, razdeljene na podskupine; vključeni sta zaporedji dveh predstavnikov vrste *G. nigrescens*.

Preglednica 16: Opredelitev izolatov, ki pripadajo posamezni skupini na filogenetskem drevesu in imajo enako nukleotidno zaporedje regije ITS

Oznaka skupine	Pripadajoči izolati z enakim nukleotidnim zaporedjem regije ITS
V. alboatrume 5	110, 112, 166, PD693, CBS 682.88
V. alboatrume arthicoke 1	CBS 102.464
V. isaci 3	115, EX5 F8, JKG 20
V. tricorpus 2	EX5 F7, CBS 227.84
V. dahliae 2 cotton olive	14, V-176 I
V. dahliae 24	AIII25, PD337, JKG2, Mint, KresD, CasD, CIG3, 3V, V-138 I, Pap99, Pap2008, PDRENU, PD584, PD335, PAP, Oset, MoD, MAI, JKG8, JKG1, GAJ09, DJK, 141, 12042
V. nonalfalfa 53	340646, 314139, 298101, 298102, 298100, 298092, 1985a, 15/99, 11097, 11081, 11077, 11066, 11055, 11041, P10, P114/1, KRES98, 1953, 14/93, KV11, Zup, VranBis09, T-179, TABOR6, T2, Surf, Sol, Sent04, Rec91, PETROL, PD83/53a, P84/2, P34/1, P15, OCer, MO 3, PD2000/4186a, Kum, Ciz, CBS 454.51, CBS 393.91, CBS 321.91, BIZ, AR0/140, AR01/JS1, AR01/067
V. longisporum A1_D1 2	PD330, CBS 110.218
V. alfalfa 5	Luc, Kanada11, 107, 41, CBS 392.91
V. nubilum 1	CBS 456.51
G. nigrescens 1	PapMB
G. nigrescens 1	CBS 123.176

V končno poravnavo (Slika 5) smo vključili vsa reprezentativna zaporedja, ki smo jih poimenovali glede na vrsto in za imenom vrste dodali še število identičnih zaporedij (na primer *V. nonalfalfa*e 53) ter dve zaporedji vrste *V. nigrescens*, ki je po novi taksonomski razvrstitvi premeščena v rod *Gibellulopsis*. Na podlagi poravnave smo izdelali filogenetsko drevo (Slika 6), ki prikazuje odnose med vrstami rodu *Verticillium* sensu stricto pri izolatih, vključenih v analizo. Primerljive informacije ter rezultate so pridobili znanstveniki v drugih študijah, ki so, prav tako na podlagi zaporedja regije ITS preučevali odnose med vrstami rodu *Verticillium*. Inderbitzin in sod. (2011) so v obsežni filogenetski študiji na petih lokusih analizirali tudi regijo ITS pri različnih izolatih in izdelali filogenetsko drevo (Priloga 4), ki prikazuje odnose med vsemi desetimi vrstami *Verticillium* sensu stricto ter *Gibellulopsis nigrescens*. V isti študiji so odkrili delitev vrst znotraj rodu v dve skupini (Priloga 5), glede na prisotnost ali odsotnost rumeno barvanih hif. Pri primerjavi filogenetskega drevesa iz reprezentativnih sekvenč (Slika 6) z drevesom, ki so ga izdelali Inderbitzin in sod. (2011) (Priloga 3), smo ugotovili, da v obeh drevesih enako najprej pride do razvejanja, ki izloči *G. nigrescens* in rodu *Verticillium* sensu stricto. Nato pride enako v obeh drevesih do razvejanja v dve skupini znotraj rodu *Verticillium* sensu stricto. Ker med vzorci, zajetimi v našo analizo, ni bilo predstavnikov vrst *V. klebahnii* in *V. zaregamsianum*, se v našem drevesu prva skupina razdeli na tri veje, ki predstavljajo vrste *V. tricorpus*, *V. isaacii* in *V. albo-atrum*, ki pa se nadaljnje razveja v dve skupini. Podobno pride do razdelitve tudi v drevesu Inderbitzna in sod. (2011), z nekaj razlikami (ni delitve na dve skupini znotraj vrste *V. albo-atrum*), ki so lahko posledica uporabe različnih algoritmov in metod za primerjavo zaporedij in izdelavo filogenetskega drevesa (Inderbitzin in sod. (2011) so uporabili algoritem »maximum parsimony«) ali pa posledica izbire izolatov. V drugi skupini pride v obeh primerih do skoraj identičnega razvejanja v štiri skupine, ki predstavljajo vrste *V. nubilum*, *V. alfalfa*e, *V. nonalfalfa*e in *V. longisporum* A1/D1. Iz priloge 5 je razvidno, kako se rod *Verticillium* sensu stricto deli na dve skupini, Flavexudans (skupino sestavljajo vrste *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. tricorpus*, *V. zaregamsianum* in *V. albo-atrum*) in Flavnonexudans (skupino sestavljajo vrste *V. nubilum*, *V. alfalfa*e, *V. nonalfalfa*e, *V. dahliae* in *V. longisporum*). Enako delitev smo odkrili v drevesu, ki smo ga pridobili z našo filogenetsko analizo regije ITS. Iz tega lahko zaključimo, da smo v filogenetski analizi regije ITS pravilno identificirali vrste in izdelali filogenetsko drevo, ki prikazuje prave odnose med vrstami *Verticillium* sensu stricto.

Zare in sod. (2007) so s filogenetsko analizo regije ITS izdelali drevo, podprto z visokimi bootstrap vrednostmi, na osnovi katerega so določili odnos med rodom *Verticillium* sensu stricto ter rodovoma *Gibellulopsis* in *Musicillium*. Ugotovili so, da je vrsta *V. nigrescens* sorodna vrstam rodu *Gibellulopsis* in različna od rodu *Verticillium* sensu stricto in se jo lahko uvrsti v rod *Gibellulopsis*, vrsta *V. theobromae* pa se od preiskovanih vrst močno razlikuje, zato so jo uvrstili v nov rod, poimenovan *Musicillium*.

V filogenetski analizi smo ugotovili, da dva izolata v drevesu (Slika 6) zavzemata ločeni veji, oddaljeni od rodu *Verticillium* sensu stricto. Regija ITS obeh izolatov je različna od zaporedij vrst *Verticillium* sensu stricto, z drugimi analizami pa smo ugotovili, da gre za izolata vrste *G. nigrescens*. Gre za predstavnika rodu *Gibellulopsis*. Z analizami smo tako potrdili navedbe Bidocha in sod. (1999), da obstaja več skupin (vrst) znotraj rodu *Verticillium* sensu stricto.

Pri filogenetski analizi zaporedij regije ITS smo odkrili raznolikost tudi znotraj posameznih vrst rodu *Verticillium* sensu stricto (Slika 5 in Slika 6). In sicer, znotraj vrste *V. dahliae* obstajata dve skupini nukleotidnih zaporedij, *V. dahliae* 2 cotton olive (dva izolata, eden iz bombaža in eden iz oljke) in *V. dahliae* 24 (večja skupina 24-h izolatov), ki se med sabo razlikujeta v enem SNP na poziciji 104, G/T. Znotraj vrste *V. albo-atrum* prav tako obstajata dve skupini (*V. alboatrum* 5, *V. alboatrum* arthicoke 1), ki se med sabo razlikujeta v enem SNP na poziciji 173, A/G. Oba SNP smo ovrednotili s pregledom obeh zaporedij v programu CodonCode Aligner, s čimer smo potrdili, da gre za SNP in ne za napako v zaporedju zaradi sekvenciranja. Oba SNP se pojavita pri izolatu, ki je bil izoliran iz druge gostiteljske rastline oziroma iz drugega geografskega območja, kot preostali izolati. Do zelo podobnih ugotovitev, o obstoju podskupin znotraj vrste *V. fungicola*, glive iz rodu *Verticillium*, ki okužuje gojišča gob, so prišli Collopy in sod. (2002). Ugotovili so, da prihaja do razlik v regiji ITS, zaradi katerih se vrsta deli na več podskupin, le-te pa so povezane z geografskim območjem nahajališča glive. Na podlagi naših rezultatov in rezultatov predhodnih študij tako ugotavljamo, da pri izolatih iz rodu *Verticillium* sensu stricto na nivoju DNA prihaja do določene specializacije izolata na dano okolje.

Iz preglednice 14 je razvidno, da se identifikacija izolatov z novimi PCR označevalci, specifičnimi za vrste *Verticillium* sensu stricto, ujema z identifikacijo zaporedij regije ITS v filogenetski analizi za večino izolatov, identifikacija glede na podatkovno zbirko pa odstopa, saj v podatkovni zbirki NCBI vrste še niso poimenovane z ozirom na novo taksonomsko razvrstitev vrst rodu *Verticillium* sensu stricto. S filogenetsko analizo smo lahko identificirali tudi izolate, katerih DNA z začetnimi oligonukleotidi nismo uspeli pomnožiti dovolj dobro, da bi jih lahko identificirali. Na podlagi teh ugotovitev lahko trdimo, da sta oba pristopa identifikacije izolatov učinkovita, bolj občutljiva pa je metoda identifikacije s filogenetsko analizo regije ITS. Na ta način smo namreč lahko identificirali vse izolate, tudi izolate, ki ne spadajo v rod *Verticillium* sensu stricto in so posledica okužb/zamenjav v zbirki izolatov, zato smo jih posledično izločili iz nadaljnje analize.

Metodologijo pomnoževanja regije ITS, ki ji sledi direktno sekvenciranje produktov PCR in nato filogenetska analiza, so uveljavili White in sod. (1990), ki so razvili začetna oligonukleotida ITS1 in ITS4 ter protokol pomnoževanja regije ITS. Njihov pristop temelji na predpostavki, da se rRNA cistron razvija in mutira hitreje pri različnih organizmih in vrstah, zaradi česar se rodovi in vrste znotraj rodu razlikujejo v regiji ITS. Zaradi tega je regija ITS primerno orodje za filogenetske študije med rodovi in znotraj rodov. Tudi mi smo v analizi uporabili začetna oligonukleotida ITS1 in ITS4 ter pristop direktnega sekvenciranja regije ITS, ki smo jo uporabili za filogenetsko analizo. Zato lahko potrdimo, da je metodologija, ki so jo postavili White in sod. (1990), učinkovita in primerena za določanje odnosov tudi v rodu *Verticillium* sensu stricto, ker smo s tem pristopom za vsak izolat identificirali vrsto, ki smo jo identificirali tudi z novimi začetnimi oligonukleotidi, ki so jih razvili Inderbitzin in sod. (2013) za identifikacijo vseh desetih vrst *Verticillium* sensu stricto.

Izolat PapMB (v filogenetskem drevesu označen kot *V. nigrescens* 1) je bil predhodno glede na morfologijo čiste kulture na trdnem gojišču identificiran kot vrsta *V. dahiae*. Po primerjavi zaporedja regije ITS s podatkovno zbirko NCBI smo izolat identificirali kot vrsto *Gibellulopsis nigrescens* (*G. nigrescens*). Ujemanje zaporedja z zadetkom v podatkovni zbirki je sto-odstotno. Tudi s filogenetsko analizo smo potrdili, da gre za vrsto *G. nigrescens*, saj zaporedje izolata odstopa v številnih SNP, delecijah, insercijah, od preostalih reprezentativnih zaporedij drugih vrst in je zato v filogenetskem drevesu uvrščeno na ločeno vejo, oddaljeno od vrst rodu *Verticillium* sensu stricto. V filogenetski analizi smo identificirali še en izolat kot predstavnika vrste *G. nigrescens*, to je izolat CBS 123.176, ki je bil predhodno identificiran kot *V. nigrescens*, primerjava s podatkovno zbirko NCBI pa je odkrila zadetek z Uncultured Verticillium z 99-odstotnim ujemanjem zaporedja s podatkovno zbirko. V prvi poravnavi vseh zaporedij regije ITS smo opazili, da zaporedji obeh izolatov, PapMB in CBS 123.176, odstopata od drugih zaporedij v številnih SNP, delecijah, insercijah, medtem, ko sta med sabo zelo podobni z 99-odstotno identičnostjo. Zato smo zaporedji regije ITS obeh izolatov primerjali med seboj v orodju BLAST, kjer smo ugotovili, da se zaporedji med seboj razlikujeta v osmih SNP na 534 baznih parov dolgi regiji ITS. Na podlagi danih rezultatov lahko zaključimo, da gre pri izolatu PapMB za predstavnika vrste *G. nigrescens*, saj na to nakazuje identifikacija v podatkovni zbirki, ter za podobnost z izolatom CBS 123.176, ki je bil predhodno identificiran kot *V. nigrescens*. Pri slednjemu pa gre najverjetneje za predstavnika vrste *G. nigrescens*, ki pa ima kot posledico specializacije na danega gostitelja, ki je v tem primeru izolacijska volna, prisotne določene spremembe na nivoju DNA.

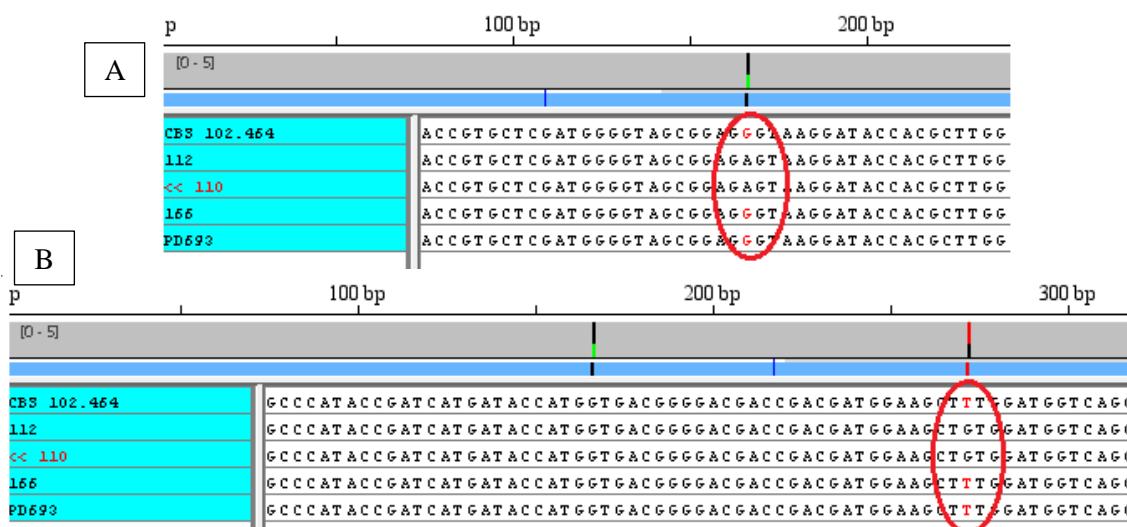
Query	2	TGATATGCTTAAGTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGTGCCGCCG	61
Sbjct	2	TGATATGCTTAAGTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGTGCCGCCG	60
Query	62	GAGCGGGCTTGAGGGGGTTAGAGGCCGGATAGCCCG <b>CA</b> GGCTCCCGATGCGAGGCAGA	121
Sbjct	61	GAGCGGGCTTGAGGGGGTTAGAGGCCGGATAGCCCG <b>CG</b> GGCTCCCGATGCGAGGCAGA	120
Query	122	TGTTACTACGCAAAGGAAGGGCCC <b>AA</b> CGGGTCCGCCACTGGTTTCGGGACTGCCTGG	181
Sbjct	121	TGTTACTACGCAAAGGAAGGGCCC <b>GT</b> CGGGTCCGCCACTGGTTTCGGGACTGCCTGG	180
Query	182	CAG <b>A</b> CCCCAACGCCGGGCCACGGGGCTCGAGGGTTGAAACGACGCTGGACAGGCATG	241
Sbjct	181	CAG <b>G</b> CCCCAACGCCGGGCCACGGGGCTCGAGGGTTGAAACGACGCTGGACAGGCATG	240
Query	242	CCTCCCAGGATACTGGAAGGCGCCATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCT	301
Sbjct	241	CCTCCCAGGATACTGGAAGGCGCCATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCT	300
Query	302	GCAATTCACATTACATATCGCGTTCGCTGCGTCTTCATCGATGCTGGAGCCAAGAGAT	361
Sbjct	301	GCAATTCACATTACATATCGCGTTCGCTGCGTCTTCATCGATGCTGGAGCCAAGAGAT	360
Query	362	CCGTTGTTGAAAGTTAACAGTCGTTAGAACACTCAG <b>A</b> GTATCGTCGGGTTCGAAC	421
Sbjct	361	CCGTTGTTGAAAGTTAACAGTCGTTAGAACACTCAG <b>A</b> GTATCGTCGGGTTCGAAC	420
Query	422	AGAGATTCTGATAATGCCGGGGCACGCCCG <b>C</b> GAGGCGGCCGCCGAAGCAACAGGTA	481
Sbjct	421	AGAGATTCTGATAATGCCGGGGCACGCCCG <b>C</b> GAGGCGGCCGCCGAAGCAACAGGTA	480
Query	482	T <b>A</b> AGGTTACAAAGGGTTATGAGTTATAGTACTCGGTAATGATCCCTCCGCAG	535
Sbjct	481	T <b>C</b> AGGTTACAAAGGGTTATGAGTTATAGTACTCGGTAATGATCCCTCCGCAG	534

Slika 7: Primerjava zaporedij regije ITS izolatov PapMB in CBS 123.176 z orodjem BLAST; zaporedje »Query« predstavlja izolat CBS 123.176; zaporedje »Sbjct« predstavlja izolat PapMB; podatki o primerjavi: Vrednost S 942, Vrednost E 0,0, Identičnost 526/534 (99%), Vrzeli 0/534.

#### 4.4 PRIMERJAVA ZAPOREDIJ PCR OZNAČEVALCEV ZNOTRAJ VRSTE

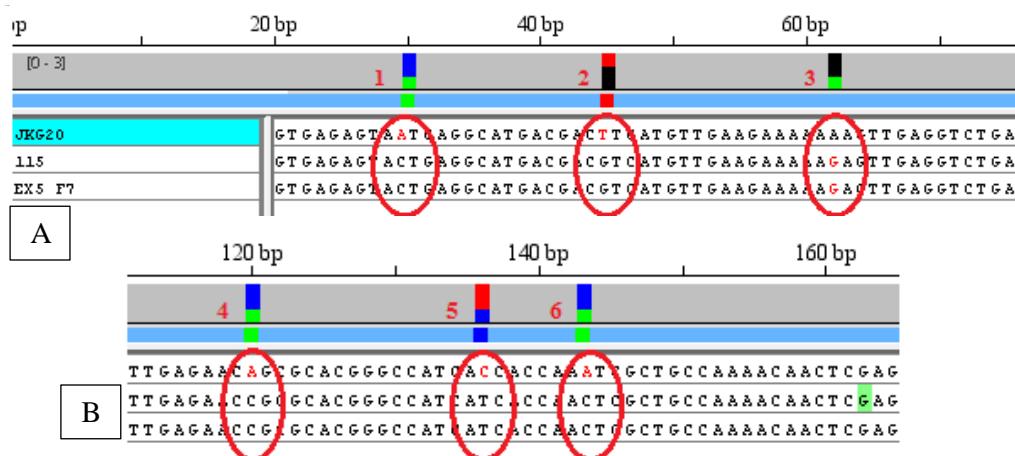
V zadnjem delu raziskave smo sekvencirali produkte reakcij PCR z novimi začetnimi oligonukleotidi, to je specifične PCR označevalce, s katerimi smo lahko identificirali izolate. Zaporedja, zbrana v skupine glede na vrsto *Verticillium* sensu stricto, smo med sabo primerjali, s čimer smo želeli ugotoviti, ali znotraj vrste obstaja raznolikost v zaporedju lokusa, specifičnega za posamezno vrsto, ki bi izolate iz te vrste delila v dve ali več skupin in kaj bi lahko bil razlog za delitev v podskupine.

Pri sekvencirjanju produktov PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *V. albo-atrum* (zaporedje gena za aktin), smo pridobili pet kvalitetnih zaporedij nukleotidov, ki smo jih uporabili v analizi, medtem, ko nismo uspeli pridobiti kvalitetnega zaporedja izolata CBS 682.88 in ga nismo uvrstili v analizo. Pri poravnavi in primerjavi vseh petih zaporedij smo na regiji, dolgi 621 baznih parov, določili dva SNP. Prvi se nahaja na poziciji 167/621 baznih parov, ker pride pri dveh izolatih, to sta 110 in 112, do zamenjave gvanina z adeninom. Drugi SNP se nahaja na poziciji 273/621 baznih parov, kjer je, prav tako pri izolatih 110 in 112, prišlo do zamenjave timina z gvaninom. Ob pregledu značilnosti teh izolatov smo ugotovili, da sta bila oba izolata izolirana iz okužene sadike krompirja na Otokih princa Edwarda. Na podlagi teh ugotovitev lahko trdimo, da je pri obeh izolatih prišlo do specializacije in prilagoditve na okolje oziroma geografsko območje na nivoju DNA, ki se kaže v obliki dveh SNP v regiji gena za aktin.



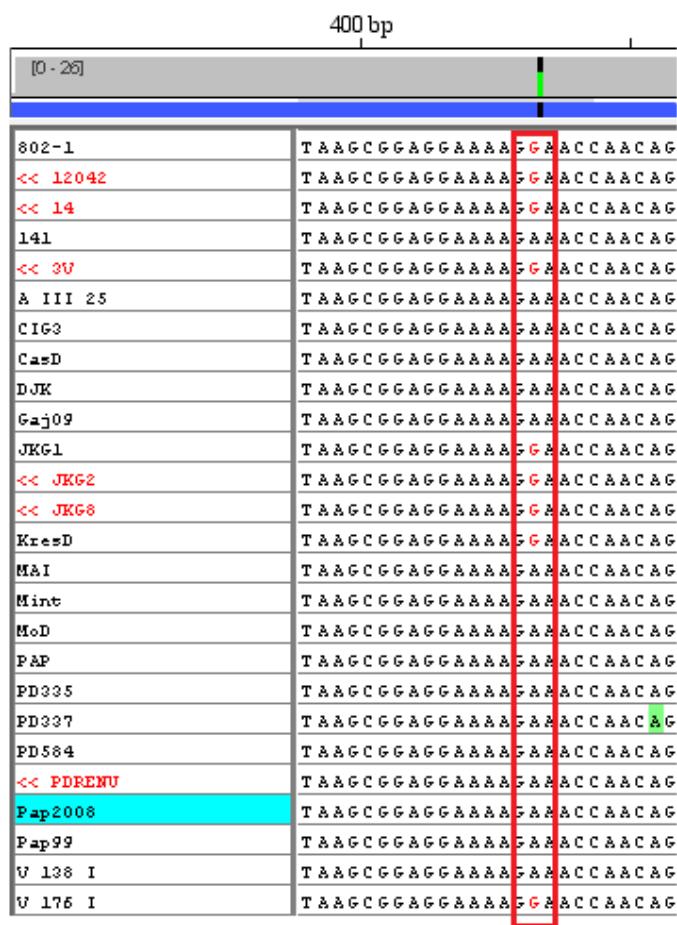
Slika 8: Prikaz identificiranih SNP znotraj vrste *V. albo-atrum*; oba SNP se nahajata na 621 bp dolgi regiji gena za aktin, ki je specifična za vrsto *V. albo-atrum*; A – prvi SNP G/A na poziciji 167 bp; B – drugi SNP T/G na poziciji 273 bp.

Uspešno smo sekvencirali vse tri produkte PCR, pomnožene z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *V. isaacii*. Enako, kakor pri zaporedjih vrste *V. albo-atrum*, smo primerjali nukleotidna zaporedja treh izolatov vrste *V. isaacii* na regiji dolgi 168 baznih parov gena za elongacijski faktor 1-alfa. Identificirali smo šest SNP oziroma sprememb, ki so prisotne samo pri izolatu JKG20. SNP se nahajajo na pozicijah: 31/168 bp C/A, 46/168 bp G/T, 63/168 bp G/A, 121/168 bp C/A, 137/168 bp T/C in 144/168 bp C/A. Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da je tudi pri izolatu JKG20 prišlo do specializacije za gostiteljsko rastlino na nivoju DNA in da znotraj vrste *V. isaacii* obstajajo podskupine, najverjetneje specifične za določene gostiteljske rastline.



Slika 9: Prikaz identificiranih SNP znotraj vrste *V. isaacii*; šest SNP se nahaja znotraj 168 bp dolgi regiji gena za elongacijski faktor 1-alfa; A – prvi trije SNP; B – drugi trije SNP.

Produkte PCR z novimi začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *V. dahliae*, smo pridobili pri 28 izolatih (zaporedje regije ITS). Produkt PCR je pri izolatu PapMB šibkejši, ker smo z drugimi analizami ugotovili, da gre za drugo vrsto. Vendar pa produkta PCR za ta izolat nismo sekvencirali. Sekvencirali smo 27 produktov PCR vrste *V. dahliae* in pridobili 27 kvalitetnih nukleotidnih zaporedij lokusa, specifičnega za identifikacijo vrste *V. dahliae*. Zaporedja smo, enako, kakor predhodno, primerjali ter identificirali en SNP na 461 baznih parov dolgi konsenzus regiji. SNP se nahaja na poziciji 433/461 baznih parov in gre za zamenjavo adenina z gvaninom. Zamenjava nukleotida se nahaja v zaporedju lokusa pri izolatih: 14, 3V, JKG1, JKG2, JKG8, V-176 I, KresD, 802-1 in 12042. Gre za izolate, pridobljene iz različnih gostiteljskih rastlin in iz različnih geografskih območij. Najverjetneje je SNP posledica prilagoditve izolatov na okolje, vendar drugih skupnih značilnosti med izolati ne ugotavljamo.



Slika 10: Prikaz identificiranih SNP znotraj vrste *V. dahliae*; SNP se nahaja na poziciji 433 v 461 bp dolgi regiji ITS, specifični za vrsto *V. dahliae*.

Znotraj vrst *V. nonalfalfa*, *V. alfalfa*, *V. tricorpus* in pri produktih PCR z začetnima oligonukleotidoma za Vrsto A1 in Vrsto D1 pri primerjavi zaporedij lokusov, specifičnih za identifikacijo teh vrst, nismo odkrili SNP. Zaporedja znotraj vrst so popolnoma identična, ne glede na gostiteljsko rastlino ali geografsko območje, od koder so bili izolati izolirani.

Na podlagi zbranih rezultatov ugotavljamo, da pri določenih vrstah prihaja do razlik med posameznimi izolati na nivoju DNA. Predvsem gre za razlike pri izolatih, izoliranih iz manj pogostih geografskih območij, ki jih kolonizirajo glive rodu *Verticillium* sensu stricto (na primer Otoki princa Edwarda), ter pri izolatih, izoliranih iz manj pogostih gostiteljev (lipa, izolacijska volna). Podskupine so bile odkrite tudi znotraj vrste *V. fungicola* (Collopy in sod., 2002) ter že predhodno pri vrsti *V. albo-atrum* (Robb in sod., 1993; Mahuku in Platt, 2002, cit. po Inderbitzin in sod., 2011). Z našimi rezultati lahko potrdimo, da se znotraj rodu *Verticillium* ter znotraj rodu rastlinskih patogenih gliv *Verticillium* sensu stricto vrste delijo na podskupine, kot posledica specializacije izolatov na dano okolje.

## 5 SKLEPI

V raziskavi, v katero je bilo skupno vključenih 118 izolatov rodu *Verticillium*, smo skušali identificirati in razvrstiti izolate rodu *Verticillium* iz zbirke škodljivih organizmov IHPS glede na novo taksonomsko razvrstitev rodu *Verticillium* sensu stricto.

Tekom raziskave smo testirali uporabnost in primernost novih PCR označevalcev za identifikacijo vrst *Verticillium* sensu stricto in ugotovili, da z njimi nismo uspeli identificirati vseh izolatov iz zbirke IHPS. Prav tako smo ugotovili, da začetna oligonukleotida za identifikacijo vrste *V. dahliae* nista specifična samo za to vrsto, ker pomnožita PCR označevalce tudi pri vrsti *G. nigrescens*. Zato smo hipotezo, da so novi PCR označevalci specifični za posamezno vrsto rodu *Verticillium* sensu stricto, ovrgli oziroma smo jo le delno potrdili z rezultati ostalih simplex reakcij PCR za identifikacijo drugih vrst. S simplex in multiplex reakcijami PCR smo pomnožili specifične odseke DNA pri določenih izolatih z novimi začetnimi oligonukleotidi, zato lahko potrdimo hipotezo in trdimo, da smo z novimi PCR označevalci pridobili novo filogenetsko razvrstitev izolatov rodu *Verticillium*, ki se pojavljajo v Sloveniji in tujini. Ob tem menimo, da bi bilo potrebno natančno preučiti regijo ITS pri *V. dahliae* in *G. nigrescens* ter zaporedji začetnih oligonukleotidov Df in Dr, izdelanih v regiji ITS, s čimer bi lahko izdelali nove začetne oligonukleotide, ki bi razlikovali med obema vrstama.

Preizkusili smo marker SCAR6-2 za letalni patotip PG2 vrste *V. albo-atrum* in ugotovili, da se namnožuje pri vseh letalnih izolatih vrst *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*, ki izhajata iz skupine Grp1 *V. albo-atrum* ter tudi pri letalnih izolatih vrst *V. dahliae* in *V. longisporum*. Ta marker lepo kaže povezavo z visoko virulenco tudi pri drugih vrstah, saj se pomnoži tudi pri defoliating tipu glive *V. dahliae*, ki je visoko virulenten patotip za bombaž. Ugotavljam, da je marker SCAR6-2 značilen za regijo, ki je povezana z visoko virulenco, ne glede na vrsto *Verticillium* sensu stricto.

S filogenetsko analizo regije ITS smo izdelali drevo rodu *Verticillium* sensu stricto, v katerem smo identificirali več skupin, za katere smo potrdili, da predstavljajo vrste *Verticillium* sensu stricto. Zato lahko potrdimo hipotezo o uporabnosti filogenetske analize regije ITS za identifikacijo in diferenciacijo vrst *Verticillium* sensu stricto.

V raziskavi smo prav tako primerjali oba pristopa identifikacije izolatov, z novimi PCR označevalci in s filogenetsko analizo regije ITS. Pri tem smo ugotovili, da sta oba pristopa identifikacije primerna in uporabna, bolj zanesljiva pa je identifikacija s filogenetsko analizo regije ITS, ker nedvoumno identificira in razloči izolate vrst *V. dahliae* in *G. nigrescens* v filogenetskem drevesu, medtem, ko pri analizi z novimi PCR označevalci dobimo produkt PCR z začetnima oligonukleotidoma za vrsto *V. dahliae* (Df in Dr) tudi pri

*G. nigrescens*. Filogenetska analiza je tudi bolj občutljiva metoda, saj smo s tem pristopom identificirali tudi tiste izolate, ki jih z novimi začetnimi oligonukleotidi nismo uspeli.

Ker smo v raziskavi z obema pristopoma določili podskupine znotraj vrst *Verticillium* sensu stricto, bi v nadalnjih raziskavah bilo potrebno natančno preučiti razlike v DNA pri podskupinah in jih ovrednotiti z ozirom na značilnosti izolatov te podskupine (gostiteljska rastlina, geografsko območje, patotip). Na osnovi DNA zaporedij bi lahko razvili nove začetne oligonukleotide na določenih lokusih, s katerimi bi lahko v simplex reakcijah PCR identificirali tudi podskupine vrst. Na ta način bi lahko hitro in natančno identificirali izolate v nasadih, kjer se pojavljajo nove okužbe in vodili natančno evidenco, kateri izolati se pojavljajo v nasadih rastlin v Sloveniji in po svetu.

## 6 POVZETEK

Rod *Verticillium* obsega heterogeno skupino askomicetnih gliv, med katerimi so pomembne rastlinam patogene vrste, ki povzročajo verticilijsko uvelost z okužbami vaskularnega sistema številnih kmetijsko pomembnih kultur. Izgube pridelka zaradi okužb so lahko od 10 do 50 odstotkov in imajo pomemben gospodarski vpliv. V Sloveniji največji problem predstavlja vrsti *V. dahliae* in *V. nonalfalfa*, ki okužujeta hmelj in sta povzročiteljici hmeljeve uvelosti, ki se pojavlja v blagi in letalni oblikih. Nadzor in ukrepe za preprečevanje izbruhovalnih bolezni je mogoče vršiti v primerih, ko zanesljivo identificiramo vrsto in patotip izolata iz okuženega nasada. Zanesljiva identifikacija pa je mogoča z uporabo orodij molekularne genetike, kot je identifikacija vrst s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi v reakciji PCR, ki predstavlja velik napredek v molekularni diagnostiki gliv.

Inderbitzin in sod. (2011) so s filogenetskimi študijami na petih lokusih, s preučevanjem morfologije, z analizami herbarijev ter študijo obstoječe literature postavili novo taksonomske razvrstitev gliv rodu *Verticillium*, ki okužujejo rastline in rod poimenovali *Verticillium* sensu stricto. V rod je uvrščenih deset vrst, od katerih je pet vrst na novo poimenovanih in do tedaj še ne poznanih znanosti. Te vrste so: *V. albo-atrum*, *V. alfalfa*, *V. dahliae*, *V. isaacii*, *V. klebahnii*, tri linije vrste *V. longisporum*, *V. nonalfalfa*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* in *V. zaregamsianum*. V nadaljevanju so Inderbitzin in sod. (2013) razvili osemnajst novih PCR začetnih oligonukleotidov, ki so jih razvrstili v enajst parov, ki v simplex in multiplex reakcijah PCR omogočajo identifikacijo vseh desetih vrst iz rodu *Verticillium* sensu stricto. Vsak par pomnoži odsek lokusa, specifičnega pa posamezno vrsto, ki ga lahko detektiramo z agarozno elektroforezo in ovrednotimo glede na pričakovano dolžino produkta PCR. Identifikacija s simplex in multiplex reakcijami PCR je enostavna in hitra, kar je ključno za molekularno diagnostiko rastlinskih patogenov.

V raziskavi smo preverili učinkovitost novih PCR označevalcev za identifikacijo gliv iz rodu *Verticillium*. V raziskavo smo vključili DNA 118 izolatov iz zbirke IHPS, od katerih smo morali na novo izolirati DNA sedmih izolatov, DNA nekaterih izolatov pa je bila shranjena na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin na Biotehniški fakulteti. Sistematično smo izvedli simplex reakcije PCR za vsak par novih začetnih oligonukleotidov na vseh 118 vzorcih. Za razločitev vrst *V. dahliae* in linij *V. longisporum* smo izvedli multiplex reakcijo PCR. Produkte reakcij smo ločili in detektirali na agarozni elektroforezi in nove podatke o vrsti posameznega izolata zbrali v preglednici, kamor smo dopisali vse ključne podatke o posameznem izolatu. Uspešno smo identificirali 89 izolatov, katere smo uvrstili v osem različnih vrst rodu *Verticillium* sensu stricto. DNA 12 izolatov nismo uspeli pomnožiti dovolj učinkovito, da bi lahko na podlagi elektroforetske črte identificirali vrsto.

Hkrati smo v raziskavo vključili analizo markerja SCAR6-2, ki pomnoži odsek DNA, značilen samo za letalni patotip *V. albo-atrum*, razvit na podlagi fragmenta AFLP (Radišek in sod., 2006). Z informacijo o patotipu smo želeli pridobiti celostno informacijo o virulentnosti izolatov, ki se hranijo v zbirki škodljivih organizmov IHPS. Marker SCAR6-2 smo pomnožili v simplex reakciji PCR in na podlagi prisotnosti elektroforetske črte na agaroznem gelu določili, kateri izolati predstavljajo letalni patotip. Na osnovi tega markerja smo identificirali 42 izolatov letalnega patotipa, prav tako pa smo identificirali tri napačno določene izolate kot posledico okužbe v zbirki škodljivih organizmov, ki smo jih zato izključili iz nadaljnje analize.

V zadnjem delu raziskave smo izvedli filogenetsko analizo regije ITS, ki smo jo z začetnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4 pomnožili pri vseh 118 izolatih. V analizi z bioinformacijskimi orodji CodonCode Aligner in CLC Genomic Workbench smo pridobili filogenetsko drevo, ki predstavlja odnose med vrstami rodu *Verticillium* sensu stricto. Na ta način smo z drugim pristopom identificirali izolate, primerjali obe metodi identifikacije in zanesljivo določili, v katero vrsto glede na novo taksonomsко razvrstitev spadajo izolati iz zbirke IHPS.

Iz zbranih rezultatov lahko zaključimo, da novi PCR označevalci in filogenetska analiza regije ITS omogočajo identifikacijo vrst rodu *Verticillium* sensu stricto, vendar ugotavljamo, da je filogenetska analiza bolj občutljiva, saj smo z njo identificirali tudi izolate, katerih DNA v simplex in multiplex reakcijah PCR nismo uspeli pomnožiti, prav tako pa smo lahko ločili vrsti *V. dahliae* in *G. nigrescens*, ki ju pomnožijo začetni oligonukleotidi specifični za vrsto *V. dahliae*, kar vodi do napačne identifikacije izolatov vrste *G. nigrescens* z novimi PCR označevalci.

Z uporabo omenjenih molekularnih metod smo na novo identificirali tri izolate, ki so bili napačno določeni na osnovi morfološke identifikacije. Znotraj izolatov, morfološko identificiranih kot *V. albo-atrum*, smo identificirali in razločili vrste *V. albo-atrum*, *V. alfalfaе* in *V. nonalfalfaе*. Razločili smo vrsti *V. tricorpus* in *V. isaacii*, potrdili identiteto izolata vrste *V. nubilum*, izolatov vrste *V. dahliae* ter identificirali dva izolata, ki sta predstavnika linije *V. longisporum* A1/D1. Med izolati, zajetimi v analizo, nismo identificirali vrst *V. klebahnii* in *V. zaregamsianum*.

Z raziskavo smo pridobili nove informacije o vrsti in patotipu za izolate iz zbirke škodljivih organizmov IHPS in z obema pristopoma identifikacije izolatov odkrili podskupine znotraj posameznih vrst *Verticillium* sensu stricto. Ugotovitve bodo podlaga za pravilno ovrednotenje izolatov v zbirki, prav tako pa tudi za nadaljnje molekularne študije in razvoj novih diagnostičnih metod za natančno in nedvoumno identifikacijo vrst in podskupin rodu *Verticillium* sensu stricto.

## 7 VIRI

- Bidochá M. J., St Leger R. J., Stuart A., Gownalock K. 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology*, 145: 955–963
- CBS. 2014. CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre.  
<http://www.cbs.knaw.nl/> (junij 2014)
- Collopy P. D., Largeau-Mamoun M. L., Romaine C. P., Royse D. J. 2002. Molecular genetic variation in populations of *Verticillium fungicola* on the cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. V: *Mushroom biology and mushroom products*. Sánchez I. (ed.). UAEM: 85–94  
<http://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwsmbmp.org%2Fproceedings%2F4th%2520international%2520conference%2FDocumentos%2520Word%2F2%2520Molecular%2520Biology%2520Phylogeny%2F3MB-89%2520MOL%2520GEN%2520VAR%25203%2520OK.doc&ei=Npz9U-WwIcS50QW0wYHIBw&usg=AFQjCNGBk2VJQWdMp1mQ-15fkEj8lEwvWg&sig2=TuzWx3pMLh2edt4sCI8QIA&bvm=bv.74035653,d.d2k>
- Dolinar M., Simončič A. 1999. Hmeljeva uvelost (*Verticillium albo-atrum* Reinke at Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn) v Sloveniji. V: *Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin*, Portorož, 3.-4. marec 1999. Društvo za varstvo rastlin Slovenije, Ljubljana: 201–208
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 5: 1792–1797
- Fradin E. F., Thomma B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7, 2: 71–86
- Henson J. M., French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 81–109
- Radišek S., Leskošek G., Žveplan S., Zmrzlak M., Knapič V. 2006b. Hmeljeva uvelost v slovenskih hmeljiščih. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 22 str.
- Inderbitzin P., Bostock R. M., Davis R. M., Usami T., Platt H. W., Subbarao K. V. 2011. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLOS ONE*, 6, 12: e28341, doi:10.1371/journal.pone.0028341: 21 str.

Inderbitzin P., Davis R. M., Bostock R. M., Subbarao K. V. 2013. Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assay. PLOS ONE, 8, 6: e65990, doi:10.1371/journal.pone.0065990: 12 str.

Inderbitzin P., Subbarao K. V. 2014. *Verticillium* systematics and evolution: How confusion impedes verticillium wilt management and how to resolve it. Phytopathology, 104, 6: 564–574

Kageyama K., Komatsu T., Suga H. 2003. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. Journal of Genetics and Plant Pathology, 69: 153–160

Klosterman S.J., Atallah Z. K., Vallad G. E., Subbarao K. V. 2009. Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. Annual Review of Phytopathology, 47: 39–62

Kuchta P., Jecz T., Korbin M. 2008. The suitability of PCR based techniques for detecting *Verticillium dahliae* in strawberry plants and soil. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 16: 295–304

Lawyer F. C., Stoffel S., Saikit R. K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D. H. 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. The Journal of Biological Chemistry, 264, 11: 6427–6437

Lin X., Heitman J. 2005. Chlamydospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. Eukaryotic Cell, 4, 10: 1746–1754

Martin K. M., Rygiewicz P. T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology, 5, 28: doi:10.1186/1471-2180/5/28: 11 str.

Maruthachalam K., Atallah Z. K., Vallad G. E., Klosterman S. J., Hayes R. J., Davis R. M., Subbarao K. V. 2010. Molecular variation among isolates of *Verticillium dahliae* and polymerase chain reaction-based differentiation of races. Phytopathology, 100, 11: 1222–1230

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA In Vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263–273

Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D., Robb J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 39: 1–11

PCR. 2014. Learn Genetics, University of Utah.

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr> (junij 2014)

Polymerase Chain Reaction (PCR). 2013. National Human Genome Research Institute.

<http://www.genome.gov/10000207> (junij 2014)

Pegg G. F., Brady B. L. 2002. *Verticillium* wilts. Wallingford, CABI Publishing: 552 str.

Platt H. W., Mahuku G. 2000. Detection methods for *Verticillium* species in naturally infested and inoculated soils. American Journal of Potato Research, 77: 271–274

Pokorn T. 2011. Genotipizacija kultivarjev hmelja (*Humulus lupulus* L.) s fluorescentnimi mikrosatelitnimi markerji. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 66 str.

Posebni nadzor hmeljeve uvelosti. 2009. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

<http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/PosNadVerticilij.asp> (junij 2014)

Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2003. Identifikacija dveh patotipov glive *Verticillium albo-atrum* na hmelju z molekulskimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. V: Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče, 4.-6. marec 2003. Društvo za varstvo rastlin Slovenije, Ljubljana: 107–111

Radišek S. 2004. Molekularna variabilnost pri glivah (*V. albo-atrum* Reinke et Berthold in *V. dahliae* Klebahn) in razvoj patotipsko specifičnih markerjev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 107 str.

Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2004. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticilliu albo-atrum* isolates from hop. Plant Disease, 88: 1115–1122

Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. European Journal of Plant Pathology, 116: 301–314

Radišek S., Javornik B. 2011. Taksonomija in variabilnost fitopatogenih vrst gliv iz rodu *Verticillium*. Hmeljarski bilten, 18: 41–55

Robb J., Moukhamedov R., Hu X., Platt H., Natar R. N. 1993. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assay. Physiological and Molecular Plant Pathology, 43: 423–436

Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. PNAS, 109, 16: 624–6246

Smith H. C. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, and *Verticillium tricorpus*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 8: 450–478

Tran V. T., Braus-Stromyer S. A., Timpner C., Braus G. H. 2013. Molecular diagnosis to discriminate pathogen and apathogen species of the hybrid *Verticillium longisporum* on the oilseed crop *Brassica napus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 4467–4483

White T. J., Burns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR Protocols: A guide to methods and applications, Innis M. (ed.). New York, Academic Press: 314–322  
<http://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf> (junij 2014)

Zare R., Gams W., Starink-Willemse M., Summerbell R. C. 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. Nova Hedwigia, 85: 463–489

## ZAHVALA

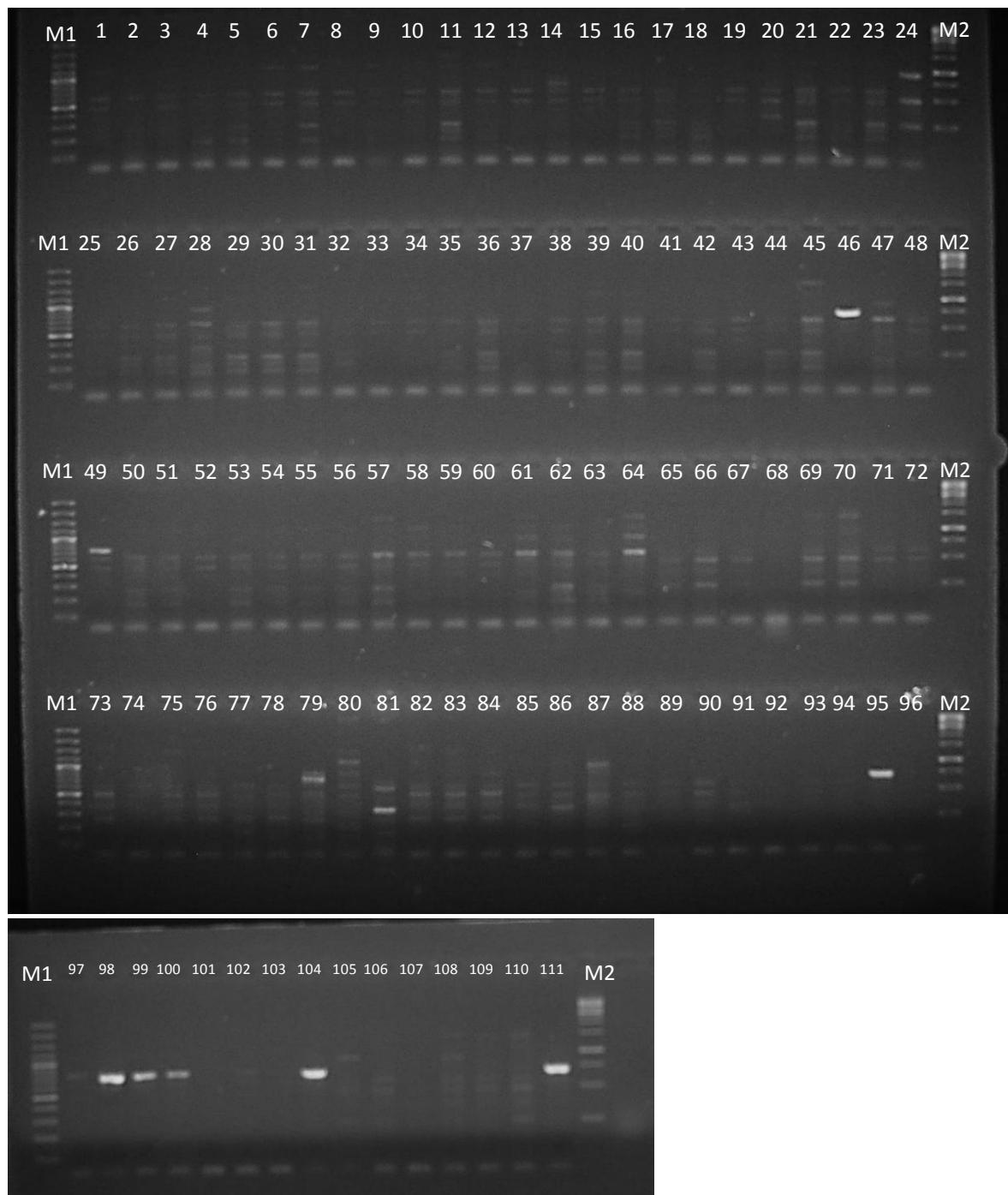
Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Nataši Štajner in somentorju prof. dr. Jerneju Jakšetu, ki sta mi omogočila raziskavo in izdelavo magistrskega dela. Pod njunim mentorstvom sem pridobila veliko izkušenj za delo v laboratoriju ter za uporabo bioinformacijskih orodij, za kar sem jima zelo hvaležna.

Zahvaljujem se tudi družini in fantu, ki so mi tekom študija stali ob strani in me spodbujali, zaradi česar sem z velikim zanimanjem raziskovala in študirala biotehnologijo.

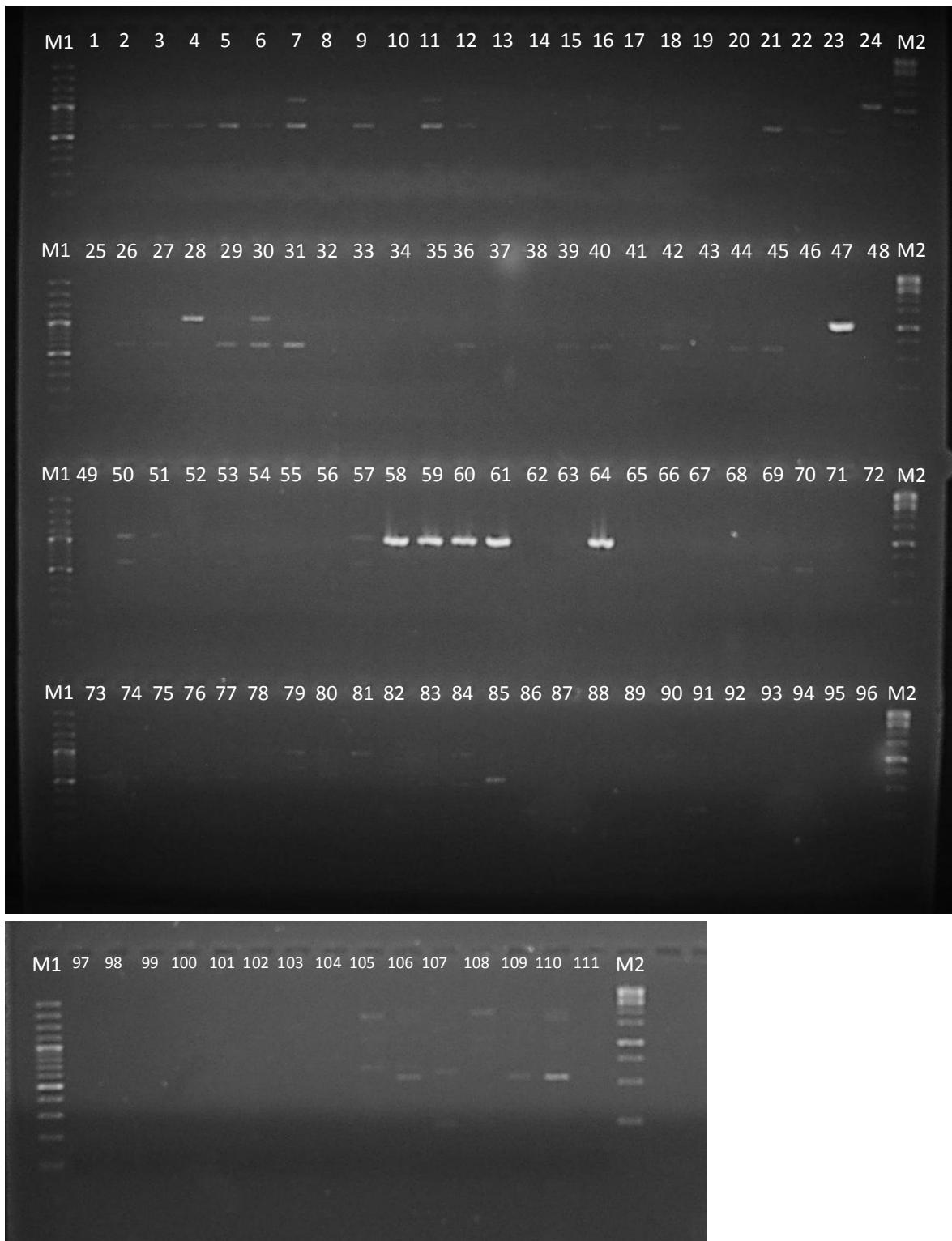
## PRILOGA A

### Slike elektroforetskih gelov vseh simplex in multiplex reakcij PCR

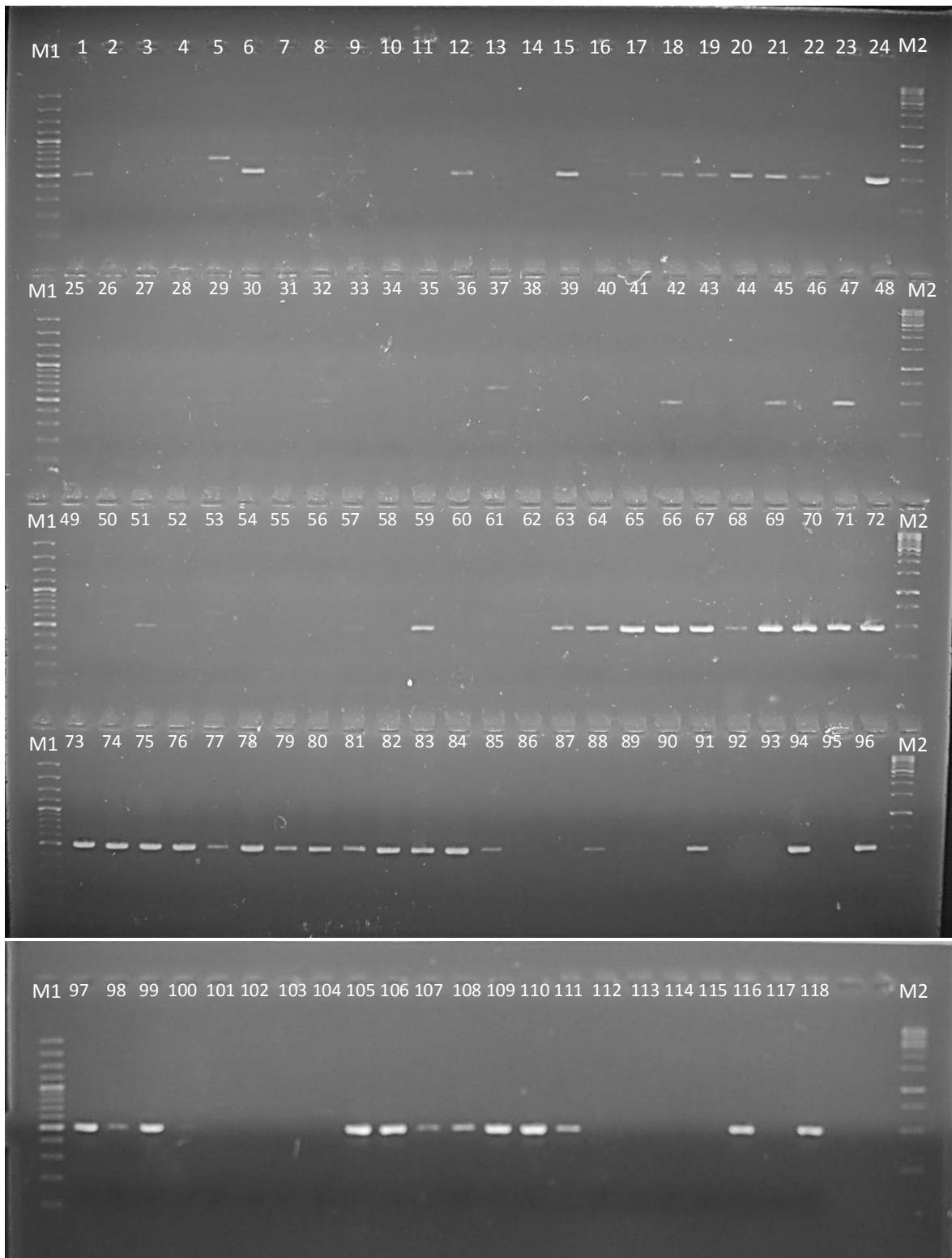
Števila od 1 do 118 označujejo posamezne izolate, navede v preglednici 4. M1 označuje dolžinski standard 100 bp, M2 označuje dolžinski standard 1kbp. Slike elektroforetskih gelov po reakcijah PCR za vrsti *V. klebahnii* in *V. zaregamsianum* niso vključene, ker nismo pomnožili produktov PCR pri nobenem izolatu.



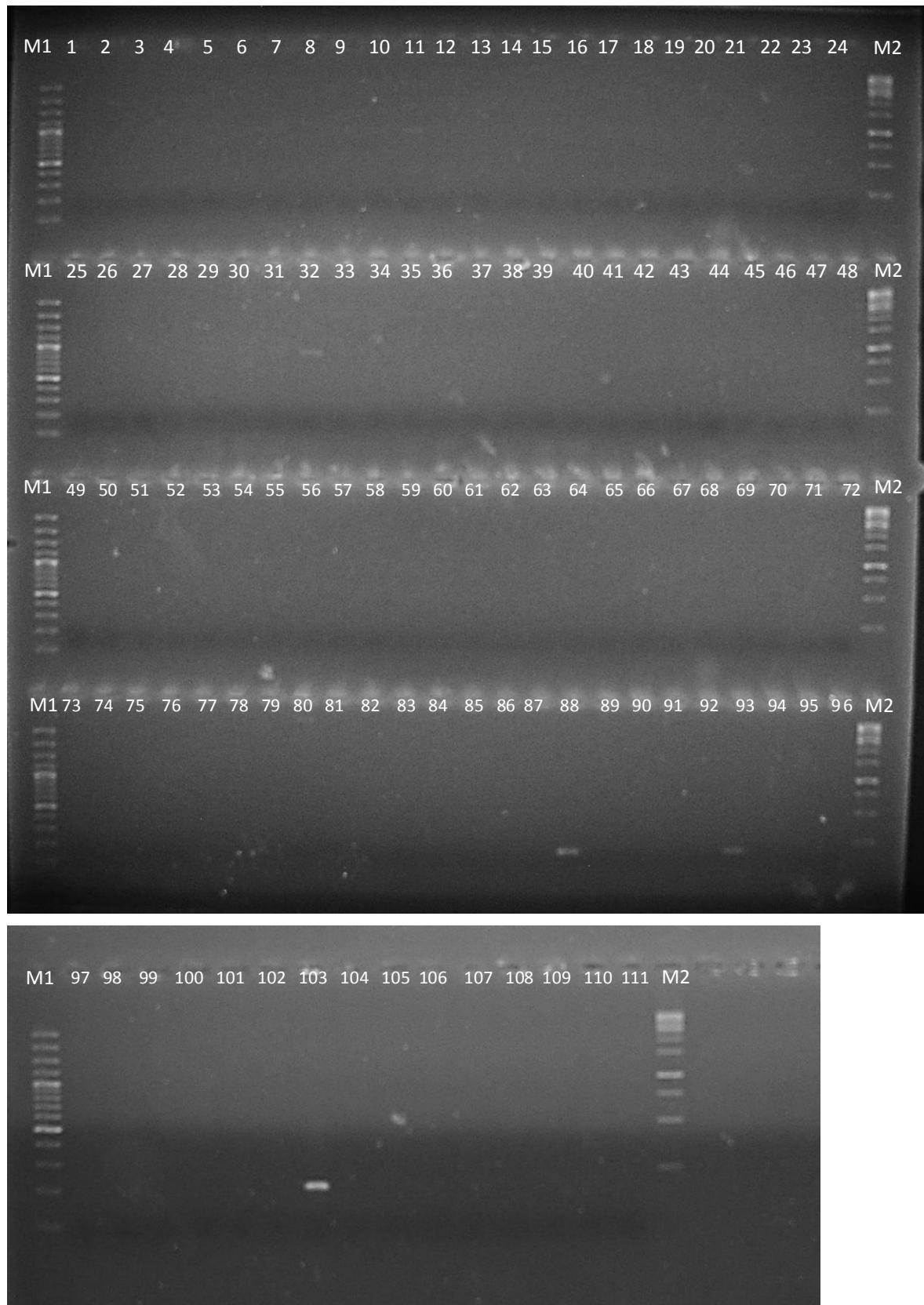
Pril. A1: Reakcija PCR za identifikacijo izolatov vrste *V. albo-atrum*



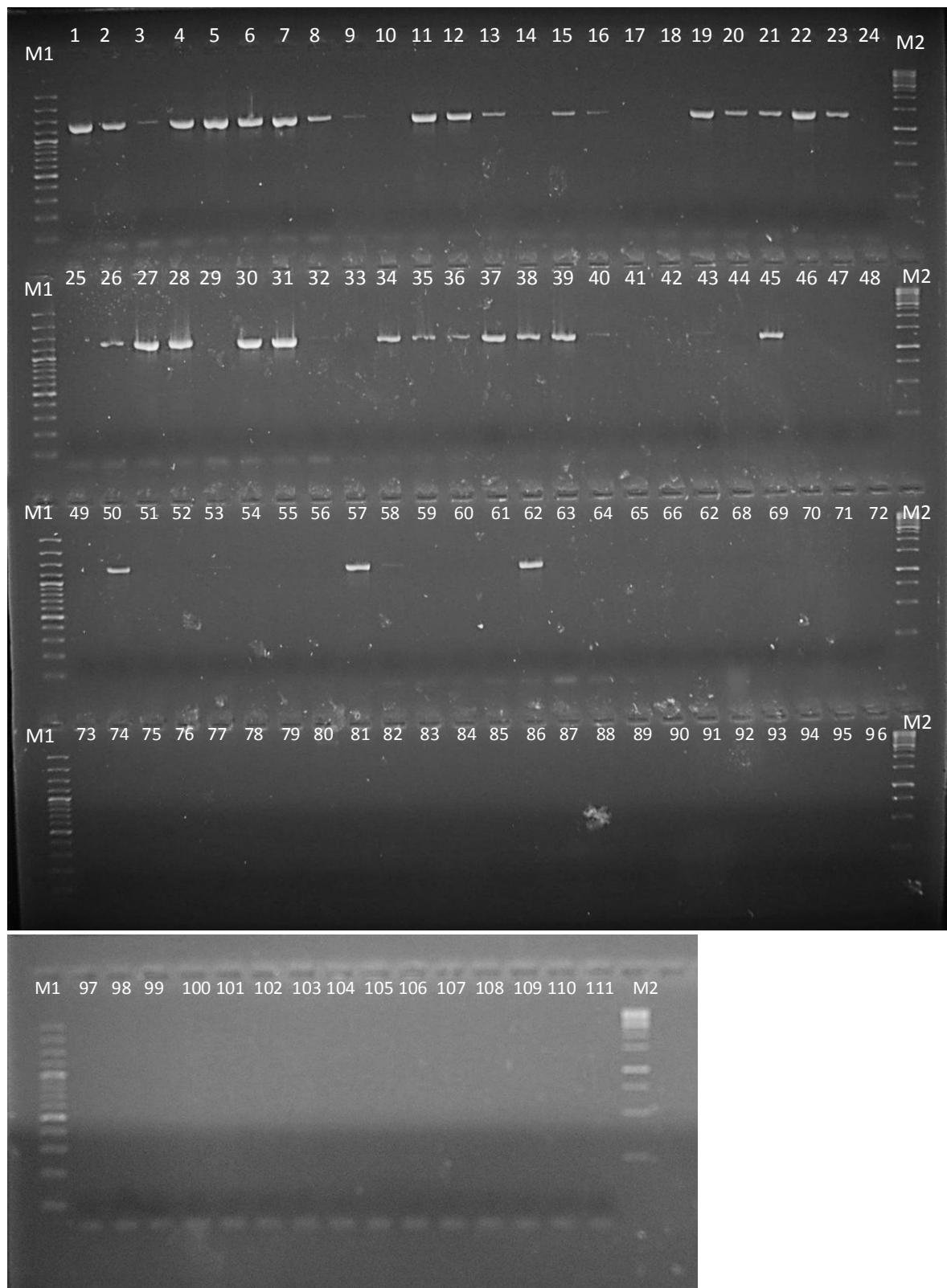
Pril. A2: Reakcija PCR za identifikacijo izolatov vrste *V. alfafae*



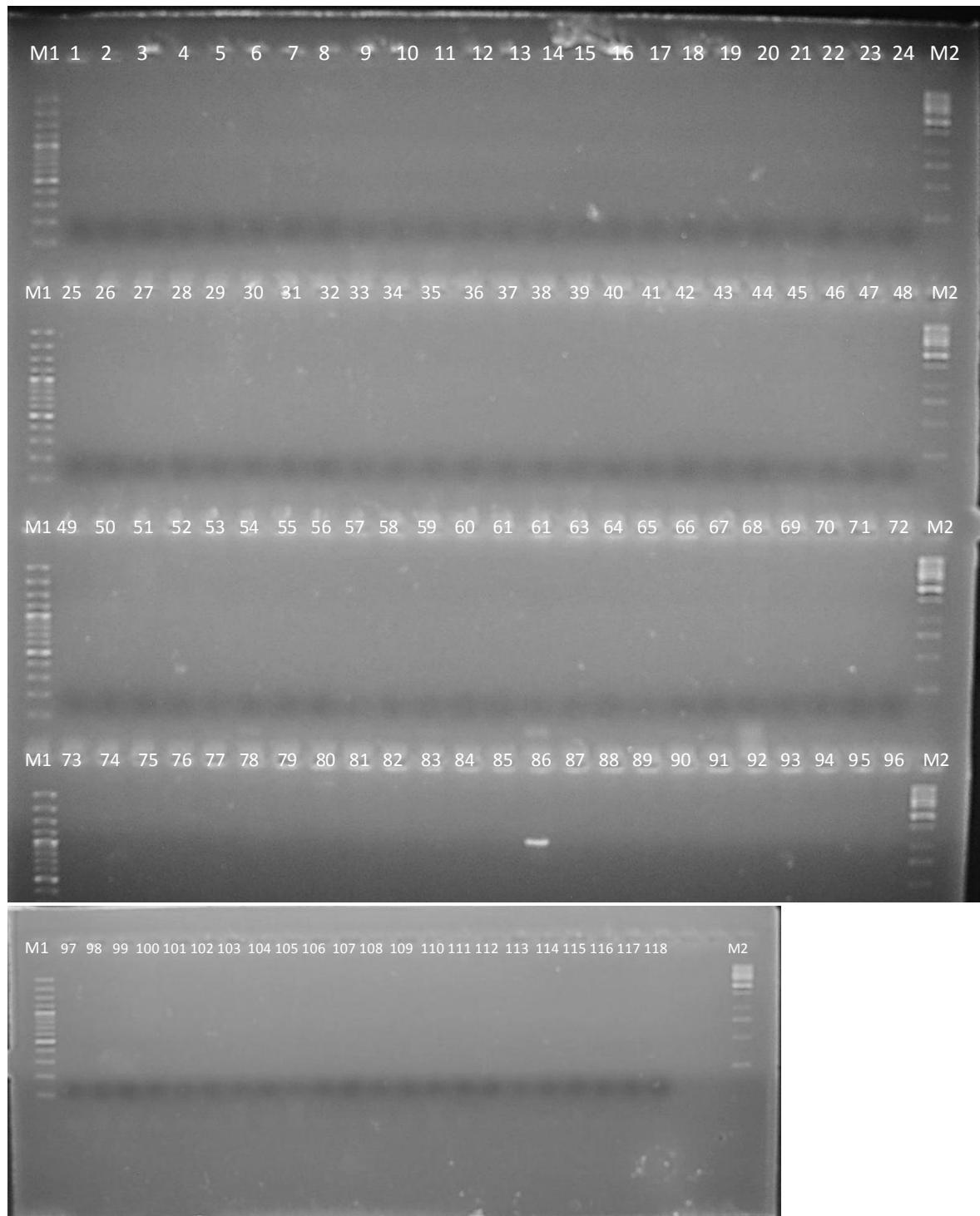
Pril. A3: Reakcija PCR za identifikacijo izolatov vrste *V. dahliae*



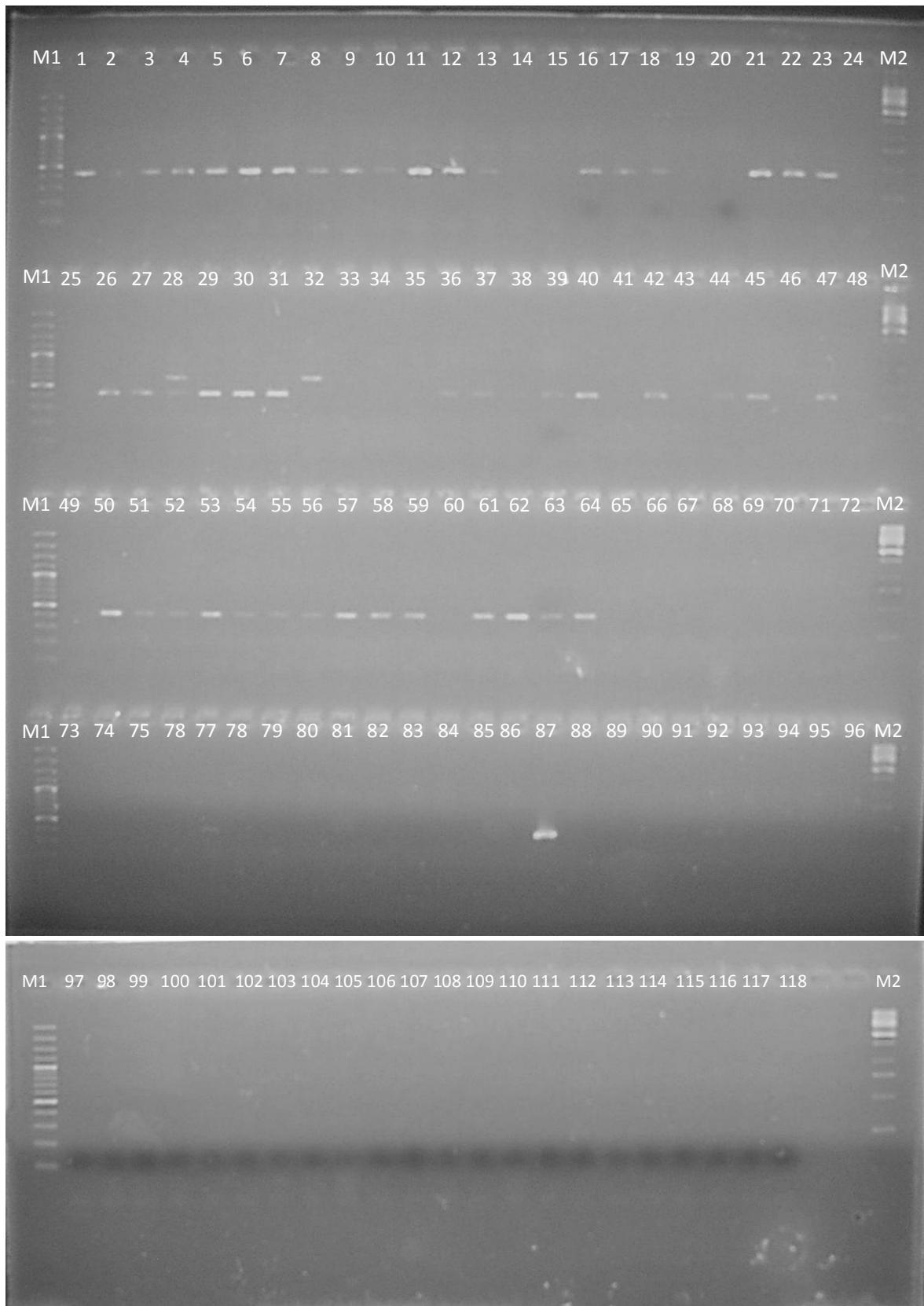
Pril. A4: Reakcija PCR za identifikacijo izolatov vrste *V. isaacii*



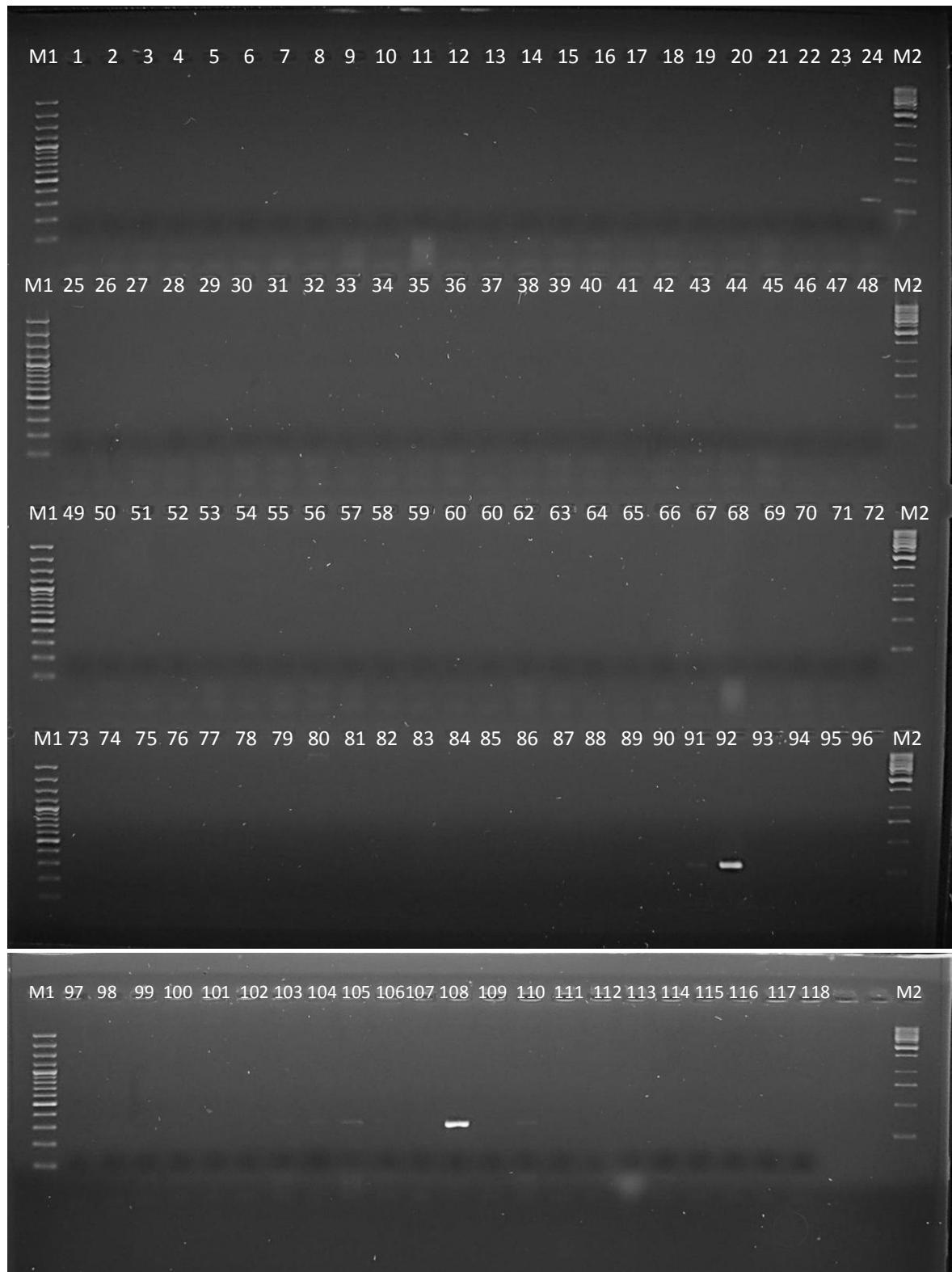
Pril. A5: Reakcija PCR za identifikacijo izolatov vrste *V. nonalfafae*



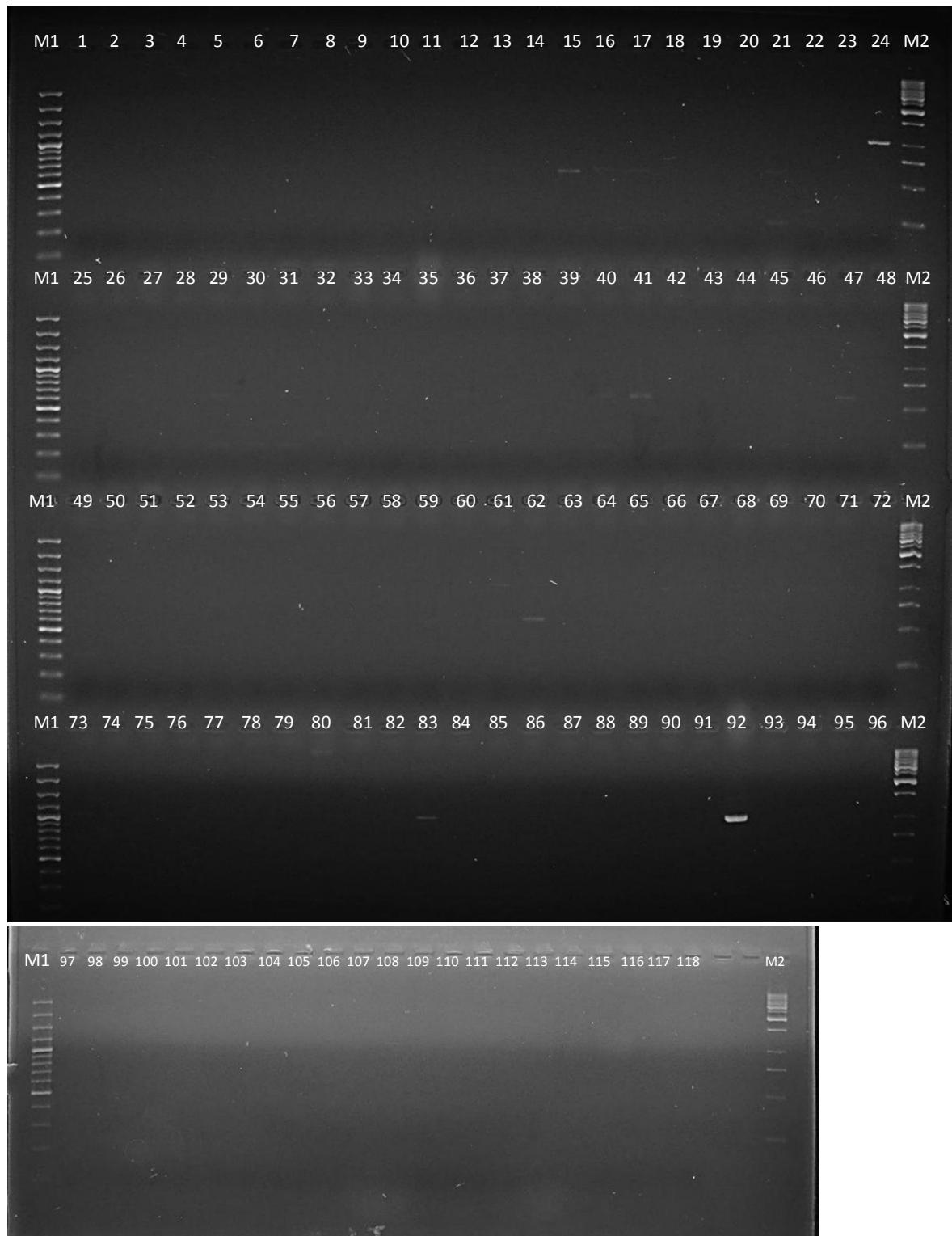
Pril. A6: Reakcija PCR za identifikacijo vrst *V. nubilum*



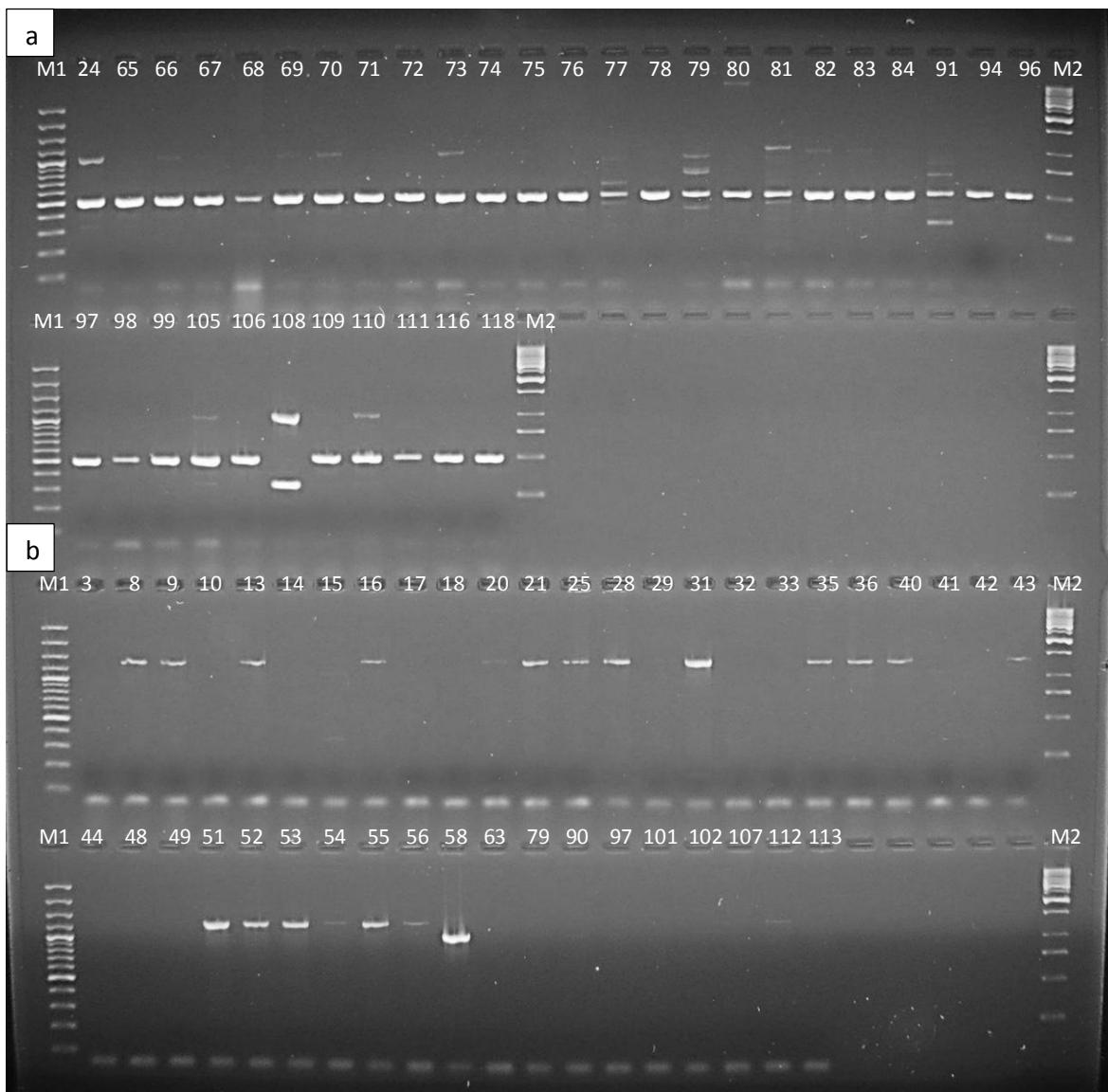
Pril. A7: Reakcija PCR za identifikacijo izolatov vrste *V. tricorpus*



Pril: A8: Reakcija PCR za identifikacijo lokusa Vrste A1

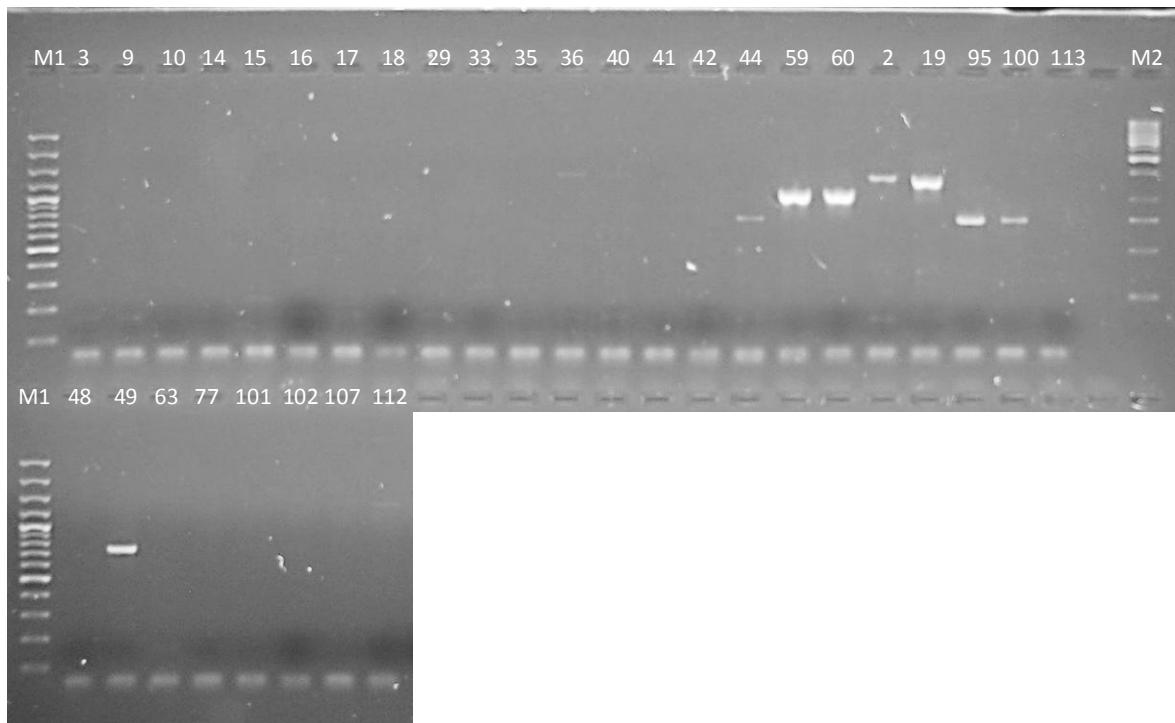


Pril. A9: Reakcija PCR za identifikacijo lokusa Vrste D1



Pril. A10: Multiplex reakcija PCR:

- za ločevanje linij *V. longisporum* od vrste *V. dahliae*
- za razločitev vrst *V. albo-atrum*, *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*

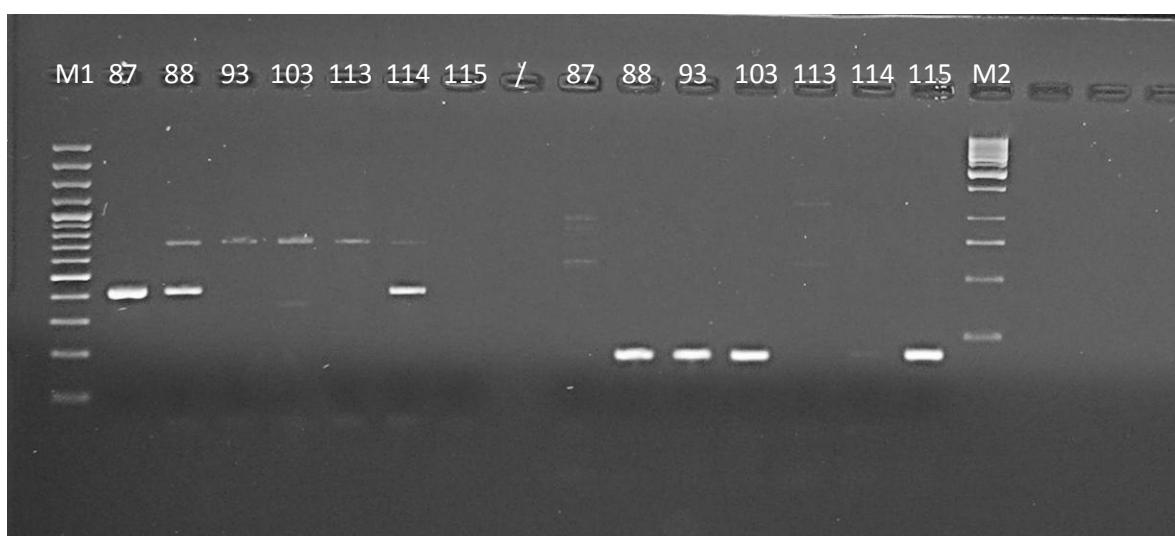


Pril. A11: Druga multiplex reakcija PCR za razločitev vrst *V. albo-atrum*, *V. alfalfae* in *V. nonalfalfa*

59 in 60: kontroli *V. alfalfa*

2 in 19: kontroli *V. nonalfalfa*

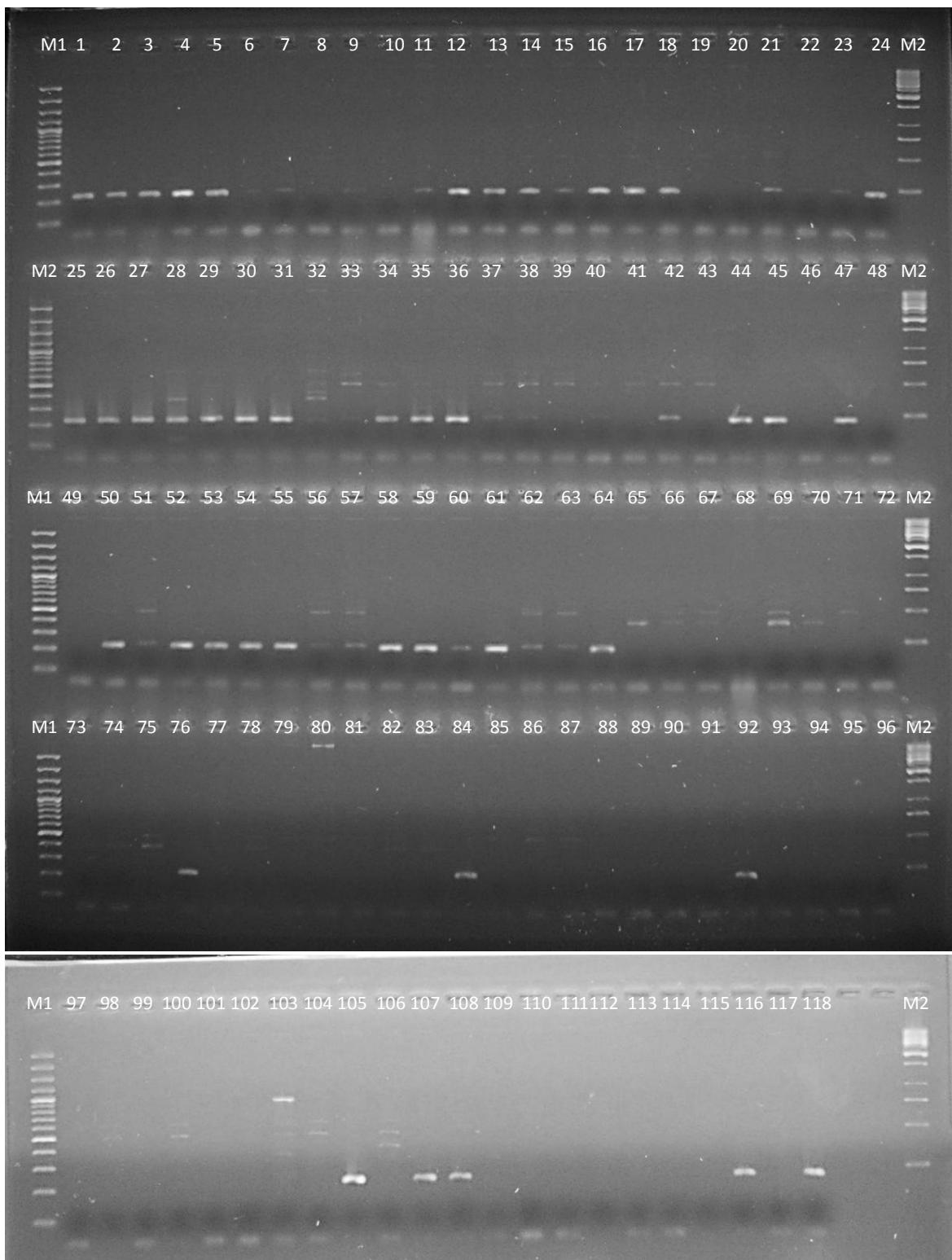
95 in 100: kontroli *V. albo-atrum*



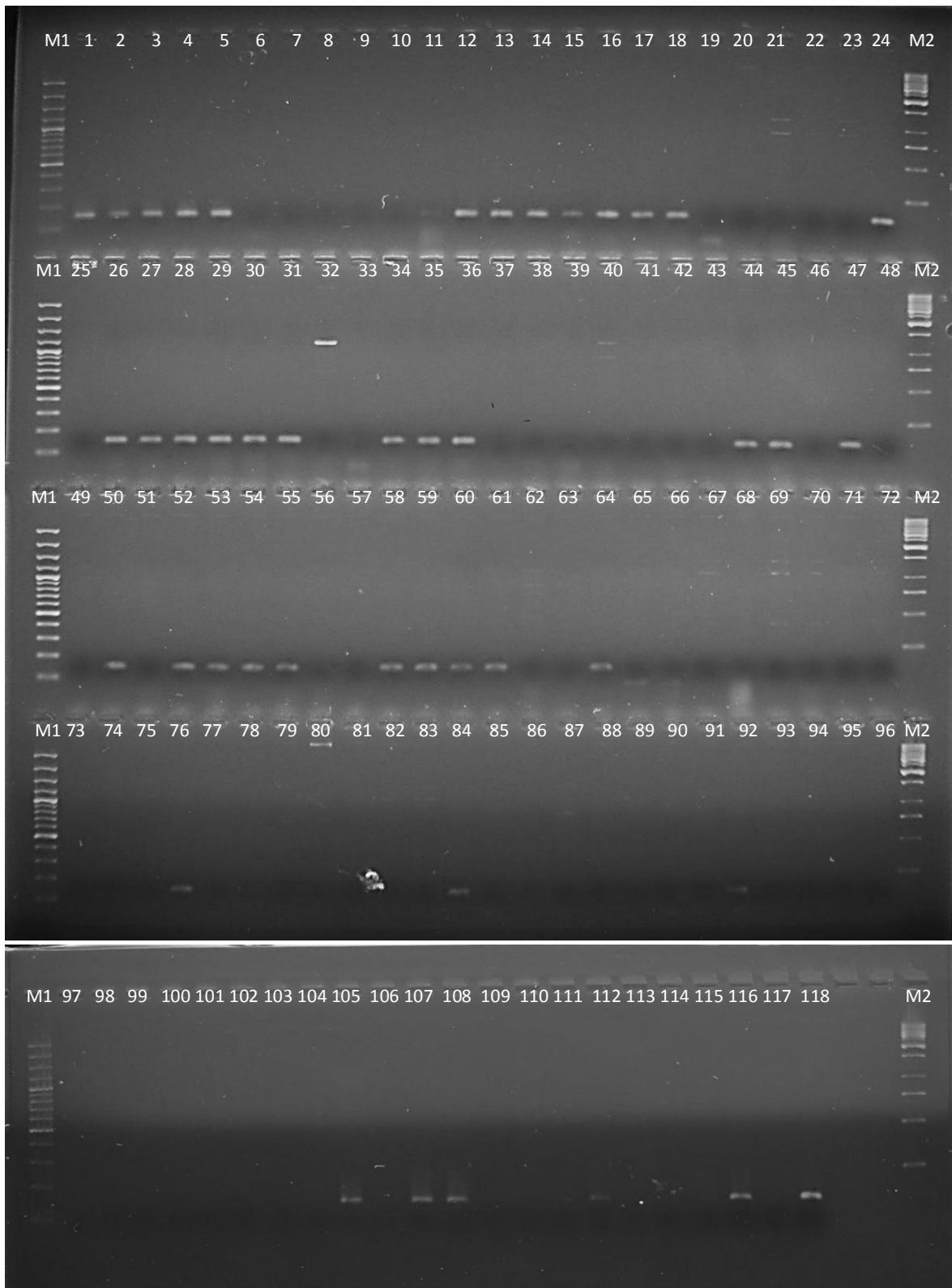
Pril. A12: Reakciji PCR za potrditev izolatov vrst *V. tricorpus* in *V. isaacii*

## PRILOGA B

Slike elektroforetskih gelov reakcij PCR za pomnoževanje markerjev SCAR6-2, ki pomnožijo fragment AFLP pri izolatih letalnega patotipa



Pril. B1: Reakcija PCR za pomnoževanje markerja SCAR6-2\_1



Pril. B2: Reakcija PCR za pomnoževanje markerja SCAR6-2\_2

## PRILOGA C

Podatki o identifikaciji izolatov v podatkovni zbirki NCBI; podani so rezultati z najvišjo vrednostjo S

Št. vzorca	Izolat	Identificirana vrsta v podatkovni zbirki NCBI	Identifikacija oznaka zaporedja	Podatki o ujemaju s podatkovno zbirko			
				Dolžina regije [bp]	Vrednost S	Identičnost	Vrzeli
1	P10	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	459	848	459/459, 100%	0/459
2	P114/1	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	491	907	491/491, 100%	0/491
3	P34/1	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
4	P15	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1 512	515	946	514/515, 99%	0/515
5	P55	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	490	905	494/490, 100%	0/490
6	P83	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	488	902	488/488, 100%	0/488
7	jun/99	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	488	902	488/488, 100%	0/488
8	14/93	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	490	905	490/490, 100%	0/490
9	15/98	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	511	944	511/511, 100%	0/511
10	P84/2	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
11	16/00	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
12	T2	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	945	514/515, 99%	0/515

13	TABOR 6	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
14	KV11 URŠIČ	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	475	701	443/475, 93%	3/475
15	Ciz/DED	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
16	BIZ	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
17	VranBis09	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	937	512/514, 99%	1/514
18	Sent4	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
19	MO 3	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
20	OCer	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
21	zup	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
22	Rec91	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
23	KRES98	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	491	907	491/491, 100%	0/491
24	CIG3	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	516	953	516/516, 100%	0/516
25	1985a	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515

26	11041	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
27	11055	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
28	11047	Nismo pridobili kvalitetnega zaporedja za primerjavo	/	/	/	/	/
29	11097	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
30	11100	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	489	904	489/489, 100%	0/489
31	1974	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	486	893	485/486, 100%	0/486
32	298099	Sarocladium strictum strain NCCPF-106011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KF675771.1	549	1015	549/549, 100%	0/549
33	298100	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	513	941	512/513, 99%	1/513
34	298101	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
35	298102	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
36	11052	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	491	907	491/491, 100%	0/491
37	1953	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	488	902	488/488, 100%	0/488
38	298092	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
39	298095	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	489	905	489/489, 100%	0/489
40	Sol	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515

41	CBS 393.91	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
42	kum	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
43	Surf	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	513	948	513/513, 100%	0/513
44	11077	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
45	11081	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
46	CBS 102.464	Verticillium albo-atrum strain VICVaa1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KC592083.1	489	898	488/489, 99%	0/489
47	CBS 241.82	Verticillium albo-atrum isolate Ms107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900212.1	516	948	515/516, 99%	0/516
48	CBS 454.51	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	512	946	512/512, 100%	0/512
49	CBS 682.88	Verticillium albo-atrum strain VICVaa1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KC592083.1	501	913	499/512, 99%	2/501
50	11066	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
51	T 179	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
52	CBS 321.91	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
53	AR01/067	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514

54	AR0/140	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
55	AR01/JS1	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	511	944	511/511, 100%	0/511
56	PD 83/53a	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
57	PD 2000/4186a	Verticillium albo-atrum genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: VA001	dbj AB458830.1	527	968	526/527, 99%	0/527
58	Luc	Verticillium albo-atrum isolate Ms107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900212.1	515	952	515/515, 100%	0/515
59	41	Verticillium albo-atrum isolate Ms107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	ID: gb FJ900212.1	515	952	515/515, 100%	0/515
60	CBS 392.91	Verticillium albo-atrum isolate Ms107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900212.1	516	953	516/516, 100%	0/516
61	107	Verticillium albo-atrum isolate Ms107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900212.1	518	957	518/518, 100%	0/518
62	314193	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
63	340646	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	514	950	514/514, 100%	0/514
64	Kanada 11	Verticillium albo-atrum isolate Ms107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900212.1	512	946	512/512, 100%	0/512

65	JKG 2	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	516	924	511/516, 99%	2/516
66	JKG1	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	517	955	517/517, 100%	0/517
67	JKG 8	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	517	955	517/517, 100%	0/517
68	A56	Uncultured Debaryomyces clone CEPolynesia53 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KF768311.1	613	1133	613/613, 100%	0/613
69	DJK	Verticillium dahliae isolate Te969 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900217.1	520	961	520/520, 100%	0/520
70	MAI	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	517	955	517/517, 100%	0/517
71	Mint	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	509	941	509/509, 100%	0/509

72	GAJ09	Verticillium dahliae isolate Te969 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900217.1	519	959	519/519, 100%	0/519
73	PDRENU/MAR	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	517	955	517/517, 100%	0/517
74	CasD	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	515	952	515/515, 100%	0/515
75	KresD	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	516	953	516/516, 100%	0/516
76	MoD	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	517	955	517/517, 100%	0/517
77	Ledina09	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1 Verticillium dahliae var. longisporum strain Ve007 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	emb HE972032.1  gb GQ495792.1	520	955	519/520, 99%	0/520

78	Oset	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	517	955	517/517, 100%	0/517
79	12099	Paecilomyces sp. Cs-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb EU328187.1	565	1044	565/565, 100%	0/565
80	12042	Verticillium dahliae isolate Te969 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900217.1	520	961	520/520, 100%	0/520
81	PAPmb	Gibellulopsis nigrescens strain BM-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ534578.1	543	987	543/543, 100%	0/543
82	PAP	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	518	957	518/518, 100%	0/518
83	Pap99	Verticillium dahliae isolate Te969 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900217.1	519	959	519/519, 100%	0/519
84	Pap2008	Verticillium dahliae isolate Te969 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900217.1	519	959	519/519, 100%	0/519
85	CBS 171.80	Verticillium fungicola strain dd08015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ810136.1	523	959	522/523, 99%	1/523
86	CBS 456.51	Verticillium albo-atrum isolate Ms107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900212.1	518	935	514/518, 99%	0/518

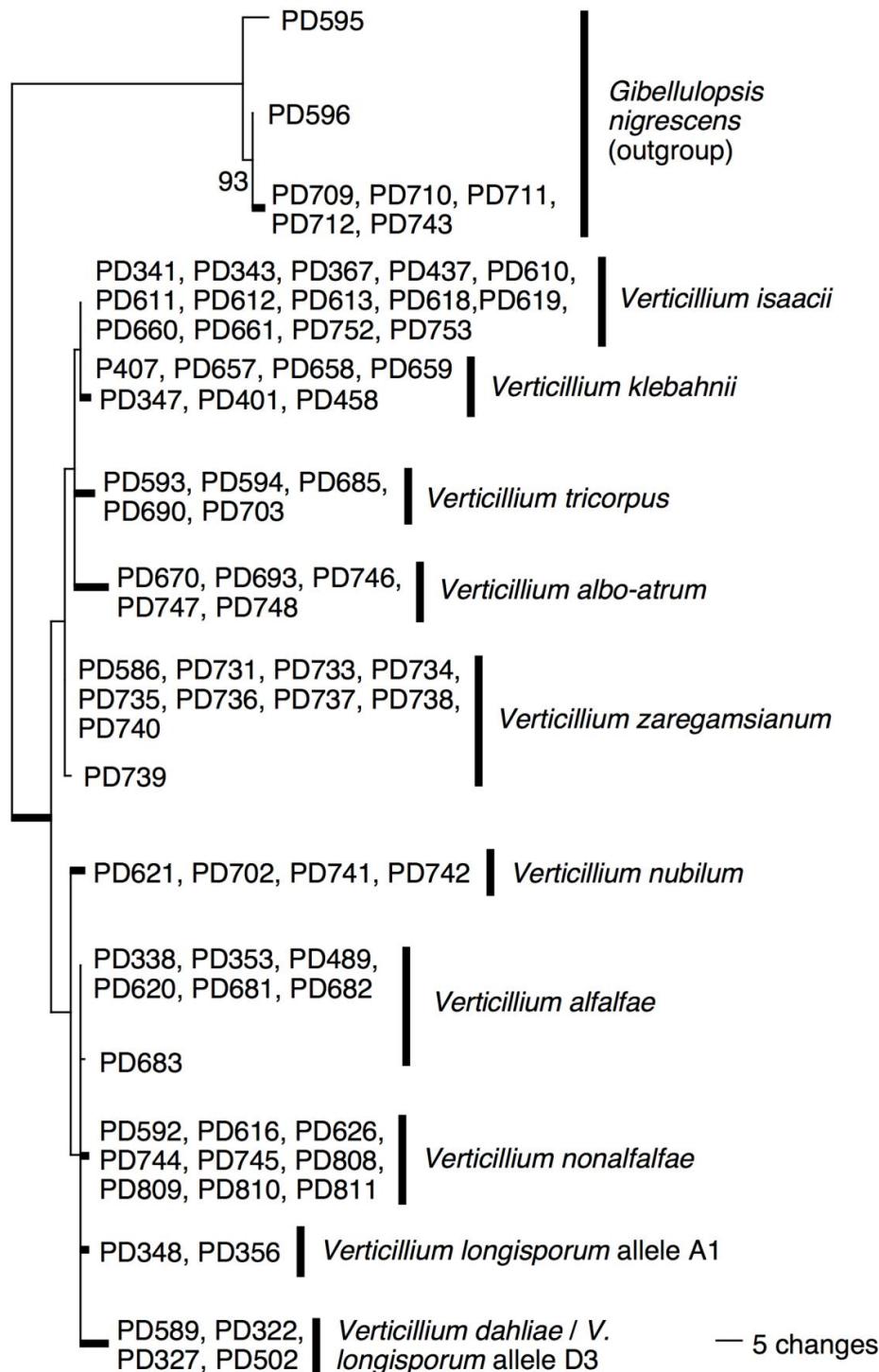
87	CBS 227.84	Verticillium tricorus strain Ve010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb GQ495793.1	518	935	514/518, 99%	0/518
88	JKG 20	Verticillium tricorus strain Ve010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb GQ495793.1	516	953	516/516, 100%	0/516
89	CBS 122.175	Nismo pridobili kvalitetnega zaporedja za primerjavo	/	/	/	/	/
90	B 560	Sordariomycetes sp. E10513b 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb JN572050.1	539	979	536/539, 99%	0/539
91	CBS 123.176	Uncultured Verticillium genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone RRD03	emb HE977537.1	542	996	541/542, 99%	0/542
92	CBS 110218	Verticillium dahliae var. longisporum strain Ve007 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb GQ495792.1	519	959	519/519, 100%	0/519
93	115	Verticillium tricorus strain Ve010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb GQ495793.1	518	957	518/518, 100%	0/518
94	14V	Verticillium dahliae isolate Le1344 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb GU461629.1	519	959	519/519, 100%	0/519
95	110	Verticillium albo-atrum strain VICVaa1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KC592083.1	500	924	500/500, 100%	0/500
96	141	Verticillium dahliae isolate Le1078 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900167.1	526	972	526/526, 100%	0/526
97	3V	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	gb KJ018789.1	516	946	515/516, 99%	1/516

98	166	Verticillium albo-atrum strain VICVaa1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KC592083.1	487	900	487/487, 100%	0/487
99	802-1	Verticillium albo-atrum strain CBS 745.83 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb DQ825979.1	361	662	360/361, 99%	0/361
100	112	Verticillium albo-atrum strain VICVaa1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KC592083.1	500	924	500/500, 100%	0/500
105	V-138 I	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	518	957	518/518, 100%	0/518
106	V-176 I	Verticillium dahliae isolate Le1344 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb GU461629.1	521	963	521/521, 100%	0/521
107	PETROL	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	515	952	515/515, 100%	0/515
108	PD330	Verticillium longisporum isolate SDV2066 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	gb KC834718.1	299	507	291/299, 97%	2/299
109	PD335	Verticillium dahliae isolate Te969 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb FJ900217.1	519	959	519/519, 100%	0/519
110	PD584	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	517	955	517/517, 100%	0/517

111	PD693	Verticillium albo-atrum strain VICVaa1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KC592083.1	500	924	500/500, 100%	0/500
112	SN 10	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	490	905	490/490, 100%	0/490
113	ČEH	Acremonium nepalense strain LZ1 genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate LZ1	emb HG764576.1	469	859	468/469, 99%	1/469
114	EX5 F7	Verticillium tricorpus strain Ve010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb GQ495793.1	511	922	507/511, 99%	0/511
115	EX5 F8	Verticillium tricorpus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Vtr1	emb HE972036.1	511	944	511/511, 100%	0/511
116	A III 25	Verticillium dahliae strain DB110712 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	gb JX308315.1	476	880	476/476, 100%	0/476
117	B 23	Verticillium albo-atrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Va1	emb HE972032.1	450	824	449/450, 99%	1/450
118	PD 337	Verticillium longisporum strain BC13091625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Verticillium dahliae isolate C9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	gb KJ018789.1  gb HQ703411.1	480	887	480/480, 100%	0/480

## PRILOGA D

Slika filogenetskega drevesa, ki so ga na podlagi analize regije ITS 74 izolatov izdelali Inderbitzin in sod. (2011). Drevo je bilo izdelano z algoritmom »maximum parsimony«.



## PRILOGA E

Slika filogenetskega drevesa, ki so ga na podlagi analize štirih lokusov (kodirajoči gen za aktin, elongacijski faktor 1-alfa, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza in triptofan sintaza)

77 izolatov izdelali Inderbitzin in sod. (2011). Drevo je bilo izdelano s pristopom Bayesian. »Clade« pomeni skupina.

