

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Irena KRANJEC

**RAZNOLIKOST GENOV ZA DESATURAZO IN
ELONGAZO PRI GLIVAH IN NJIHOVA
PRIMERENOST ZA FILOGENETSKE ŠTUDIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Irena KRANJEC

**RAZNOLIKOST GENOV ZA DESATURAZO IN ELONGAZO PRI
GLIVAH IN NJIHOVA PRIMERNOST ZA FILOGENETSKE ŠTUDIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE DIVERSITY OF THE GENES FOR DESATURASE AND
ELONGASE IN FUNGI AND THEIR SUITABILITY FOR
PHYLOGENETIC STUDIES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. Dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico pa dr. Martino Turk.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Blagajana Herzog-Velikonja
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: prof. dr. Ana Plemenitaš
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo
Članica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: dr. Martina Turk
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 13.2. 2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Irena KRANJEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 575.8:582.28(043.2)=163.6
KG glive/filogenija/desaturaza/elongaza/PCR
AV KRANJEC, Irena
SA GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentor)/TURK, Martina (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN RAZNOLIKOST GENOV ZA DESATURAZO IN ELONGAZO PRI GLIVAH IN NJIHOVA PRIMERNOST ZA FILOGENETSKE ŠTUDIJE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, str. 81, pregl.8, sl. 12, pril. 3, vir. 173
IJ sl
JI sl/en
AI Sistematika gliv je zaradi zapletenih strategij razmnoževanja in različnih življenjskih oblik zelo kompleksna in v precejšnji meri nedorečena. Veliko taksonomije še vedno sloni na tradicionalnih morfoloških in biokemijskih metodah, ki so zamudne, težavne in dajo variabilne rezultate. Obstajajo različni sistematski projekti, ki temeljijo na nukleotidnih zaporedjih različnih lokusov DNA. Tu se uveljavljajo sodobni pristopi, kot so molekularne tehnike, saj so povsod uporabne. V ospredje so prišle metode, temelječe na tehnikah verižne reakcije s polimerazo (PCR). Začeli so iskati in ugotavljati uporabnost različnih lokusov, kot so nukleotidno zaporedje rDNA male in velike ribosomske podenote in nukleotidna zaporedja genov za RNA-polimeraze, elongacijski faktor 1α in geni za različne strukturne proteine (aktin, β -tubulin), saj je za popolno določitev taksonomskih odnosov potrebna kombinacija večih označevalcev. V okviru diplomskega dela smo preverjali hipotezo, da sta delni zaporedji genov encimov elongaze in Δ^9 -desaturaze primerno ohranjena in vsebujeta dovolj informacij za rekonstrukcijo filogenije izbranih gliv. S pomočjo začetnih oligonukleotidov smo z verižno reakcijo s polimerazo določili delno nukleotidno zaporedje genov za Δ^9 -desaturazo in elongazo pri izbranih glivah in ugotovili, da sta izbrana gena razširjena v vseh izbranih glivah iz različnih kraljestev. Določili smo tudi ohranjenost in vsebnost informacij nukleotidnih zaporedij za rekonstrukcijo filogenije izbranih gliv in ugotovili, da sta primerna za rekonstrukcijo filogenije, saj sta primerno ohranjena in pa tudi dovolj variabilna za ločevanje gliv. Z njimi smo izdelali filogenetska drevesa in jih primerjali med seboj in z drevesi, izdelanimi na podlagi regij ITS in 26S rDNA (LSU). Pri določanju območja uporabe filogenetskega označevalca smo ugotovili, da je le-ta za elongazo na splošno primeren za določanje odnosov izbranih sevov na apikalnem taksonomskem ravni; na ravni vrst in rodov, filogenetski označevalca za Δ^9 -desaturazo pa le na ravni vrst. Rezultati regij uporabe izbranih molekularnih označevalcev se ujemajo s pričakovanimi. Pojav združevanja sevov po gručinah razlagamo z večjim razlikovanjem v nukleotidnem zaporedju izbranih filogenetskih označevalcev genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo, saj sta primerna za ločevanje apikalnih taksonomskih ravni. Ti izsledki predstavljajo še en korak na poti k reševanju neznanih filogenetskih odnosov gliv.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 575.8:582.28(043.2)=163.6
CX Fungi/phylogeny/elongase/desaturase/PCR
AU KRANJEC, Irena
AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/TURK, Martina (cosupervisor)
PP SI-100 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, department of Biology
PY 2008
TI The diversity of the genes for desaturase and elongase in fungi and their suitability for phylogenetic studies
DT Graduation thesis
NO XII, p. 81, tab.8, fig. 12, ann. 3, ref. 173
LA SI
AL sl/en
AB Fungal systematics is with complicated strategies of propagation and different life forms very complex and in many ways unknown. A lot of taxonomy is still based upon traditional morphological and biochemical methods, which are time-consuming, difficult and produce variable results. There are different projects of fungal systematics, which base on nucleotide sequences of different loci on DNA. To the front have come contemporary methods, such as usable molecular techniques. Methods based on Polymerase chain reaction (PCR), have enabled searching and determining the usefulness of different loci, such as sequences of rDNA of small and large ribosomal subunit, nucleotide sequence of genes of RNA-polymerase, elongation factor 1 α and genes for varying structural proteins (actin, β -tubulin), since for full determination of taxonomic relations a combination of different markers is needed. The present study focused on the partial nucleotide sequences of genes for fatty acid elongase and Δ^9 -desaturase and their suitability for the reconstruction of phylogeny of selected fungal species. Partial DNA sequences of the genes for fatty acid elongase and Δ^9 -desaturase were determined and were found in all selected fungal species, as expected. The conservation and amount of information of sequences for the reconstruction of phylogeny of selected fungal species have been determined. It is suitable for the reconstruction of phylogeny of selected fungal species, because they are conserved and variable enough. For determination of taxonomic ranks of each selected molecular marker a comparison of phylogenetic trees based on ITS regions and 26S rDNA (LSU) have been made. Fatty acid elongase is suitable to illustrate phylogeny of lower taxonomic levels such as genus and species, while Δ^9 -desaturase only for the species level. These results comply with our expectations. This knowledge contributes to a better reconstruction of phylogeny of selected fungal species and then taxonomy.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
Slovarček	XI
1. UVOD IN NAMEN DELA.....	1
1.1. UVOD	1
1.2. NAMEN DELA	2
2. PREGLED OBJAV.....	3
2.1. TAKSONOMIJA GLIV	3
2.1.1. Filogenetski sistem	3
2.1.2. Določevanje gliv z morfološkimi metodami	7
2.1.3. Določevanje gliv z fiziološkimi metodami	7
2.1.4. Določevanje gliv z biokemijskimi metodami	7
2.1.5. Določevanje gliv z molekularno biološkimi metodami	8
2.2. FILOGENETSKI OZNAČEVALCI	10
2.2.1. Jedrna ribosomska DNA (rDNA)	11
2.2.1.1. Sestava jedrne ribosomske DNA	11
2.2.1.2. Območja občutljivosti molekulskih označevalcev	11
2.2.2. Označevalci mitohondrijske DNA (mtDNA)	12
2.2.3. Ostali jedrni filogenetski označevalci	12
2.2.3.1. Aktin	12
2.2.3.2. Elongacijski faktor-1 α	13
2.2.3.3. B-tubulin	13
2.2.3.4. RNA polimeraza II	13
2.2.4. Multigenske študije	13
2.3. NOVI FILOGENETSKI OZNAČEVALCI	14
2.3.1. Desaturaze maščobnih kislin	15
2.3.1.1. Sestava	15
2.3.1.2. Vloga desaturaz	17
2.3.2. Elongaze	17
2.4. GLIVE, UPORABLJENE V RAZISKAVI	18
3. MATERIALI IN METODE.....	22
3.1. MIKROORGANIZMI IN POGOJI RASTI	23

Glive	23
Gojišče in gojenje	24
3.2. IZOLACIJA GENOMSKE DNA	25
3.3. AGAROZNA ELEKTROFOREZA DNA	26
3.4. DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOV	27
3.4.1. Začetni oligonukleotidi	27
3.4.2. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	28
Gen za Δ^9 -desaturazo	28
Gen za elongazo	29
Notranji prepisni vmesnik ITS rDNA	29
3.5. ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	30
3.6. FILOGENETSKE ANALIZE	31
3.6.1. Metode	31
3.6.1.1. Združevanje najbližjega soseda (»neighbour joining«)	31
3.6.1.2. Program MrBayes	31
3.6.1.3. Določanje informativnih mest	32
4. REZULTATI.....	33
4.1. PORAVNAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	33
4.2. VELIKA PODENOTA RIBOSOMSKE DNA (LSU rDNA)	33
4.3. FILOGENETSKO DREVO ITS rDNA	37
4.4. GEN ZA ELONGAZO (<i>ELO1</i>)	40
4.5. GEN ZA Δ^9 -DESATURAZO (<i>OLE1</i>)	43
4.6. POVZETEK STATISTIKE DELNIH ZAPOREDIJ IZBRANIH GENOV	46
4.7. GRUČE SEVOV IZBRANIH FILOGENETSKIH OZNAČEVALCEV	47
4.8. POVZETEK STATISTIKE CELOTNIH ZAPOREDIJ IZBRANIH GENOV	48
Δ^9 -desaturaza (<i>OLE1</i>)	48
Elongaza (<i>ELO1</i>)	49
5. RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1. RAZPRAVA	51
5.1.1. Poravnava nukleotidnih zaporedij in variabilnost	51
5.1.2. Pregled združevanja nukleotidnih zaporedij izbranih filogenetskih označevalcev	52
5.1.3. Določitev primernosti celotnih zaporedij genov za elongazo in Δ^9-desaturazo	53
5.1.4. Določitev taksonomske ravni občutljivosti filogenetskega označevalca	53
5.1.4.1. Velika ribosomska podenota (LSU)	54
5.1.4.2. Znotrajprepisna vmesniška regija (ITS)	55
5.1.4.3. Gen za elongazo (<i>ELO1</i>)	55
5.1.4.4. Gen za Δ^9 -desaturazo (<i>OLE1</i>)	56
5.2. SKLEPI	57
6. POVZETEK.....	58
7. VIRI.....	59
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Tabela 1: Regije uporabe posameznega molekulskega označevalca oz. gena (Hwang in Kim, 1999).....	10
Tabela 2: Pregled taksonomske razporeditve izbranih gliv.....	20
Tabela 3 : Seznam preučevanih sevov.....	23
Tabela 4: Podatki o uporabljenih filogenetskih označevalcih in podprtost skupin v drevesih izračunanih po metodi združevanja najbližjega sosedu in s pomočjo programa MrBayes.....	46
Tabela 5: Ohranjenost nukleotidnih zaporedij gena za elongazo znotraj posameznih grozdov.....	47
Tabela 6: Ohranjenost nukleotidnih zaporedij gena za desaturazo znotraj posameznih grozdov.....	47
Tabela 7: Podatki o uporabljenem filogenetskem označevalcu (<i>OLE1</i>).....	49
Tabela 8: Podatki o uporabljenem filogenetskem označevalcu (<i>ELO1</i>).....	50

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Filogenetsko drevo kraljestva <i>Fungi</i> , prikaz glavnih taksonov (Hibett s sod., 2007).....	4
Slika 2: Filogenetsko drevo debla <i>Ascomycota</i> (Hibett s sod., 2007).....	5
Slika 3: Filogenetsko drevo debla <i>Basidiomycota</i> (Hibett s sod., 2007).....	6
Slika 4: Shematska predstavitev jedrne ribosomske rDNA (Fernandez-Espinar s sod., 2000).....	11
Slika 5: Shema delovnih postopkov.....	22
Slika 6: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij LSU rDNA (pridobljenih iz baze podatkov GenBank) z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (» <i>neighbour joining</i> «).....	35
Slika 7: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij LSU rDNA (pridobljenih iz baze podatkov GenBank) s programom MrBayes (število generacij 2×10^6).....	36
Slika 8: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (» <i>neighbour joining</i> «).....	38
Slika 9: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA s programom MrBayes (število generacij 2×10^6).....	39
Slika 10: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za elongazo <i>ELO1</i> z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (» <i>neighbour joining</i> «).....	41
Slika 11: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za elongazo <i>ELO1</i> s programom MrBayes (število generacij 2×10^6).....	42
Slika 12: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za desaturazo <i>OLE1</i> z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (» <i>neighbour joining</i> «).....	44
Slika 13: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za elongazo <i>OLE1</i> s programom MrBayes (število generacij 2×10^6).....	45

KAZALO PRILOG

PRILOGA A

Delna zaporedja gena za elongazo (*ELO1*).

PRILOGA B

Delna zaporedja gena za Δ^9 -desaturazo (*OLE1*).

PRILOGA C

Delna zaporedja znotrajprepisne vmesniške regije (ITS) ribosomske DNA.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- AFTOL – projekt izboljševanja razumevanja evolucije kraljestva gliv (»Assembling the Fungal Tree of Life«)
- bp – bazni par (v DNA)
- ELO1*, *ELO2*, *ELO3* – geni za tri različne elongaze maščobnih kislin v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*
- ETS – zunanji prepisni vmesnik (»external transcribed spacer«)
- FDB – projekt iskanja za identifikacijo uporabnih delov DNA v glivnem kraljestvu (»Fungal DNA Barcoding«)
- HTE – hipotetična taksonomska enota, nahaja se v srednjem delu filogenetskega drevesa, ki predstavlja izpeljane predniške enote
- IGS – medgenski vmesnik ribosomske DNA (»ribosomal intergenic spacer«)
- ITS – notranji prepisni vmesnik ribosomske DNA (»internal transcribed spacer«)
- LSU – velika podenota ribosomske DNA (23-28S LSU) (»large ribosomal subunit«)
- mtDNA – mitohondrijska DNA
- NTS – neprepisni vmesnik (»non-transcribed spacer«)
- OLE1* – gen za Δ^9 -desaturazo maščobnih kislin v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*
- OTE – operacijska taksonomska enota oz. delovna taksonomska enota, nahaja se v končnem delu filogenetskega drevesa, ki predstavlja sodobne, še živeče taksone
- PCR – verižna reakcija s polimerazo (»Polymerase Chain Reaction«)
- YNB – sintetsko definirano gojišče (»Yeast Nitrogen Base«)
- PCR-fingerprinting – tehnika prstnega odtisa DNA
- SSU – majhna podenota ribosomske DNA (16-18S SSU) (»small ribosomal subunit«)
- SSCP – polimorfizem konformacije enojne verige (»Single Strand Conformation Polymorphism«)
- AFLP – polimorfizem dolžin namnoženih fragmentov (»Amplified Fragment Length Polymorphism«)

SLOVARČEK

- Anamorf – nespolna oblika življenjskega cikla; mitosporne glive, ki jih uvrščamo med *Fungi imperfecti* (*Deuteromycotina*).
- Apikalna raven – višja taksonomska raven, predstavlja ravni populacij, vrst in rodov.
- Bazalna raven – osnovna taksonomska raven, predstavlja ravni kraljestva, debla in poddebla.
- bazidiomicete – splošni izraz za celotno deblo *Basidiomycota*.
- Evolucijska razdalja (»*evolutionary distance*«) – število nukleotidnih in aminokislinskih zamenjav ali katerih koli drugih sprememb, ki so se zgodile vzdolž veje in predstavljajo potek evolucije. Za potrebe diplome se kot definicijo omejujemo na spremembe v številu nukleotidov.
- Filogenetsko drevo – grafični prikaz reda razvejitve in evolucijske oddaljenosti izbranih taksonov.
- Gruča (»*clade*«) – vsi potomci skupnega prednika so združeni v skupno gručo.
- Informativna mesta (»*informative characters*«) – nukleotidna mesta v genomu, znotraj variabilnih mest, ki določijo specifično razliko med vzorci, ki je nastala z evolucijo. Nukleotidno mesto je filogenetsko informativno le če preferira določen nabor filogenetskih dreves izmed vseh možnih dreves.
- Izogen – gen za isti produkt, ki se pojavlja v dveh oblikah ali več. Ti se rahlo razlikujeta, a sta obe funkcionalni.
- Kladogram – prikaz reda razvejitve izbranih taksonov brez prikazanih evolucijskih razdalj ali skupnih prednikov.
- Ortologi – oz. ortologni geni so prisotni v različnih vrstah in so podobni zaradi skupnega izvora, nastajajo s speciacijo.
- Osmofil/osmotolerant – organizem sposoben rasti pri nizki vodni aktivnosti (a_w) 0'85 ali manj (to je 17% NaCl oz. 50% dodane glukoze v mediju); osmofilni in osmotolerantni organizmi se delijo na kserofile/kserotolerantne in halofile/halotolerantne glede snovi v okolju, ki povzročajo nizko vodno aktivnost. Ta je za halofile/halotolerantne NaCl, za kserofile/kserotolerantne pa je to lahko nizka temperatura, magnezijeve in druge soli in sladkorji.
- Ohranjena mesta (»*invariant characters*«) – nukleotidna mesta v genomu, ki imajo isti nukleotid na izbranem mestu. Nahajajo se znotraj popolnih mest.
- Paralog – oz. paralogni gen nastane z duplikacijo gena v organizmu, ta zaseda dve različni mesti v istem genomu.
- Popolna mesta (»*complete characters*«) – nukleotidna mesta v genomu, ki so prisotna pri vseh preučevanih vzorcih.
- Posteriorna verjetnost (»*posterior probability*«) – predstavlja pogojno verjetnost nastalega drevesa pri določenih opažanjih oz. pogojih. Za določevanje le-te se uporablja Bayes-ov teorem.
- Razcepišča (»*internal nodes*«) – notranje točke drevesa, predel, ki predstavlja zadnjega skupnega prednika taksonov, ki so nad razcepiščem.
- Sinapomorfija – znaki skupni le potomcem istega prednika monofiletske skupine.

- Teleomorf – spolna oblika življenjskega cikla glive; v odvisnosti od tipa reproduktivnih struktur vrsto uvrščamo med hitridomicetne, zigomycetne, askomicetne in bazidiomicetne glive.
- Variabilna mesta (»*variable characters*«) – so lahko informativna ali neinformativna. Nukleotidna mesta v genomu, znotraj popolnih mest, ki se med vzorci/vrstami razlikujejo v tipu nukleotidov na istem mestu.
- Vrednost metode vezanja (»*bootstrap*«) – je računska tehnika za oceno statistike, kjer ni znana distribucija. Uporablja se za oceno stopnje zaupanja filogenetskim hipotezam. Uvrščamo jo med metode ponovnega vzorčenja, saj ocenjuje distribucijo vzorčenja s ponavljajočim vzorčenjem podatkov iz originalnega nabora podatkov. Med drugim se uporablja pri distančni metodi združevanja najbližjega soseda.
- Zanesljivost (»*reliability*«) – verjetnost, da so taksoni izbranih taksonov vedno člani določenega grozda.
- Zunanje točke oz. razcepišča (»*terminal nodes*«) – končni deli filogenetskega drevesa, ki predstavljajo operacijsko taksonomsko enoto. Ti predstavljajo vrste ali višje taksone, populacije, osebke ali gene.
- Notranje točke oz. razcepišča (»*internal nodes*«) – srednji deli filogenetskega drevesa, ki predstavljajo izpeljane predniške enote.
- Zunanjik (»*outgroup*«) – takson filogenetsko bolj oddaljen od vseh posameznikov izbrane notranje skupine, kot so si le-ti med seboj.

1. UVOD IN NAMEN DELA

1.1. UVOD

Sistematika gliv je zaradi zapletenih strategij razmnoževanja in različnih življenjskih oblik zelo kompleksna in v precejšnji meri nedorečena. Veliko taksonomije še vedno sloni na tradicionalnih morfoloških in biokemijskih metodah. Te so zamudne, težavne in dajejo variabilne rezultate. Problem v taksonomiji predstavljajo tudi vrste, ki jih še ne znamo gojiti. Z večjimi novimi sistematičnimi projekti klasifikacije gliv kot je »Assembling the Fungal Tree of Life – AFTOL« in postavljanjem temeljev molekularne identifikacije, kot je projekt »Fungal DNA Barcoding – FDB«, temelječimi na nukleotidnih zaporedjih različnih lokusov DNA, na pomenu hitro pridobivajo tudi sodobni pristopi, saj so molekularne tehnike v nasprotju z ostalimi vsesplošno uporabne.

V zadnjih letih je bil sistem klasifikacije gliv prenovljen z uporabo novih molekularno bioloških tehnik. V ospredje so prišle metode, ki temeljijo na tehnikah verižne reakcije s polimerazo (PCR). Prvi molekularni označevalci uporabljeni v ta namen je bilo nukleotidno zaporedje rDNA male in velike ribosomske podenote, vključno z notranjimi prepisanimi vmesniki (ITS). V evkariontski jedrni DNA se zaporedje za rRNA ribosoma nahaja v tandemskih ponovitvah s številom kopij do 5000. Sestavljajo ga del male podenote imenovane 18S (SSU), in deli velike podenote 26S (LSU), 5,8S in 5S. Omenjene funkcionalne regije so med seboj ločene z vmesniki; medgenski vmesnik (IGS) med dvema ponovitvama 18S in 26S + 5,8S rRNA ter notranjima prepisanimi vmesnikoma (ITS1, ITS2) med 18S in 26S rRNA. Tu so se pojavile prve omejitve, saj regije, ki so določile in razjasnile sorodnost med določenimi taksoni, niso bile uporabne pri določanju sorodnosti med drugimi taksoni. Za reševanje tega problema so v filogenetske namene v okviru projektov kot so FDB, začeli iskati in ugotavljati uporabnost še drugih lokusov, kot so nukleotidna zaporedja genov za RNA-polimeraze, elongacijski faktor 1α in geni za različne strukturne proteine (aktin, β -tubulin). Ugotovili so različno uporabnost le-teh za izbrano taksonomsko raven, med drugim so Tang in sod. (2007) ugotovil, da je za popolno določitev taksonomskih odnosov potrebna kombinacija večih označevalcev. Zastavili smo si vprašanje ali sta encima za modifikacijo maščobnih kislin (Δ^9 -desaturaza in elongaza), ki sta bistvena za vzdrževanje primerne fluidnosti membran in s tem za preživetje v stalno spreminjajočem se okolju, primerna za filogenetske študije.

1.2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil preučiti raznolikost genov za encima Δ^9 -desaturazo in elongazo gliv in ugotoviti njuno primernost za filogenetske študije. Ker izbrana encima igrata pomembno vlogo v celici in sta ključna za vzdrževanje membran v tekočem kristaliničnem stanju smo predpostavili, da sta oba gena prisotna v vseh izbranih glivah. Cilji naše raziskave so bili določitev delnega nukleotidnega zaporedja genov za Δ^9 -desaturazo in elongazo pri izbranih glivah, izdelava filogenetskih dreves na podlagi teh zaporedij in primerjava narejenih dreves med seboj in z drevesi, izdelanimi na podlagi ITS regij in 26S rDNA (LSU). Glede na vlogo, ki jo izbrana encima igrata v celici, smo postavili hipotezo, da je njuna ohranjenost primerno velika in bo vsebovala dovolj informacij za rekonstrukcijo filogenije izbranih gliv, ki pripadajo različnim višjim taksonomskim enotam.

2. PREGLED OBJAV

2.1. TAKSONOMIJA GLIV

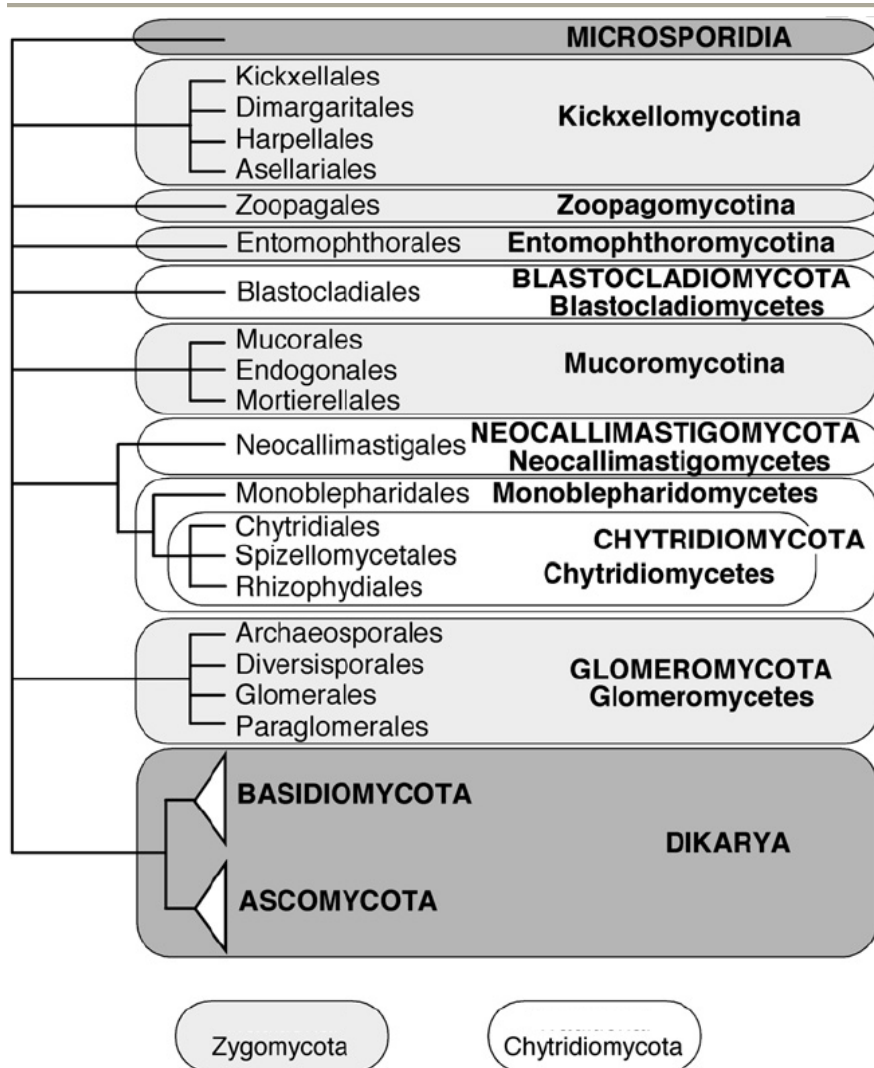
Glive predstavljajo pomemben dejavnik v agronomiji in imajo velik potencial v industriji. Navkljub njihovem pomenu, je naše znanje o njih skopo, saj naj bi jih po ocenah Hawksworth-a (2001) poznali le 5 odstotkov, od skupno 1,5 milijona vrst. Relativno pomanjkljivo je tudi naše znanje o njihovi taksonomiji, raznolikosti vrst in njihovih filogenetskih odnosih.

V zadnjih letih je razvoj novih taksonomskih metod povzročil hiter napredek glivne taksonomije, čeprav velik del le-te še vedno sloni na tradicionalnih metodah, ki so se zaradi posebnosti glivnega kraljestva skozi desetletja razvile v povsem samosvojo in pogosto konzervativno raziskovalno področje. Taksonomija in filogenija gliv tako temeljita na primerjalnih analizah morfoloških, ontogenetskih in biokemijskih podatkov (Hawksworth, 1991). Danes je molekularna sistematika gliv zrela disciplina z uveljavljeno uporabo multilokusnih podatkovnih zbirk, širšim vzorčenjem taksonov in doslednimi analitskimi pristopi. Z uporabo le-teh je bilo razjasnenih veliko filogenetskih odnosov in povezav med anamorfi in teleomorfi. Vedno bolj se uveljavljajo v glivni taksonomiji tudi spletne podatkovne zbirke kot so GenBank, Tree of Life Web Project, Myconet, MycoBank in Index Fungorum (Hibbett, 2007).

2.1.1. Filogenetski sistem

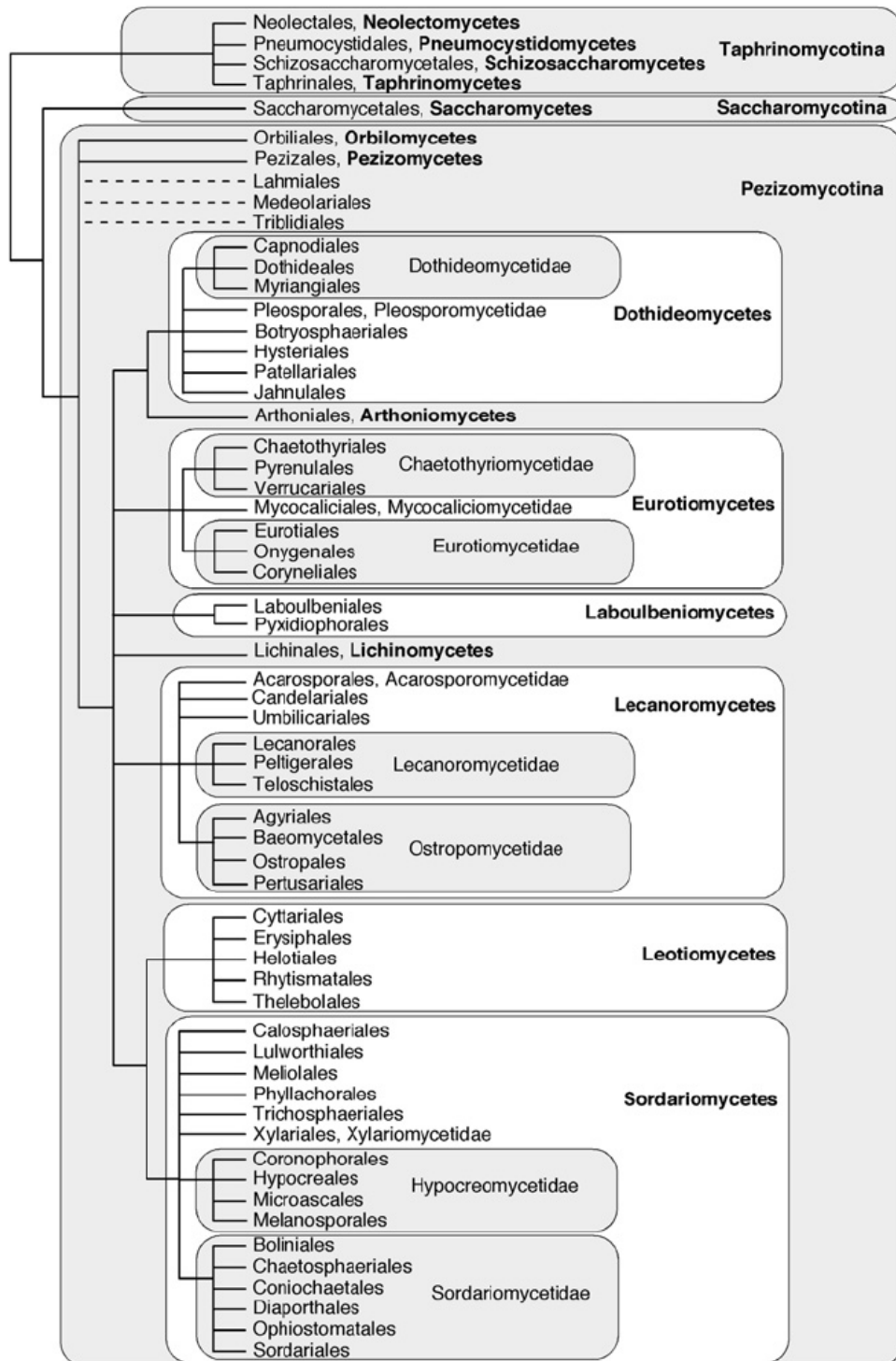
Današnja klasifikacija glivnega kraljestva je razjasnjena do ravni redov. V veliko redovih, predvsem v tistih, ki predstavljajo večje skupine, kot je *Agaricales*, odnosi na ravni družin še vedno niso popolnoma razjasnjeni (Hibbett, 2007).

Glivno kraljestvo se deli na sedem debel, deset poddebel in 35 razredov, ki vsebujejo 12 podrazredov in 129 redov. Glavne spremembe najnovejše klasifikacije, po Hibbett-u (2007), so se pojavile v bazalnih glivnih linijah, ki vključujejo taksone, ki so se v starejših sistemih nahajali v »*Zygomycota*« in »*Chitridiomycota*«. Deblo *Chitridiomycota* je ohranjeno in vsebuje razreda *Chitridiomyces* in *Monoblepharidomyces*. Takson po starejšem sistemu imenovan »*Zygomycota*« se po novem deli na deblo *Glomeromycota* in štiri poddebla *incertae sedis*, ki vključujejo *Mucoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Zoopagomycotina* in *Entomophthoromycotina* (Hibbett, 2007). Deblo *Microsporidia*, ki vključuje enocelične parazite živali in protiste z zelo reduciranimi mitohontriji, so sestrška skupina ostalim glivam in jih ne štejemo med prave glive (Hibbett, 2007). Podkraljestvo *Dikarya* vsebuje debli *Ascomycota* in *Basidiomycota*, ki ju ločujemo na podlagi sinapomorfije dikariontskih hif (Hibbett 2007) (Slika 1).



Slika 1: Filogenetsko drevo kraljestva *Fungi*, prikaz glavnih taksonov (Hibett in sod., 2007).

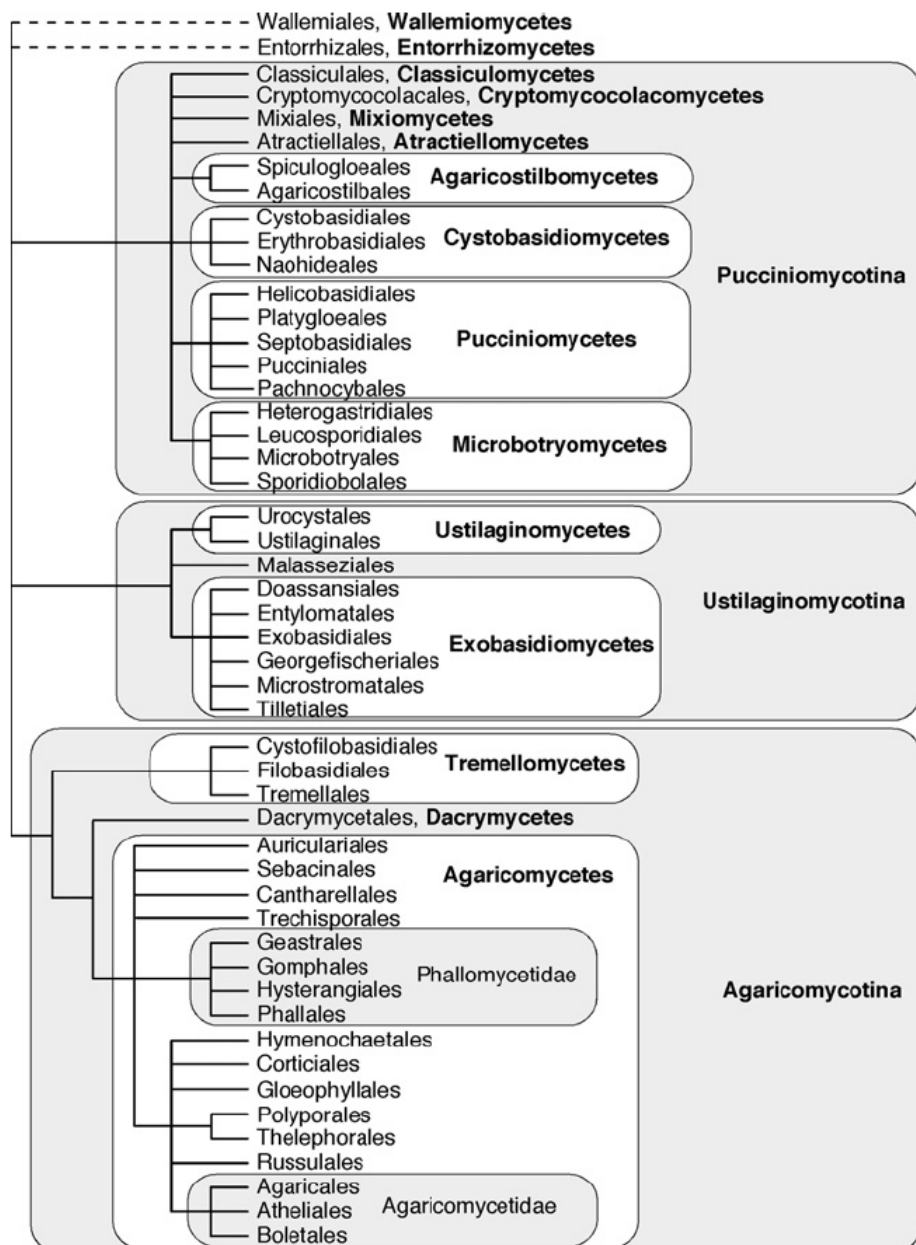
V deblo *Ascomycota* so združena poddebla *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina* in *Taphrinomycotina*. Med njimi je *Pezizomycotina* z več kot 32000 opisanimi vrstami najbolj obsežno poddeblo (Kirk in sod., 2001). Klasifikacija debla *Ascomycota* sledi sistemu objavljenemu v taksonomski zbirki podatkov Myconet (Hibbet, 2007). V deblo uvrščamo razrede *Neoelectomyces*, *Pneumocystidomycetes*, *Schizosaccharomycetes*, *Taphrinomycetes*, *Saccharomycetes*, *Orbilomycetes*, *Pezizomycetes*, *Dothideomycetes*, *Arthoniomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Labuoulbeniomycetes*, *Lichinomycetes*, *Lecanoromycetes* in *Leotiomycetes*. (Hibbett, 2007). V poddeblo *Pezizomycotina* med drugimi uvrščamo vrste obravane v diplomskem delu *Cladosporium cladosporioides*, *C. halotolerans*, *C. sphaerospermum*, *Trimmatostroma salinum* in *Hortaea werneckii* (*Dothideomycetidae*), *Aureobasidium* sp., *A. pullulans* (*Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis*) in *Phaeothea triangularis* (mitosporne *Ascomycota*). V razred *Saccharomycotina* med drugimi uvrščamo vrsto *Candida albicans* (*Saccharomycetes*). Med mitosporne *Ascomycota* uvrščamo tudi vrsto *Phaeothea triangularis* (Hibbett, 2007). (Slika 2).



Slika 2: Filogenetsko drevo debla *Ascomycota* (Hibett in sod., 2007).

V deblu *Basidiomycota* so taksonomski grozdi, prej imenovani »*Basidiomyces*«, »*Urediniomyces*« in »*Ustilaginomyces*« preimenovani v poddebla *Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina* in *Ustilaginomycotina* (Hibbett 2007). V poddeblo *Agaricomycotina* med drugim uvrščamo v diplomskem delu uporabljene vrste *Filobasidium floriforme*, *Cryptococcus albidus* in *Cryptococcus liquefaciens* (*Tremellomyces*), v poddeblo *Pucciniomycotina* vrste *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodospidium babjevae* in *R. diobovatum* (*Microbotryomyces*, *Sporidiobolales*). V deblu

Basidiomycota so vključili tudi nova razreda *Entorrhizomycetes* in *Wallemiomycetes* kot razrede *incertae sedis*. V slednjega uvrščamo vrste *Wallemia ichthyophaga*, *W. muriae* in *W. sebi* (Hibbett 2007). (Slika 3)



Slika 3: Filogenetsko drevo debla *Basidiomycota* (Hibbett in sod., 2007).

Glavna ovira pri določevanju filogenetskih odnosov je predstavljala pogosto konvergentna morfologija in velika raznolikost vrst. Dodatno zmedo je v sistemu povzročala dvojna nomenklatura holomorfnih gliv. Ta temelji na pojavu spolne (mejotske) oz. nespolne (mitotske) reproduktivne oblike. Tako so spolno obliko (teleomorf) in nespolno obliko (anamorf) življenjskega cikla iste vrste uvrščali v dve ločeni skupini glivnega kraljestva. Anamorfne (mitosporne) glive med *Fungi imperfecti* (poddeblo

Deuteromycotina), teleomorfe pa so glede na tip reproduktivnih struktur uvrščali med *Ascomycota* in *Basidiomycota* (Vinnere, 2004).

2.1.2. Določevanje gliv z morfološkimi metodami

Določevanje gliv temelji večinoma na morfoloških znakih. Za določitev je potrebna gojitev na gojišču. Pomembne so značilnosti kulture kot so barva, oblika in struktura kolonij, pa tudi prisotnost izvenceličnega polisaharidnega materiala. Za prepoznavo se uporablja različne znake, med katerimi sta najpomembnejša vrsta konidijev in konidiogeneza (proces tvorbe konidijev), pa tudi znake povezane s sporulacijo teleomorfa kot so aski in tip plodilnih telesc. Uporabljajo se tudi znaki, kot so tip sklerocija, hlamidiospore, oblika vegetativnih celic in prisotnost specifičnih hifnih elementov (Guarro in sod., 1999, Tarr, 2004).

V zadnjih letih se v morfološke tehnike uvajajo novi postopki, ki omogočajo bolj zanesljive fenotipske študije. To so numerična taksonomija, statistika v kombinaciji z računalniškimi programi, ki omogočajo razvoj identifikacijskih ključev pri reševanju problemov (Guarro in sod., 1999).

Probleme pri določanju vrst predstavljajo pomanjkanje standardizacije, stabilne terminologije in visoka podvrženost subjektivnosti. Fenotipske značilnosti so pogosto nestanovitne in se lahko močno spreminjajo tekom nekaj generacij, pa tudi v odvisnosti od rastnih pogojev. Poleg tega jih lahko uporabljamo le za določevanje vrst, ki jih lahko gojimo v laboratorijski kulturi. Velik problem v taksonomiji predstavljajo spolne (teleomorf) in nespolne (anamorf) oblike. Veliko skupin je zmožnih rasti tako v filamentozni kot tudi v kvasni rastni obliki. Razen tega so metode za prepoznavo predvsem filamentoznih gliv težke, dolgotrajne in variabilne in tako le nepopolno razjasnijo taksonomske odnose (Guarro in sod., 1999).

2.1.3. Določevanje gliv s fiziološkimi metodami

Številne glive rastejo relativno hitro v čisti kulturi, tako je za prepoznavo in določevanje možno uporabiti fiziološke in biokemijske tehnike (Guarro in sod., 1999). Testi, ki temeljijo na fizioloških metodah, se poslužujejo razlik v rasti gliv pri različnih temperaturah, vrednostih pH in parcialnem tlaku kisika. Te tehnike so uspešno uporabili pri študiju črnih kvasovk (Guarro in sod., 1999; de Hoog in Gerrits van den Ende, 1992). Različne intervale rastne temperature so uporabili kot dopolnilno orodje v taksonomiji teleomorfov in anamorfov (Guarro in sod., 1999).

2.1.4. Določevanje gliv z biokemijskimi metodami

Med biokemijske tehnike štejemo vse od preprostega gojenja na agarnih ploščah – uporaba različnih tipov gojišč – do kompleksnih kromatografskih in elektroforeznih metod (Guarro in sod., 1999). Uporabljamo jih kot pomoč pri določevanju vrst, osnovanih na podlagi morfoloških lastnosti, kjer se pojavljajo omejitve v morfološkem konceptu vrste. Študija narejena na rodu *Penicillium* (Pitt, 1973; cit. po Guarro in sod., 1999) je preučila hitrost rasti gliv na definiranih gojiščih pod nadzorovanimi

pogoji. Razširjena je tudi uporaba testov API ZYM za identifikacijo filamentoznih gliv, kjer se za ločevanje morfološko podobnih taksonov uporabljajo biokemijske lastnosti, kot so hidroliza uree, utekočinjanje želatine, razgradnja ksantina, kazeina in tirozina ter drugih, in API 20 C AUX asimilacijskih testov za identifikacijo kvasovk (Guarro in sod., 1999).

Za študij taksonomije medicinsko pomembnih gliv uporabljajo teste asimilacije in fermentacije, proteinske profile in teste kjer uporabljajo serološke in fluorescentne antigene (Schechter, 1973). Poleg teh uporabljajo analize izoenzimov, sposobnost razgradnje različnih virov ogljika (Vinnere, 2004). Kombinacija morfoloških, skupaj s sekundarnimi metaboliti, se uporablja za razjasnitev sistema rodov (Guarro in sod. 1999). Kot taksonomski označevalec uporabljajo tudi ostale molekule s pomembno vlogo v metabolizmu, kot so ubikinoni (Guarro in sod. 1999). So del pomembnih prenašalcev elektronskega transporta v dihalni verigi, pri katerih predstavlja razlika v številu izoprenskih enot na kinonskem jedru dober indikator za klasifikacijo taksonov od rodov in vrst pri bakterijah in kvasovkah. Čeprav redkejša, se ta tehnika uporablja tudi pri taksonomiji črnih kvasovk in filamentoznih gliv (Guarro in sod. 1999). Rezultati, temelječi na raznolikosti ubikinonov, včasih sovpadajo z rezultati molekularnih tehnik, čeprav so zaključki vprašljivi, saj so odvisni od vrste uporabljene metode (Guarro in sod. 1999).

Med ostalimi metodami velja omeniti razlikovanje med vrstami na podlagi sestave celične stene in maščobnih kislin (Guarro in sod. 1999).

2.1.5. Določevanje gliv z molekularno biološkimi metodami

Prepoznavna vrst gliv s pomočjo morfoloških znakov je pogosto močno omejena. Zato se vzporedno z morfološkimi znaki za prepoznavo oz. identifikacijo uporabljajo fiziološke in biokemijske tehnike. Te metode so za slabo diferencirane filamentozne glive težko izvedljive in dolgotrajne, rezultati so pogosto variabilni in premalo natančni. Za razliko od njih so molekularne tehnike splošno uporabne (Guarro in sod., 1999), saj so genotipski znaki prisotni povsod in so neodvisni od ekspresije (Sugiyama, 1998). Molekulske znake se lahko uporabi za združitev dvojne klasifikacije anamorfov in teleomorfov v eno (Guarro in sod. 1999).

Ena izmed prvih lastnosti genoma, ki so jih uporabili za prepoznavo vrst mikroorganizmov in uvrščanje v sistem, je delež parov GC (mol% G+C) v jedrni DNA (Tarr, 2004). Največ se uporablja pri kvasovkah, kjer naj bi razlike večje ali enake dvema odstotkoma že kazale na pripadnost različnim vrstam (Guarro in sod., 1999). Ta lastnost ne odraža razlik v zaporedju nukleotidov in ni pokazatelj sorodnosti, saj imajo naključne vrste naključne deleže parov GC. Kot dodatno metodo so za študij sorodnosti bližje sorodnih vrst uporabili odstotek reasociacije genomske DNA (nDNA), po konceptu homologije DNA (hibridizacija DNA-DNA) (Tarr, 2004). Pri vrednostih hibridizacije DNA nad 80-odstotkov je dokazana istovetnost vzorcev. To metodo še vedno uporabljajo kljub težavnostim in nerodnostim (Tarr, 2004).

Zlata doba molekularne glivne sistematike se je začela z razvojem tehnik določevanja nukleotidnega zaporedja DNA in RNA in računalniških programov, ki uporabljajo nukleotidna zaporedja za določevanje filogenetskih odnosov med organizmi (Vinnere, 2004). Tehnike na podlagi metode verižne reakcije s polimerazo (»Polymerase Chain Reaction« - PCR) so postale priljubljene zaradi enostavnosti in hitrosti izvajanja, kot tudi zaradi velike količine podatkov, pridobljenih s študijami določevanja zaporedja DNA (Vaughan-Martini, 2003). Omogočile so analizo majhnega števila glivnih celic ali celo spor (Carlile in Watkinson, 1994), hitro primerjavo in določitev taksona (Vinnere, 2004). PCR omogoča pomnoževanje specifičnih zaporedij DNA z *in vitro* sintezo in omogoča preprost in hiter način tvorbe velikih količin tarčne DNA. V splošnem poznamo dva pristopa uporabe tehnike PCR v študijah: (i) pristop, kjer pomnožujemo določen gen oz. regijo DNA, predvsem tarče kot so ribosomski geni v jedrni DNA, in (ii) tehnika prstnega odtisa DNA, ki temelji na pomnoževanju številnih lokusov (»PCR-fingerprinting«).

Molekulska orodja kot so restrikcijski encimi ter tehnike kot gelska elektroforeza in hibridizacija odtisa po Southernu so vodile v razvoj metode polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (»Restriction Fragment Length Polymorphism« - RFLP). Ta metoda omogoča primerjavo restrikcijskih vzorcev genomske, ribosomske ali mitohondrijske DNA z gelsko elektroforezo pri hibridizaciji z DNA. Glede na stopnjo ločevanja se uporablja različne sonde; ribosomsko, mitohondrijsko DNA, naključno klonirane fragmente DNA, ponavljajoča zaporedja in minisatelite. Je vrsta PCR, pri kateri so segmenti DNA pomnoženi naključno. Začetni oligonukleotidi (8-12 nukleotidov) določajo kateri segmenti bodo pomnoženi. Primerni so za primerjavo slabo poznanih bioloških sistemov, saj za izvajanje metode ni potrebno predhodno poznavanje genoma (Geleta in sod., 2007). RFLP uporabljamo pri študiju evolucijskih odnosov. Pri klasični metodi RFLP s hibridizacijo se specifičnost določa s sondami, medtem ko pri na PCR-temelječih metodah določajo specifičnost začetni oligonukleotidi.

Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (»Amplified Fragment Length Polymorphism« - AFLP) je novejša molekularna tehnika, ki temelji na selektivni pomnožitvi restrikcijskih fragmentov, produktov razreza genomske DNA z restrikcijskimi endonukleazami. Uporaba različnih kombinacij začetnih oligonukleotidov v postopku selektivne amplifikacije omogoča določitev polimorfizma DNA med organizmi. Metoda zajema celoten genom in je primerna za ločevanje ozko sorodnih organizmov znotraj vrste (Zabeau in Vos, 1993).

Metoda polimorfizma konformacije enojne verige (»Single Strand Conformation Polymorphism« - SSCP) razlikuje med nukleotidnimi zaporedji enakih dolžin, ki se razlikujejo v konformacijski strukturi, nastali zaradi majhnih razlik v zaporedju nukleotidov (že na ravni enega samega baznega para), kar ima za posledico različno mobilnost zaporedij v gelu, ki jo lahko izmerimo (Hayashi, 1991).

2.2. FILOGENETSKI OZNAČEVALCI

V zadnjih letih je bil sistem klasifikacije kvasovk kot tudi ostalih gliv prenovljen z uporabo molekularnih analiz nukleotidnih zaporedij, ki se tekom evolucije niso toliko spreminjala, kot na primer rRNA. Upoštevati moramo, da molekularna evolucija in sistematika temeljita na predpostavki, da so izbrani geni oz. deli genoma reprezentativni za genom, od koder so bili izolirani. Tako naj bi filogenetski odnosi, dobljeni z analizo izbranih nukleotidnih zaporedij, predstavljali ocene odnosov, pridobljenih v analizah celotnega genoma (Cummings in sod. 1995). Prvo nukleotidno zaporedje, ki so ga v večji meri uporabili pri teh študijah, je bilo zaporedje rDNA ribosoma, in sicer 5S rDNA. Kasneje so v filogenetske študije vključili tudi nukleotidni zaporednji rRNA male in velike podenote ribosoma; 18S in 26S rDNA. Ugotovili so, da vse regije za izbrano taksonomsko raven niso enako uporabne (Tarr, 2004). Na podlagi različne hitrosti evolucije znotraj genoma se ločijo odseki genoma, katere lahko uporabljamo za ločevanje taksonov na različnih ravneh (Tabela 1). Glavni razlog za pogosto uporabo ribosomske DNA je prisotnost gena v številnih kopijah. Poleg tega so ribosomi prisotni pri vseh evkariontih in so zelo ohranjeni (van de Peer in sod., 1997). Kasneje so v filogenetskih študijah prešli na preučevanje genov za proteine.

Tabela 1: Regije uporabe posameznega molekulskega označevalca oz. gena, (povzeto po Hwang in Kim, 1999).

	Kraljestvo	Deblo	Razred	Red	Družina	Rod	Vrsta	Populacija
Jedrna rDNA								
SSU (16-18S)	—————				-----			
LSU (23-28S)			—————	-----				
5.8S	—————				-----			
IGS							—————	
ITS						—————	—————	
MtDNA								
rDNA								
12S		—————	-----					
16S				—————	-----			
Protein								
Kodirajoči geni								
ND1				-----	—————	—————	-----	
ND2				-----	—————	—————	-----	
COI				-----	—————	—————	-----	
COII				-----	—————	—————	-----	
Cytb				-----	—————	—————	-----	

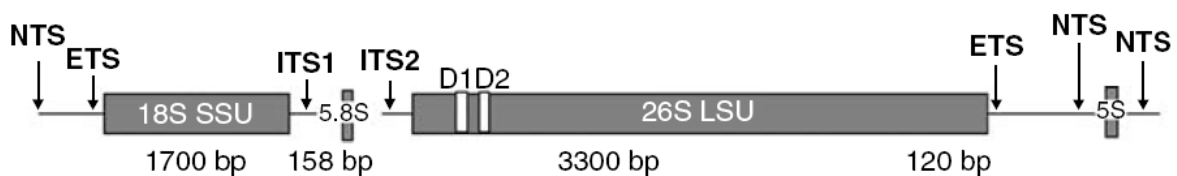
Legenda: polne črte predstavljajo območja občutljivosti molekulskega označevalca oz. gena, črtkane pa redkeje pojavljajoča območja

Okrajšave: molekularni označevalci jedrne rDNA – majhna ribosomska podenota (16-18S SSU), velika ribosomska podenota (23-28S LSU), 5'8S, medgenski vmesnik (IGS), notranji prepisani vmesnik (ITS), mitohondrijske ribosomske rDNA – majhna podenota (12S), velika podenota (16S) in genov za proteine – NADH dehidrogenaza (ND1,2), citokrom oksidaza (COI,II) in citokrom b (Cytb).

2.2.1. Jedrna ribosomska DNA (rDNA)

2.2.1.1. Sestava jedrne ribosomske DNA

Evkariontska jedrna rDNA je organizirana v tandemnih ponovitvah s številom kopij do 5000. Vsaka enota je sestavljena iz nukleotidnega zaporedja za rRNA male podenote - 18S rRNA (SSU) in rRNA velike podenote - 28S rRNA (LSU), 5'8S rRNA ter 5S rRNA. Te funkcionalne regije so ločene med seboj z vmesniki. 18S rDNA (SSU) in 26S rDNA (LSU) sta ločeni z zunanjima prepisnima vmesnikoma (ETS) in ne-prepisnima vmesnikoma (NTS), med katerima je 5S rDNA. Oba vmesnika imenujemo medgenska vmesnika (IGS). 5'8S rDNA je vrinjena med dvema notranjima prepisnima vmesnikoma (ITS1, ITS2) (Hwang in Kim, 1999). (Slika 4) Obe regiji igrata pomembno vlogo pri zorenju pre-rRNA (Tarr, 2004). 5'8S, 18S in 25S rDNA se prepisejo kot 35S in 40S prekurzor, skupaj z notranjim in zunanjim prepisnim vmesnikom (ITS, ETS). Vsi vmesniki se izrežejo iz prepisa. 5S rDNA je na variabilnem mestu in se prepisuje v nasprotni smeri kot ostali geni (Guarro in sod., 1999, Hwang in Kim, 1999).



Slika 4: Shematska predstavitev jedrne ribosomske rDNA (Povzeto po Fernandez-Espinar in sod., 2000)

Legenda: odebeljene črte predstavljajo kodirajoče regije jedrne ribosomske rDNA, tanke pa nekodirajoče.

Okrajšave: ne-prepisni vmesnik (NTS), zunanji prepisni vmesnik (ETS), notranja prepisna vmesnika (ITS1, ITS2), mala ribosomska podenota - 18S rRNA (SSU), velika podenota - 28S rRNA (LSU), 5'8S rRNA in 5S rRNA.

2.2.1.2. Območja občutljivosti molekulskih označevalcev

Za filogenetske raziskave se najpogosteje uporablja jedrna DNA, ki kodira ribosomsko RNA (Hwang, Kim, 1999). Za reševanje odnosov bližje sorodnih taksonov, torej ločevanje rodov in vrst, so primerne regije, ki obsegajo dve notranji prepisni vmesniški regiji 1 in 2 (ITS1, ITS2), IGS in domeno 2 (D2) 26S rDNA (LSU) (slika 4). Regije ITS so zaradi manjšega evlucijskega pritiska zelo variabilne, nabirajo nevtralne mutacije, zato se jih uporablja za ločevanje vrst znotraj rodu (Tarr, 2004).

Nukleotidna zaporedja regije ITS1 in regije medgenskega vmesnika (IGS), se uporabljajo pri določanju odnosov med populacijami znotraj iste vrste (Hwang in Kim, 1999).

18S rDNA je ena najbolj ohranjenih regij DNA. Uporablja se za konstrukcijo vej filogenetskih dreves, ki vključujejo kraljestva, debla, razrede in redove (Hwang in Kim, 1999). 5'8S rDNA je podobno ohranjena kot 18S, vendar je s približno 150 bp prekratka za zadostno količino filogenetskih informacij (Hwang in Kim, 1999).

Domeni D1 in D2 predstavljata delno nukleotidno zaporedje 26S ribosomske DNA (LSU). Skupaj obsegata približno 600 baz. Pri kvasovkah se uporabljata izključno regiji D1 in D2 26S rDNA. Kodirajoče regije ribosomske DNA so zaradi letalnosti večine mutacij ohranjene, s počasno evolucijo. 5'8S rDNA, del 26S rDNA in 18S rDNA so uporabni za oris višjih taksonomskih ravni, kot so razredi in debla (Guarro in sod., 1999). Kurtzman in Robnett (1998) sta dokazala, da lahko večino kvasnih vrst določimo s pomočjo raznolikosti nukleotidnih zaporedij teh regij.

2.2.2. Označevalci mitohondrijske DNA (mtDNA)

Mitohondrijska DNA (mtDNA) je krožna molekula DNA, velika od 14 kb do 17 kb. Ta pri metazojih nosi zapis za 36-37 genov; dva za ribosomsko RNA (16S in 12S rRNA), 22 za tRNA in 12-13 za podenote multimernih proteinov iz notranje mitohondrijske membrane (citokrom oksidaza I-III, ATP sintaza 6 in 8, NADH dehidrogenaza 1-6 in 4L in citokrom b apoencim). Poleg tega se na molekuli nahaja tudi nekodirajoče zaporedje variabilne dolžine (Hwang in Kim, 1999).

Mitohondrijska DNA se je razvijala veliko hitreje kot jedrni genom, zato se ta zaporedja uporabljajo pri primerjavi sorodnosti na nižjih taksonomskih ravneh, kot so družina, rod, vrsta in populacija (Hwang in Kim, 1999). (Tabela 1).

2.2.3. Ostali jedrni filogenetski označevalci

Na ribosomski DNA gliv je bilo narejenih veliko obširnih študij, vendar so v manjši meri filogenetske odnose preučevali tudi na podlagi ostalih genov v jedrnem genomu. Med te štejemo gen za β -tubulin, elongacijski faktor EF-1 α , aktin in ostale (Liu in sod., 2006, Hwang in Kim, 1999).

2.2.3.1. Aktin

Aktini so zelo ohranjeni strukturni proteini, ki se nahajajo v vseh evkariontskih celicah. Znotraj multigenске družine jih delimo na mišične aktine in citoplazemske aktine, ki so pomembni predvsem za kvasovke. Ti so glavni proteini citoskeleta in so vključeni v različne osnovne celične funkcije, vključno z mitozo. Geni teh proteinov so med največkrat prepisanimi. Sestojijo iz kodirajoče regije s 1200 bp in introna. V nasprotju z geni, najdenimi pri drugih evkariontih, se glavni gen za aktin (*ACT1*) nahaja le v eni kopiji v vsakem haploidnem genomu (Daniel in sod., 2001). Ta gen so uspešno uporabili za določevanje filogenetskih odnosov med številnimi evkarionti (Daniel in sod., 2001) vključno z določenimi glivami (Daniel in sod., 2001). Gen za aktin je pomemben filogenetski

označevalec, ki je dovolj ohranjen, da omogoči jasno poravnavo in dovolj variabilen za določitev odnosov celotne skupine anamorfnega rodu *Candida* in sorodnih teleomorfnih rodov. («basal lineages»)(Daniel in sod., 2001).

2.2.3.2. Elongacijski faktor-1 α

Elongacijski faktor 1 α (*EF-1 α*) igra pomembno vlogo pri sintezi proteinov, saj omogoča podaljševanje verige aminokislin, poleg tega sodeluje tudi s citoskeletnimi proteini, predvsem aktinom (Moreira in sod., 1999). *EF-1 α* naj bi bil zaradi počasne evolucije primeren za preučevanje filogenetskih odnosov na taksonomski ravni filogenetskih linij, ki so se ločile zgodaj v evoluciji gliv. Za študij naj bi bil primeren tudi zaradi majhnega števila kopij, prisotnih v genomu proučevanih taksonov in velike podobnosti z arheobakterijskim elongacijskim faktorjem (Baldauf in sod., 1996), ki omogoča ukoreninjenje filogenetskih dreves (Baldauf in Doolittle, 1997).

2.2.3.3. B-tubulin

Tubuline uvrščamo v skupino globularnih proteinov, med katerimi so najpogostejši α - in β -tubulini. Ti sestavljajo mikrotubule. β -tubulini imajo poleg strukturne funkcije tudi osnovno metabolno funkcijo. So eni pomembnejših filogenetskih označevalcev za preučevanje odnosov med glivami na vseh taksonomskih ravneh, saj so študije narejene na genih za β -tubuline razjasnile filogenetske odnose na bazalnih taksonomskih ravneh in odnose v kompleksnih skupinah (Michael in Daniel, 1999).

2.2.3.4. RNA polimeraza II

Za pridobivanje jasnejše slike filogenetskih odnosov gliv na ravni debel in redov so uporabili nukleotidna zaporedja jedrnih genov za RNA-polimerazo II (*RBPI* in *RBP2*). Ta gena kodirata največjo (210 kDa) in drugo največjo (140 kDa) podenoto jedrne RNA-polimeraze II. Je esencialen protein, saj ima splošno nalogo prepisovanja kodirajočih jedrnih genov v mRNA (Liu in sod., 2006). Ima počasno evolucijo, zato se uporablja za določevanje filogenetskih odnosov med filogenetskimi vejami taksonov, kot so kraljestva in debla (Liu in sod., 2006). Tako sta gena *RBPI* in *RBP2* kot molekulska označevalca pri študiju filogenetskih odnosov, enako natančna za isto filogenetsko raven, kot zaporedje DNA za 18S rRNA (Liu in sod., 2006).

2.2.4. Multigenske študije

Začetne molekularne študije evkariontov so temeljile izključno na ribosomski DNA, na preučevanju enega samega gena (Budín in Philippe, 1998). Rezultati teh študij so potrdili monofiletski status večine skupin, že določenih z morfološkimi kriteriji. Pri nadaljnjih raziskavah so analize, ki temeljijo le na enem označevalcu, torej ribosomski DNA, postavili pod vprašaj, saj niso razjasnile odnosov med bolj oddaljenimi taksoni. Razlog za te razlike v filogeniji naj bi med drugim bila razlika v vsebnosti

parov GC ribosomske DNA. Te naj bi povzročale artefakte pri izračunavanju filogenije (Budin in Philippe, 1998). Vzporedno so kot molekulske označevalce vedno bolj začeli uporabljati gene proteinov, saj so ti neobčutljivi za razlike v vsebnosti GC parov (Moriera in sod., 1999). Tako so v projektu AFTOL uporabili gene za elongacijski faktor 1α , drugo največjo podenoto RNA-polimeraze II (*RPB2*), β -tubulin in mitohondrijsko ATPazo 6. Arbitrnost taksonomskih skupin, kot tudi razlika v evolucijskih hitrostih genov oz. molekularnih označevalcu preučevanih taksonov, ni omogočala posplošitve določevanja taksonomske ravni uporabnosti izbranega gena (Hwang in Kim, 1999). Ugotovili so, da pri paralelnih študijah filogenije bazidiomicetnih gliv s 26S rDNA (LSU) in nukleotidnimi zaporedji genov *RPB1*, *RPB2*, razjasnijo več neznanih odnosov v notranjih vejah filogenetskega drevesa od ribosomske DNA (Liu in Hall, 2004). Razlog za nejasnost odnosov naj bi bil v pomanjkanju odsekov s počasno do zmerno hitro evolucijo v ribosomski DNA. Prednost genov za proteine med drugim predstavlja tudi pojav le-teh v eni kopiji. Med drugim so Tang in sod. (2007) ugotovili, da filogenetska drevesa narejena s pomočjo ribosomske DNA, niso razrešena in so celo slabo podprta oz. so politomno razvejena (Tang in sod., 2007). Vendar so se filogenetski odnosi, določeni na podlagi različnih označevalcev kot so rDNA, geni za elongacijski faktor 1α , aktin, drugo največjo podenoto RNA-polimeraze II (*RPB2*), β -tubulin, mitohondrijsko ATPazo in ostali, razlikovali med seboj (Budin in Philippe, 1998). Razlog za pojavljajoča se neskladja so pripisali homoplaziji, hibridizaciji, pojavu paralogov in privlačnosti dolgih vej. Novejše multigenske študije narejene na skupinah *Sordariomycetes* (Tang in sod., 2007) in *Dothideomycetes* (Schoch in sod., 2006) so v le-teh razrešile nejasne odnose med razredi in redovi. Po Tang-u in sod. (2007) najzaneslivejše rezultate prispeva združena uporaba genov ribosomske DNA (SSU in LSU rDNA) in *RPB2*, ker se s povečano vsebnostjo informativnih mest zmanjša naključni šum, pogost pri uporabi enega označevalca (Wiens, 2003). Schoch in sod. (2006) je v kombinacijo vključil še gen za elongacijski faktor (*TEF1*).

Primerjava različnih označevalcev za filogenetske raziskave je razkrila, da noben označevalec ni popoln, torej brez rekonstrukcijskih artefaktov. Najverjetneje bodo pravi filogenetski odnosi razjasnjeni s sestavljanjem zanesljivih delov dreves, pridobljenih s pomočjo različnih označevalcev (Baldauf in Doolittle, 1997).

2.3. NOVI FILOGENETSKI OZNAČEVALCI

Na izbiro posameznega gena oz. nukleotidnega zaporedja v filogenetskih študijah vpliva njegova uporabnost, ki jo določa njegova funkcionalna vloga. Odvisno od te se v genomu ločujejo deli z različno hitrostjo evolucije oz. nabiranja mutacij. V filogenetske namene so nevtralne ali šibko nevtralne mutacije najprimernejše, saj so zanesljiv vir filogenetskih informacij. Te mutacije se pojavljajo v daljšem časovnem obdobju, pod vplivom selekcije (Liu in sod., 2006). Tak primer predstavljajo podenote RNA-polimeraze II (*RPB1*, *RPB2*), za katere so lahko določili celotno zgodovino oblik. Problematična nukleotidna zaporedja oz. geni predstavljajo primeri, ki so pod vplivom adaptivne evolucije, kot je npr. β -tubulin, pomemben element celične strukture. Taki geni niso dobri kandidati za filogenetske študije v širšem spektru vrst, saj se ob konvergentni evoluciji pojavi vpliv homoplazije. Nukleotidna zaporedja β -tubulina pri *Chytridomycota* so relativno ohranjena, med tem ko so v skupinah *Zygomycetes* in *Microsporidia* ti geni raznoliki (Liu in sod., 2006). Tang in sod. (2007) so ugotovili, da β -tubulin ni primeren označevalec oz. ima premalo informativnih mest za določanje filogenetskih odnosov *Sordariomycetes* na ravni reda.

Gena za encima elongazo in desaturazo sta obetavna kandidata za filogenetski označevalec. Razširjena sta v različnih kraljestvih, saj sodelujeta pri pomembni funkciji ohranjanja primerne fluidnosti membran. Ohranjanje le-te je ključnega pomena za pravilno delovanje membran, kamor spada črpanje ionov, transport in respiracija (Berry in Foegeding, 1997). Celotno zaporedje teh genov so do sedaj določili pri glivah *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, in *Trichoderma reesei*, kjer so zabeležili aktivnost desaturaz v membrani endoplazmatskega retikla (Suutari, 1995). V modelnemu organizmu, kvasovki *S. cerevisiae*, so odkrili gen *OLE1*, ki kodira encim Δ^9 -desaturazo (Watanabe in sod., 2004), encim, ki se nahaja na membranah endoplazemskega retikla, pa tudi več genov za elongazo (Trotter, 2001).

Δ^{12} - in Δ^{15} -desaturazi zaradi odsotnosti iz nekaterih genomov, kot npr. *S. cerevisiae* (Martin in sod., 2007), nista primerna označevalca širše obsegajočih filogenetskih študij. Primernejša sta splošno razširjena gena za Δ^9 -desaturazo in elongazo.

Delovanje desaturaz in elongaz omogoča nastanek nenasičenih maščobnih kislin in maščobnih kislin z daljšimi verigami, ki predstavljajo adaptacijo celic na spreminjajoča okolja. Med te štejemo tudi ekstremno hladna in slana okolja. V njih prevladujejo halofilni/halotolerantni oz. kserofilni/kserotolerantni in psihrofilni/psikrotolerantni organizmi. Glivne vrste, sposobne rasti pri vodni aktivnosti (a_w) 0,85 ali manj (to je 17% NaCl oz. 50% dodane glukoze v mediju (m/v)), so kserofili oz. halofili (de Hoog in sod. 2005). Ugotovili so, da so spremembe maščobnih kislin kot adaptacija na ekstremno slana okolja manjše od sprememb v hladnih okoljih (Hazel in Williams, 1990, Russell in sod., 1995).

Najpogostejše maščobne kisline v fosfolipidih membran halofilnih melaniziranih kvasovk vsebujejo maščobne kisline s 16 in 18 ogljikovimi atomi. Od teh predstavlja velik delež linolna kislina (C18:2 $\Delta^{9,12}$). Slanostni stres pri teh povzroči povečano stopnjo nenasičenja maščobnih kislin (Turk in sod., 2004). Adaptacijo bazidiomicetne glive *Lentinula edodes* na znižanje rastle temperature predstavlja povečanje vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin, kot sta linolna (C18:2) in oleinska maščobna kislina (C18:1 Δ^9) (Sakai in Kajiwara, 2003).

2.3.1.Desaturaze maščobnih kislin

2.3.1.1. Sestava

Sposobnost celic, da lahko spreminjajo fizikalne lastnosti membranskih lipidov, je določena večinoma z delovanjem desaturaz maščobnih kislin (Los in Murata, 1998). Desaturaze so encimi, ki odstranijo atoma vodika z acil-ACP substrata oz. z organskega substrata in uvedejo dvojno vez med dvema ogljikoma. Delijo se na dva evolucijsko nesorodna razreda, na topno obliko, ki jo najdemo pri rastlinah in integralne membranske encime, prisotne pri glivah in sesalcih (Shanklin in Cahoon, 1998). Po načinu poimenovanja delimo integralne membranske desaturaze na dva načina, na omega destauraze, ki vstavljajo dvojne vezi na specifičnem mestu od metilnega konca maščobne kisline, in delta desaturaze, z mestom delovanja oz. vstavitvijo dvojne vezi na določenih, stalnih mestih, v smeri

od karboksilne skupine maščobne kisline (Nakamura in Nara, 2004). Med njimi so Δ^9 -, Δ^{12} - in Δ^{15} -desaturaze, ki vstavljajo dvojne vezi v prekursorje, v nasičeni palmitinsko kislino (16:0) ali stearinsko kislino (18:0) (Shanklin in Cahoon, 1998). Te desaturaze pretvorijo prekursorje v maščobne kisline z dvojnimi vezmi na mestih, ki ustrezajo imenu desaturaze. Tako se dvojna vez nahaja na x-tem mestu oz. ogljikovem atomu imenovanem delta-x (Δ^x -), šteto od karboksilnega konca maščobne kisline (Nakamura in Nara, 2004).

Genov za Δ^5 -, Δ^6 -, Δ^{12} - in Δ^{15} -desaturaze niso preučevali tako natančno kot gen za Δ^9 -desaturazo. Δ^6 - in Δ^5 -desaturaze so potrebne za sintezo večkrat nenasičenih maščobnih kislin kot so eikozapentaenojska - EPA (C20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$) in dokozaheksaenojska kislina - DHA (C22:6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, sinteza iz α -linolenske kisline), ter arahidonska kislina (C20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$, sinteza iz linolne kisline) (Nakamura in Nara, 2004).

Δ^9 -desaturaza (stearoil-CoA desaturaza 1) z odstranitvijo vodikov na 9. in 10. ogljikovem atomu od karboksilne skupine, povzroči nastanek dvojne vezi v molekuli maščobne kisline (desaturacijo) na tem mestu (Shanklin in Cahoon, 1998). Tako pri kvasovki *S. cerevisiae* nastanejo enkrat nenasičene maščobne kisline, kot so palmitoleinska kislina (C16:1 $^{\Delta 9}$) in oleinska kislina (C18:1 $^{\Delta 9}$) (Stukey in sod., 1990).

Δ^9 -desaturaze kodira gen *OLE1*, ki je bil prvič izoliran v kvasovki *S. cerevisiae* (Shanklin in Cahoon, 1998; Stukey in sod., 1990). Encim Ole1 je edina desaturaza, potrebna za sintezo enkrat nenasičenih maščobnih kislin (Stukey in sod., 1989), ki predstavljajo od 70-80% vseh maščobnih kislin v organizmu (Schneiter in sod., 2000).

S. cerevisiae in *Shizosaccharomyces pombe* lahko sintetizirata le enkrat nenasičene maščobne kisline, nastale z delovanjem Δ^9 -desaturaze. Mnogo ostalih gliv ima tudi membransko vezane Δ^{12} - in Δ^{15} -desaturaze (Martin in sod., 2007). Ta dva encima vključita v maščobno kislino dodatno dvojno vez na mestu C₁₂ oziroma C₁₅, tako nastaneta C18:2 (linolna) in C18:3 (α -linolenska) maščobna kislina. Pri glivah *N. crassa* in *Candida albicans* ta dva produkta nastajata z nenasičenjem oleinske kisline (C18:1). V nekaterih organizmih Δ^6 - oz. Δ^{15} -desaturazi uvedeta v linolno kislino (C18:2) tretjo dvojno vez, s čimer dobimo γ -linolensko (γ -C18:3 $^{\Delta 9,12,15}$) ali α -linolensko kislino (α -C18:3 $^{\Delta 6,9,12}$). Pri zmernih temperaturah okoli 30°C, je prevladujoči produkt linolna kislina (C18:2 $^{\Delta 9,12}$), z znižanjem temperatur pa se delež nenasičenih maščobnih kislin poveča v prid linolenske kisline (C18:3); in sicer α - (C18:3 $^{\Delta 6,9,12}$) ali γ - (C18:3 $^{\Delta 9,12,15}$) (Watanabe in sod., 2004).

2.3.1.2. Vloga desaturaz

Spremembe v sestavi in lastnostih membran so pomemben dejavnik pri adaptaciji na visoko slanost v okolju (Russell in sod., 1995). Membranski lipidi so pomembni pri kontroli fluidnosti in stanju membrane. Za vzdrževanje membranske fluidnosti je pomembnih več dejavnikov, med katerimi je tudi tip acilnih verig (njihova nasičenost in dolžina). Nenasičene maščobne kisline vsebujejo eno ali več dvojnih vezi in so esencialne komponente membranskih lipidov evkariontov. Poleg odgovora na slanostni stres – visoke koncentracije soli (Turk in sod., 2004) in temperaturo (Stukey in sod., 1989), so desaturaze pomembne pri celični rasti ob spreminjajočih temperaturah (Watanabe in sod., 2004).

Število in mesto dvojnih vezi v maščobnih kislinah vpliva na fizikalne in s tem tudi na fiziološke lastnosti (Shanklin in Cahoon, 1998). Vključitev prve dvojne vezi, ki je na mestu Δ^9 , je bistvena za vzdrževanje tekočega kristaliničnega stanja membrane pri fizioloških temperaturah (Los in Murata, 1998). Nadaljne dvojne vezi v maščobno kislinski verigi imajo manjši vpliv (Los in Murata, 1998).

2.3.2. Elongaze

Poleg spreminjanja nasičenosti se lahko fluidnost membran uravnava tudi s spreminjanjem dolžine maščobnih kislin. Na membranah endoplazemskega retikla in mitohondrijev kvasovke *S. cerevisiae* so našli in opisali različne elongacijske encime, vključno s sistemi, sposobnimi podaljševanja (»elongacije«) srednjeveržnih maščobnih kislin (C12, C14 v C16, C18) in dolgoveržnih maščobnih kislin (C18 v C20 in več) (Trotter, 2001; Toke in Martin, 1996).

Maščobne kisline z zelo dolgimi verigami (s 24 in 26 ogljikovimi atomi) predstavljajo le okrog 1 odstotek maščobnih kislin v celici, vendar je njihova prisotnost v celici nujno potrebna, saj so osnova za sintezo ceramida, ki ga najdemo v sfingolipidih, in so del glikozilfosfatidilinozitolnega sidra, s katerim so v membrano zasidrani nekateri proteini (Schneiter in sod., 2000).

Gen *ELO1* kodira encim Elo1, ki sodeluje v podaljševanju maščobnih kislin s 14 ogljikovimi atomi v maščobne kisline s 16 ogljikovimi atomi na karboksilnem koncu (Schneiter in sod., 2000). V tvorbo zelo dolgih maščobnih kislin sta vpletena še dva gena, *ELO2* in *ELO3*, ki kodirata membransko vezane elongaze; Elo2 in Elo3. Elo2 sodeluje pri elongaciji maščobnih kislin z do 24 ogljikovimi atomi, Elo3 pa pri elongaciji maščobnih kislin z do 26 ogljikovimi atomi. Normalno delovanje vsaj enega od njiju je za preživetje celic nujno potrebno (Oh in sod., 1997).

2.4. GLIVE UPORABLJENE V RAZISKAVI

Glive, ki smo jih izbrali za našo raziskavo, uvrščamo v skupino *Dikarya*, ki združuje debli *Basidiomycota* in *Ascomycota*.

V deblu *Ascomycota* se nahajata poddebli *Saccharomycotina* in *Pezizomycotina* (Slika 2). Znotraj poddebla *Pezizomycotina* je znanih in opisanih več kot 32000 vrst (Hibbett in sod. 2007). Po Sugiyama in sod. (2006) vključuje vse filamentozne vrste, ki oblikujejo sporokarp. Je ekološko raznolika skupina in vključuje rastlinske in živalske patogene, mikorizne glive, endofite in glive v lišajih, ter različne predstavnike v vodnih in kopnih habitatih (Spatofora in sod., 2006).

Vrste redu *Dothideales* (*Pezizomycotina*), ki rastejo pri nizki vodni aktivnosti, uvrščamo med halotolerante oz. kserotolerante. Njihov naravni habitat predstavljajo ekstremno slane vode solin (Butinar in sod., 2005c cit. po de Hoog in sod., 2005). Vrste so bile izolirane tudi z več različnih, večinoma suhih ali slanih mest v Antarktiki (Ruisi in sod., 2007). V tem redu se pojavljajo posamezne vrste, ki so oportunistično patogene, med njimi tudi črne kvasovke. Med *Dothideales* uvrščamo rodove *Aureobasidium*, *Hortaea* in *Phaeothea* (de Hoog in sod., 2005).

V skrajno slanih vodah prevladuje ekstremno halotolerantna vrsta *Hortaea werneckii* (Gunde-Cimerman in sod., 2000), ki je znana kot povzročiteljica *tineae nigrae*, neinvazivnih temno obarvanih sprememb v epidermisu dlani in podplatov (de Hoog in Gerrits van der Ende 1992). Nasprotno je *Aureobasidium pullulans* kozmopolitska vrsta okolij z rahlo znižano vodno aktivnostjo, kot so slana močvirja in soline. Pogosto pa jo najdemo tudi v filospheri in drugje (Plemenitaš in Gunde-Cimerman 2005, Zalar in sod., 1999). Je oportunistični patogen, ki med drugim povzroča nepomembne kutane infekcije po travmi (Kogej in sod., 2005).

Red *Capnodiales* (*Pezizomycotina*) med drugim vključuje rodova *Cladosporium* in *Trimmatostroma*. V rodu *Cladosporium* je večina vrst kozmopolitska, znani so kot razkrojevalci rastlinskega materiala (de Hoog in sod., 2005). Nekatere vrste so izolirali tudi iz ekstremnih okolij solin in jezer, kjer predstavljajo najpogostejše vrste (Gunde-Cimerman in sod., 2000). V teh habitatih so izolirali vrste, kot so *Cladosporium herbarum*, *C. cladosporioides* in *C. sphaerospermum*.

Vrsto *Trimmatostroma salinum* štejemo v skupino ekstremno halotolerantnih melaniziranih meristematskih gliv (Buchalo in sod., 1998, Gunde-Cimerman in sod., 2000).

V redu *Saccharomycetales* se nahajajo predvsem osmotolerantne kvasovke. Te predstavljajo primarne kontaminante v prehrabeni industriji, saj izbirajo okolja z nizko vodno aktivnostjo. Pojav in razširjenost le-teh v naravnih habitatih z nizko vodno aktivnostjo sta še slabo poznana. Kvasovke, izolirane iz ekstremno slanih voda uvrščamo v rodove *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia* in *Pichia* (de Hoog in sod., 2005).

Debaryomyces hansenii, z anamorfno obliko *Candida famata*, je znana na sol in mraz tolerantna vrsta, ki jo je možno izolirati z rastlinskega in živalskega materiala, vode in zemlje zmernih klimatov. Vrsta se pojavlja v morski vodi (Butinar in sod., 2007), pa tudi v ekstremno slanih vodah solin (Butinar in sod., 2005b,c). Je pogost vzrok kvarjenja zamrznjene hrane, soljene hrane in ostalih proizvodov z nizko vodno aktivnostjo (a_w). Med kvarljivce hrane sodijo tudi *Pichia guilliermondi*, *Yarrowia lipolytica* in *Candida parapsilosis* (Deak in Beuchat 1996, Breuer in Harms, 2006).

Vrste iz rodu *Pichia* so splošno razširjene, so pogost izolat slanih vod (de Hoog in sod., 2005), vendar je njihovo pojavljanje v polarnih regijah redko (Butinar in sod., 2007). Izolirali so jih tudi iz solin in Mrtvega morja (Butinar in sod., 2005b).

Poddeblo *Agaricomycotina* predstavlja s približno 20000 opisanih vrst skoraj 70 odstotkov znanih vrst v deblu *Basidiomycota*. Vrste redov *Filobasidiales* in *Tremellales* so izolirali iz okolij z znižano vodno aktivnostjo in/ali nizkimi temperaturami, kot je morska voda (de Hoog, 2005), antarktične regije (Vishniac in Onofri, 2003) in politermalni ledeniki na Arktiki (Gunde-Cimerman in sod., 2003). Mednje sodita tudi rodova *Filobasidium* in *Cryptococcus*. *Cr. liquefaciens* so izolirali iz bazalnega ledu ledenikov, kjer predstavlja prevladujočo vrsto (Butinar in sod., 2007). Sevi *Cr. albidus* so bili le občasno izolirani iz prsti polarnih regij (Vishniac in Onofri, 2003; Butinar, 2007).

Večina teleomorfov iz anamorfnih rodov *Rhodotorula* in *Sporobolomyces* se nahaja v rodovih *Rhodosporidium*, *Leucosporidium* in *Sporidiobolus*. Vse skupaj uvrščamo v red *Sporidiales*, poddeblo *Pucciniomycotina* (de Hoog in sod., 2005). Vrste rodu *Rhodotorula* se pojavljajo v zraku, zemlji in na koži človeka, večinoma so nepatogene. Povzročajo infekcije ljudi, kot so fungemije in endokarditis imunsko oslabljenih ljudi, med povzročitelji je najpogostejša *Rh. mucilaginosa* (Biswas in sod., 2001). Iz izjemno slane vode solin so večkrat izolirali *Rh. babjevae* (Butinar in sod., 2005b). Skupaj s *Cr. liquefaciens* so vrsto izolirali tudi iz bazalnega ledu ledenikov, kjer sta predstavljali prevladujoči vrsti kvasovk (Butinar in sod., 2007). Vrste rodu *Leucosporidium* so pogosto izolirali iz Antarktičnih ekstremno slanih vod (de Hoog in sod., 2005).

Red *Wallemiales* so pred kratkim uvrstili med bazidiomicetne glive (Zalar in sod., 2005). Vsebuje edini opisani rod *Wallemia*, ki vsebuje le tri vrste, *Wallemia sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. Najti jih je mogoče na sladki, slani ali posušeni hrani (Samson in sod., 2002) ter iz izjemno slane vode evaporacijskih bazenov solin v Mediteranu in Mrtvem morju (Zalar in sod., 2005). Vse tri vrste so kserofilne oz. kserotolerantne, med njimi je *W. ichthyophaga* edina znana halofilna gliva (Zalar in sod., 2005).

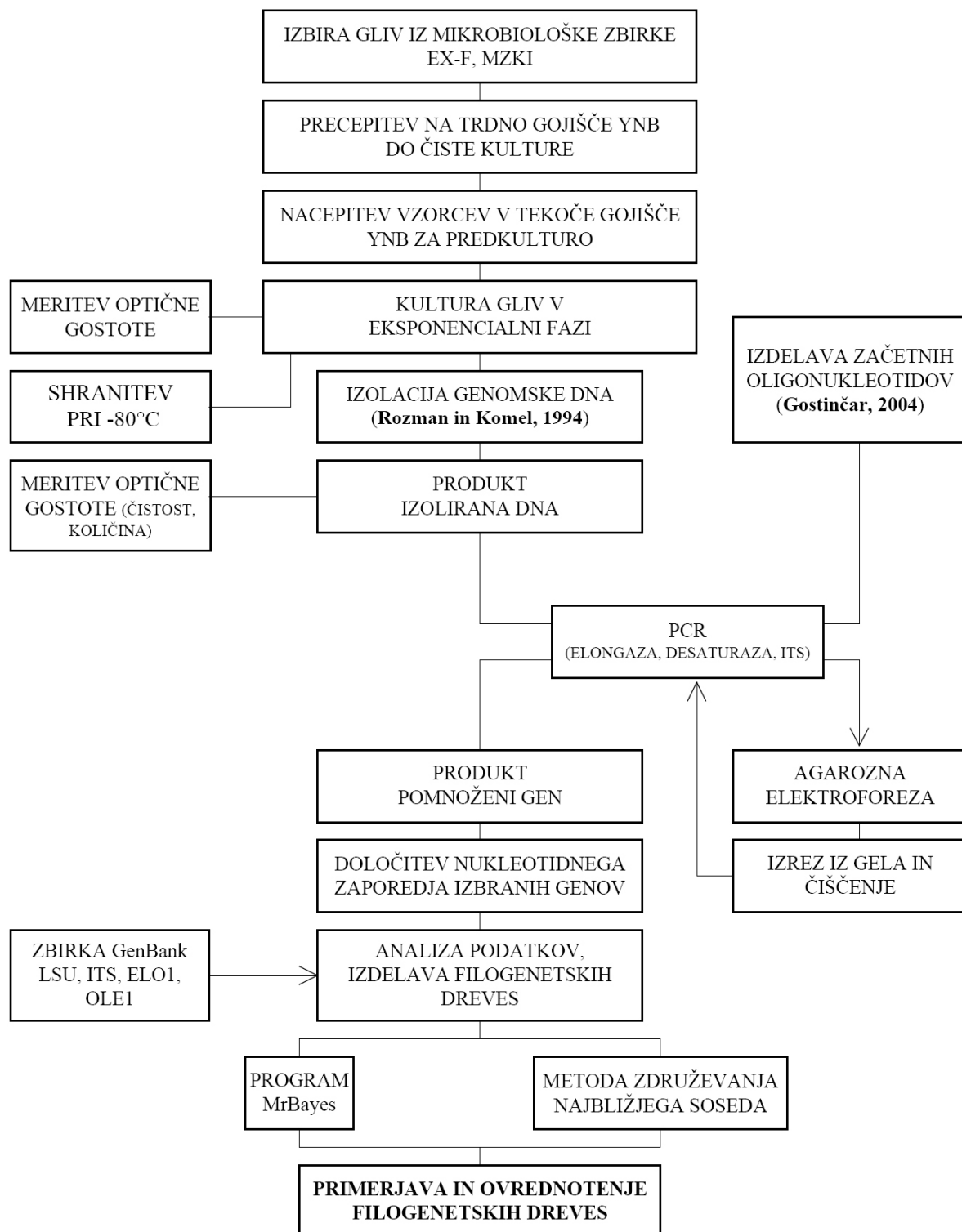
Tabela 2: Pregled taksonomske razporeditve izbranih gliv

Eukaryota - Fungi - Dikarya - Ascomycota									
poddeblo	razred	podrazred	red		družina		rod	vrsta	
Pezizomycotina	Dothideomycetes	Dothideomycetidae	Capnodiales		Davidiellaceae	mitosporne Davidiellaceae	Cladosporium	Cladosporium cladosporioides, Cladosporium sphaerospermum, Cladosporium halotolerans	
					Mycosphaerellaceae	mitosporne Mycosphaerellaceae	Trimmatostroma	Trimmatostroma abietis, Trimmatostroma salinum	
			Dothideales		mitosporne Dothideales			Hortaea	Hortaea werneckii
						Dothioraceae	mitosporne Dothioraceae	Aureobasidium	Aureobasidium sp., Aureobasidium pullulans
								Phaeotheca	Phaeotheca triangularis
	Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales		Trichocomaceae		Emericella	Emericella nidulans = Aspergillus nidulans	
							Neosartorya	Neosartorya fischeri	
					mitosporic Trichocomaceae		Aspergillus	Aspergillus clavatus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus terreus	
					Onygenales	Ajellomycetaceae	Ajellomyces	Ajellomyces capsulata = Histoplasma capsulatum	
					mitosporne Onygenales	Coccidioides	Coccidioides immitis		
	Leotiomycetes		Helotiales		Sclerotiniaceae		Botryotinia	Botryotinia fuckeliana	
	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales		Nectriaceae		Gibberella	Gibberella zeae	
		Sordariomycetes inc. s.			Magnaporthaceae		Magnaporthe	Magnaporthe grisea	
		Sordariomycetidae	Sordariales		Chaetomiaceae		Chaetomium	Chaetomium globosum	
				Sordariaceae		Neurospora	Neurospora crassa		
Saccharomycotina	Saccharomycetes		Saccharomycetales		Dipodascaceae		Yarrowia	Yarrowia lipolytica	
						mitosporne Saccharomycetales	Candida	Candida albicans, Candida glabrata	
						Saccharomycetaceae	Debaryomyces	Debaryomyces hansenii	
							Kluyveromyces	Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces thermotolerans	

						Lodderomyces	Lodderomyces elongisporus
						Pichia	Pichia angusta, Pichia guilliermondii, Pichia stipitis
						Saccharomyces	Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces kluyveri
		Saccharomycetes inc. s.					
Eukaryota - Fungi - Dikarya - Basidiomycota							
poddeblo	razred	podrazred	red		družina		rod
Agaricomycotina = Hymenomycetes	Dacrymycetes						
	mitosporne Agaricomycotina						
	Homobasidiomycetes	Agaricomycetidae	Agaricales		Tricholomataceae		Lentinula
	Tremellomycetes		Filobasidiales		Filobasidiaceae		Filobasidium
						mitosporne Filobasidiales	Cryptococcus
							Cryptococcus albidus, Cryptococcus curvatus, Cryptococcus liquefaciens
			Tremellales		Tremellaceae		Filobasidiella
							Cryptococcus neoformans
Basidiomycota inc. s.	Wallemiomycetes		Wallemiales			Wallemiales inc. s.	Wallemia
							Wallemia ichthyophaga, Wallemia muriae, Wallemia sebi
Pucciniomycotina	Microbotryomycetes		Sporidiobolales			mitosporne Sporidiobolales	Rhodotorula
							Rhodotorula rubra = Rhodotorula mucilaginoso
							Rhodosporidium
							Rhodosporidium babjevae, Rhodosporidium diobovatum
Ustilaginomycotina	Ustilaginomycetes		Ustilaginales		Ustilaginaceae		Ustilago
							Ustilago maydis
Eukaryota - Fungi - Fungi incertae sedis - Basal fungal lineages							
Mucoromycotina			Mortierellales		Mortierellaceae		Mortierella
							Mortierella alpina = Mortierella renispora
Eukaryota - Fungi - Glomeromycota							
	Glomeromycetes		Glomerales		Glomeraceae		Glomus
							Glomus clarum

(Hibbett in sod., 2007, UniProtKB taxonomy; <http://beta.uniprot.org/taxonomy>),

3. MATERIALI IN METODE



Slika 5: Shema delovnih postopkov

3.1. MIKROORGANIZMI IN POGOJI RASTI

Glive

Vsi v poskusu uporabljeni sevi so shranjeni v zbirki EX na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo BF (oznaki EXF in AR) ali v Mikrobiološki zbirki Kemijskega inštituta (oznaka MZKI).

Tabela 3 :Seznam preučevanih sevov.

Vrsta	Oznaka seva	Mesto izolacije	Okrajšava
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150, MZKI B 802	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	ApS
<i>Aureobasidium</i> sp.	EXF 914	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	AspA
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	CcS
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 2504	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	CcA
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	CsS
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 2513, AR 297	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	CsA
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K 528	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	CaA
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K 428	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	ClA
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EXF 589	Soline ob obali Atlantika, Namibija	DhS
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EXF 1590	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	DhA
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225, MZKI B 736	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	HwS
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K 560	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	FfA

Vrsta	Oznaka seva	Mesto izolacije	Okrajšava
<i>Phaeothecca triangularis</i>	EXF 206, MZKI B 741	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	PtS
<i>Pichia gulliermondii</i>	EXF 518	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	PgS
<i>Pichia gulliermondii</i>	EXF 1496	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	PgA
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	RbS
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K 650	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	RdA
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630	Subglacialni led, Kongsfjorden, zahodna obala otoka Spitzbergen, Svalbard, Norveška	RmA
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295, MZKI B 734	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	TsS
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	WiS
<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Izjemno slana voda Sečoveljskih solin, Slovenija	Wm
<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Seme sončnice, Švedska	Ws

Gojišče in gojenje

Sintetsko definirano gojišče YNB (Yeast Nitrogen Base)

YNB (Yeast Nitrogen Base, BIO 101)	1,7 g
CSM (Complete Supplement Mixture BIO 101)	0,8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck, Darmstadt, Nemčija)	5,0 g
Glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška)	20,0 g
NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija); različne koncentracije (0%, 17%, m/v)	
Destilirana voda	do 1000 ml

pH smo uravnali z 2M NaOH na pH 7, avtoklavirali 15 min. pri 121°C in 1,2 atm. Za trdno gojišče smo dodali 20 g agarja (Biolife) na liter gojišča.

Iz zamrznjene založne kulture smo izbrane seve gliv nacepili na trdno gojišče YNB in ploščo inkubirali pri sobni temperaturi (25°C) do pojava kolonij. Za predkulturo smo nato kolonijo s plošče vcepili v tekoče gojišče YNB z odgovarjajočo koncentracijo soli in ga inkubirali na rotacijskemu stresalniku pri 28°C in 180 vrtljajih na minuto dokler kultura ni dosegla primerne števila celic (določili smo ga z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm, OD₆₀₀ ~2,5). Po 1 ml predkulture smo nacepili v 200 ml tekočega gojišča YNB v pollitrskih steklenicah Erlenmeyer in spremljali rast kvasovk (pri 28°C in 180 vrtlj./min.) z merjenjem optične gostote pri 600 nm. Celice smo pobrali v eksponencialni fazi rasti (OD₆₀₀ = 0,8 – 1,0), od gojišča smo jih ločili z 10-minutnim centrifugiranjem pri sobni temperaturi in 5000 vrtlj./min. Nato smo jih zamrznili v tekočem dušiku in jih do nadaljnje obdelave shranili pri temperaturi -80°C.

3.2. IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Genomsko DNA smo izolirali iz celic izbranih sevov (Tabela 2) po prirejenem protokolu, ki je bil razvit za izolacijo genomske DNA iz gliv vrst *Cochliobolus lunatus* in *Curvularia lunata* (Rozman in Komel, 1994). Reagente smo pripravili z vodo MilliQ in jih sterilizirali z avtoklaviranjem razen 10-odstotnega Na-lauroilsarkozina, ki smo ga sterilizirali s filtracijo.

- *Ekstrakcijski pufer*
100mM Tris (Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA), pH 8,0

100 mM EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvaška)

250 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *10-odstotni Na-lauroilsarkozin* (Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA)
- 5M NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *10-odstotni heksadeciltriamonijev bromid* (CTAB; Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA) v *0.7 M NaCl* (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *Kloroform* (Merck, Darmstadt, Nemčija):*izoamilalkohol* (Kemika, Zagreb, Hrvaška)= 24:1
- *Izopropanol* (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *Pufer TE*
10 mM Tris (Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA), pH 7,6

1 mM EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- 3 M *Na-acetat* (Kemika, Zagreb, Hrvaška), pH 5
pH smo uravnali z očetno kislino
- *Absolutni etanol in 70 odstotni etanol* (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *Proteinaza K* (18 mg/ml; Fermentas, Life Sciences, Litva)
- *RNaza A* (1mg/ml; Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA)

Tri grame zamrznjenih celic smo uprašili v terilnici ob hlajenju s tekočim dušikom in jih nato resuspendirali v 10 ml ekstrakcijskega pufera, ki smo mu dodali proteinazo K v končni koncentraciji 0,5 mg/ml. Suspenziji smo dodali še 1/10 volumna 10-odstotnega Na-lavroilsarkozina in jo inkubirali

preko noči pri temperaturi 50°C in stresanju s 170 vrtlj./min.. Po inkubaciji smo dodali po 170 µl 5 M NaCl in 135 µl 10-odstotnega haksadeciltriamonijevega bromida (CTAB) v 0,7 M NaCl na mililiter vzorca ter 30 min inkubirali pri 65°C in stresanju 50 vrtlj./min.. Sledila je ekstrakcija z enim volumnom mešanice kloroform:izoamilalkohol (24:1, v/v), ki smo jo ponavljali tako dolgo, dokler ni bila interfaza med organskimi topili in vodno raztopino povsem bistra. Pri ločitvi topil smo si pomagali s 5-minutnim centrifugiranjem pri 5000 x g in 4°C. Iz tako dobljene vodne faze smo nukleinske kisline oborili z dodatkom 0,6 volumna 2-propanola in dveurno inkubacijo pri -20°C. Pelet dobljen po 10-minutnem centrifugiranju pri 5000 x g in 4°C smo raztapljali s 500 µl pufra TE, 10 min. Raztapljanje s puffrom TE smo ponovili še trikrat in frakcije prenesli v štiri ločene sterilne mikrocentrifugirke po Eppendorfu. Iz dobljenih vodnih frakcij smo nukleinske kisline oborili z etanolno precipitacijo s predhodnim nakisanjem (1/10 volumna 3 M Na-acetata, pH 5 in 2 volumna absolutnega alkohola), ki je potekala čez noč pri -20°C. Pelet (DNA), dobljen po centrifugiranju (15 min., 14 000 x g, 4°C), smo posušili pri sobni temperaturi in raztopili v 500 µl pufra TE. Raztopino DNA smo nato še enkrat čistili z mešanico kloroform:izoamilalkohola (24:1, v/v) in po ločitvi vodne faze ponovno izvedli etanolno precipitacijo s predhodnim nakisanjem. Po centrifugiranju (5 min., 5000 x g, 4°C) smo ponovili spiranje s 70-odstotnim etanolom (1ml), pelet posušili in raztopili v 200 µl pufra TE. Raztopini smo dodali 100 µl RNaze A, inkubirali 1 uro pri 37°C in ponovili etanolno precipitacijo s predhodnim nakisanjem in inkubacijo čez noč pri -20°C. Po centrifugiranju smo pelet še zadnjič dvakrat sprali s 70-odstotnim etanolom (1ml), ga posušili in raztopili v 150 µl pufra TE. Koncentracijo in čistost vzorcev smo izmerili s spektrofotometrom pri 260 nm oziroma 280 nm z upoštevanjem, da je OD₂₆₀ = 1 pri koncentraciji DNA 50 µg/ml, integriteto izolirane DNA pa ocenili s pomočjo agarozne elektroforeze (1-odstoten agarozni gel, m/v). Za nadaljne postopke smo uporabljali vzorce nerazgrajene DNA, katerih razmerje A_{260/280} je presegalo vrednost 1,8.

3.3. AGAROZNA ELEKTROFOREZA DNA

Reagenti:

- *10x puffer TBE, pH 8,0*
Tris (Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA) 108,99 g
borova kislina (Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA) 55,65 g
EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvaška) 7,44 g
destilirana voda do 1000 ml
- *5x nanašalni puffer*
bromofenol modro (Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA) 0,25 g
ksilen cianol (Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA) 0,25 g
glicerol (Kemika, Zagreb, Hrvaška) 30 ml
destilirana voda do 100 ml
- *agaroz* (SeaKem, BMA)
- *etidijev bromid* (10 mg/ml; Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA)

Elektroforeza je potekala v aparaturi HE 33 (Hofer) pri 100 V v 0,5× pufri TBE in 1-odstotnem agaroznem gelu. Gel smo pripravili z 0,5× pufrom TBE in mu dodali 3 µl etidijevega bromida na 100 ml gela. Vzorcem DNA smo pred nanosom na gel dodali 1/5 volumna 5× nanašalnega pufra, kot standard pa smo na gel nanegli tudi mešanico fragmentov DNA znanih velikosti (GeneRuler™, Fermentas). Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV-transluminatorjem in ga fotografirali. Velikost DNA smo določili primerjalno s fragmenti DNA znanih velikosti.

3.4. DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOV

3.4.1. Začetni oligonukleotidi

Gena za Δ^9 -desaturazo in elongazo

Desaturaze so bolj raziskane kot elongaze in v banki podatkov GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/GenBankSearch.html>) najdemo več nukleotidnih zaporedij njihovih genov, pa tudi več aminokislinskih zaporedij samih encimov. Uporabili smo začetne oligonukleotide narejene za glivo *Hortaea werneckii*, ki jih je v svoji diplomski nalogi objavil Gostinčar (2004). To so:

Začetna oligonukleotida delnega zaporedja gena za Δ^9 -desaturazo

5'-TACACCGATACCGACAAGGACCCCTA-3' Hw-OLE1-F

5'-GGAAGTCGTGGTGGAAAGTTGTGGTA-3' Hw-OLE1-R

Nedegenerirana začetna oligonukleotida delnega nukleotidnega zaporedja gena za elongazo (uporabljena samo za reakcije določanja zaporedja)

5'-GCGCGTCATCTGCTACATCATCAT-3' ELOfil-F

5'-CGGGCGGACTGGAAGTAGTA-3' ELOfil-R

Degenerirani začetni oligonukleotidi delnega nukleotidnega zaporedja gena za elongazo

5'-GTCATCTACTACATCATCATHTTYGGNGG-3' HwFEN1-F

ali

5'-GCGCGTCATCTGCTACATCATCATHTTYGGNGG-3' FEN1-F

in

5'-CGGGCGGACTGGAAGTAGTAVYARTACAT-3'

HwFEN1-R

Za pomnoževanje delnega zaporedja gena za elongazo smo uporabili kombinacijo začetnikov HwFEN1-F in HwFEN1-R ali pa kombinacijo FEN1-F in HwFEN1-R. Dobljeni produkt smo nato še enkrat pomnožili s pomočjo nedegeneriranih začetni oligonukleotidi ELOfil-F in ELOfil-R (vgnezden PCR).

ITS rDNA

Za pomnožitev zaporedja regij ITS1, 5'8S in ITS2, smo uporabili začetna oligonukleotida (White in sod., 1990). To sta:

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS4

5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

ITS5

3.4.2. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Gen za Δ^9 -desaturazo

Del gena za Δ^9 -desaturazo smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), pri čemer smo za matrico uporabili genomsko DNA, izolirano iz izbranih sevov in začetne oligonukleotide Hw-OLE1, objavljene v diplomski nalogi Gostinčar (2004). V reakciji smo uporabili mešanico deoksiribonukleotidov (GeneAmp) v končni koncentraciji 0,25 mM posameznega deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP in dTTP), Taq DNA polimerazo (Fermentas) v končni koncentraciji 0,0625 enot/ μ l oz. 0,05 enot/ μ l, originalno priložen 10x reakcijski pufer brez magnezijevega klorida, $MgCl_2$ v končni koncentraciji 1,5 mM, oba začetna oligonukleotida, vsak v končni koncentraciji 0,75 μ M in matrično DNA v približni končni koncentraciji 0,2 μ g/ μ l.

Uporabili smo dve različni metodi; verižno reakcijo s polimerazo s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico (*»touchdown PCR«*) in verižno reakcijo s polimerazo pri konstantni temperaturi prileganja (PCR).

Pogoji pri verižni reakciji s polimerazo za Δ^9 -desaturazo so bili: 5-minutna denaturacija pri temperaturi 94°C, ki ji je sledilo 30 ciklov sestavljenih iz 30 s denaturacije pri temperaturi 94°C, 30 s prileganja pri 52°C in 30 s s podaljševanjem pri 72°C. Na koncu je sledilo 7-minutno podaljševanje pri 72°C.

Gen za Δ^9 -desaturazo smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico (*»touchdown PCR«*). Temperatura prileganja se je prvih deset zaporednih ciklov v vsakem ciklu znižala za 1,2°C in sicer z začetnih 52°C do končnih 40°C, oziroma z začetnih 56°C do končnih 46°C z zniževanjem po 1°C, nato pa je pri zgoraj opisanih pogojih, s temperaturo prileganja 56°C, verižna reakcija tekla še nadaljnih 28 ciklov.

Reakcija je potekala v aparatu za PCR Mastercycler ep Gradient (Eppendorf).

Velikost in čistost produktov opisanih reakcij smo preverili z elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu (m/v), opisano v poglavju št. 3.3, željene produkte smo izrezali iz gela in jih očistili s kompletom za izolacijo DNA iz agaroznega gela (Promega, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System), sledeč navodilom proizvajalca. Tako izoliranim produktom so nukleotidno zaporedje določili v laboratorijih družbe Macrogen Inc.

Gen za elongazo

Za pomnožitev dela gena za elongazo smo pri verižni reakciji s polimerazo najprej uporabili degenerirane začetne oligonukleotide (FEN1), nato pa smo dobljene produkte reakcije ponovno pomnožili z nedegeneriranim parom začetnikov (ELOfil). Pogoji pri verižni reakciji s polimerazo za elongazo so bili: 5-minutna denaturacija pri temperaturi 94°C, ki ji je sledilo 35 ciklov sestavljenih iz 30 s denaturacije pri temperaturi 94°C, 30 s prileganja pri 50°C in 30 s s podaljševanjem pri 72°C. Na koncu je sledilo 7-minutno podaljševanje pri 72°C.

Gen za elongazo smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico (*»touchdown PCR«*). Temperatura prileganja se je prvih deset zaporednih ciklov v vsakem ciklu znižala za, v prvem primeru 1°C in sicer, z začetnih 56°C do končnih 46°C, v drugem pa za 1,2°C z začetnih 52°C na 40°C. Nato je pri zgoraj opisanih teh pogojih, s temperaturo prileganja 56°C, verižna reakcija tekla še nadaljnjih 28 ciklov.

Notranji prepisni vmesnik ITS rDNA

Za pomnožitev nukleotidnega zaporedja notranjega prepisnega vmesnika ITS rDNA (regije ITS1, 5'8S in ITS2; velikosti približno 550 bp) z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), smo uporabili začetne oligonukleotide ITS4 in ITS5. Pomnožili smo notranja prepisana vmesnika (ITS1 in ITS2) z verižno reakcijo s polimerazo s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico (*»touchdown PCR«*). Temperatura prileganja se je prvih deset zaporednih ciklov v vsakem ciklu znižala za 1°C in sicer z začetnih 55°C do končnih 45°C, nato pa se je reakcija nadaljevala s 25 cikli sestavljenimi iz 30 s denaturacije pri temperaturi 94°C, 30 s prileganja pri 54°C in 30 s s podaljševanjem pri 72°C. Na koncu je sledilo 7-minutno podaljševanje pri 72°C.

3.5. ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Dobljena delna nukleotidna zaporedja proučevanih genov naših gliv smo uredili s programom FinchTV (Geospiza; <http://www.geospiza.com/finchtv/index.htm>) in poiskali homologe med objavljenimi nukleotidnimi zaporedji gliv v bazi podatkov GenBank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) z algoritmom BLAST (Altschul in sod., 1997; Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

Za filogenetsko analizo nukleotidnega zaporedja notranjega prepisnega vmesnika ITS (ITS1, 5'8S in ITS2 rDNA), delov genov elongaze (*ELO1*) in Δ^9 -desaturaze (*OLE1*), smo v poravnavo vključili pridobljena nukleotidna zaporedja iz naših gliv in zaporedja glivnih vrst, ki smo jih pridobili iz baze podatkov GenBank (NCBI). Iz te baze podatkov smo poiskali tudi zaporedja velike podenote (LSU) ribosomske rDNA proučevanih gliv. Nukleotidna zaporedja smo med seboj poravnali s programom ClustalX (Thompson in sod., 1994; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) ter poravnavo ročno popravili s programom BioEdit (Hall, 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), kjer je bilo to potrebno. Iz poravnanih zaporedij smo s programom Mega4 (Tamura in sod. 2007; <http://www.megasoftware.net/data.html>) naredili filogenetsko drevo. Iz podatkov smo izključili večje insercije in nezanesljivo poravnane regije. Genetske razdalje smo izračunali po dvoparametričnem Kimurinemu modelu nukleotidne zamenjave (Kimura, 1980) in z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (*»neighbour joining«*) izrisali drevo (Saitou in Nei, 1987). Zanesljivost skupin oz. verjetnost sorodstvenih odnosov na izrisanem drevesu smo ocenili s statistično metodo vezanja, analizo 'bootstrap' (10000 permutacij) v programu Mega4.

Poleg distančne metode združevanja najbližjega soseda smo za konstrukcijo filogenetskih dreves uporabili tudi program MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck in Ronquist 2001; <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>), ki je vzorčil vsako stoto drevo in pri končnem izračunu konsenznega drevesa izpustil prvih 20% dreves. Uporabljen je bil standardni nukleotidni substitucijski model (*4by4*) s šestimi parametri. Za merilo zanesljivosti skupin smo uporabili posteriorno verjetnost (*»posterior probability«*), ki predstavlja delež, v katerem se določena skupina pojavi med vsemi vzorčenimi drevesi, z izjemo začetnih 20% dreves.

Pri nukleotidnem zaporedju notranjega prepisnega vmesnika ITS smo za analizo v programu MrBayes ločili nukleotidno zaporedje na odseke ITS1, 5'8S in ITS2 rDNA. Pri postavljanju filogenetskega drevesa nukleotidnih zaporedij velike podenote (LSU) ribosomske rDNA smo drevo tudi ukoreninili z glivo *Glomus clarum*, *Glomeromycota* (GenBank = AF396796). Pri postavljanju filogenetskega drevesa nukleotidnih zaporedij gena elongaze (*ELO1*) in Δ^9 -desaturaze (*OLE1*) smo ti drevesi ukoreninili z rodом gliv *Wallemia* oz. z vrsto *Mortierella alpina* (*Mucoromycotina*).

Za oceno uporabnosti nukleotidnih zaporedij izbranih genov oz. odsekov genoma smo določali število informativnih mest. To smo naredili s pomočjo programa Phylo_win (Galtier in sod., 1996; <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/phylowin.html>).

3.6. FILOGENETSKE ANALIZE

3.6.1. Metode

3.6.1.1. Združevanje najbližjega soseda («neighbour joining«)

Metoda spada med distančne metode. Pri tej se filogenetske razdalje izražajo kot delež mest, ki se razlikuje med dvema zaporedjema v poravnavi nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij. Par zaporedij, ki se razlikuje v manjšem deležu mest, je bolj podoben in tako bolj soroden od para z večjim deležem razlik. Na splošno velja, da več časa kot preteče od ločitve od skupnega prednika, bolj se zaporedja med seboj razlikujejo. Odstopanja od pričakovanega se pojavljajo zaradi razlik v hitrosti evolucije in multiplih substitucij.

Združevanje najbližjega soseda je algoritemska metoda, ki manipulira matriko filogenetskih razdalj in ji z vsakim korakom zmanjša velikost in nato sestavi drevo. Na koncu izračuna razdaljo notranjih točk trenutnih nukleotidnih zaporedij (Hall 2001).

Iz začetne matrike se izračuna mrežno divergenco od vseh taksonov, kot vsoto individualnih razdalj od taksona. Za začetek tvorbe drevesa se uporabi par OTE, pri katerem izračunamo najkrajšo dolžino vej oz. razdalj med OTE. Ta par OTE se naprej obravnava kot ena OTE. Med preostalimi OTE se izračuna aritmetično sredino («mean«) in sestavi distančno matriko. Iz med preostalimi parov se ponovno izbere par z najkrajšo dolžino vej oz. razdalj med OTE. Ta postopek se ponavlja dokler niso vse notranje veje razporejene (Graur in Li, 2000). Razdalje taksonov od korenine so lahko različne (Hall 2001).

Združevanje najbližjega soseda («*neighbour joining*«) je metoda tvorbe dreves z najmanjšo razdaljo. Zamenjuje metodo NMPSA oz. UPGMA («Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean«), vendar je med manj zanesljivimi metodami (Hall 2001). Je direktna in relativno preprosta, saj vsebuje malo informacij, kot je razporeditev OTE (Baldauf, 2003). Nekateri avtorji jo smatrajo kot začetno metodo raziskav filogenetskih odnosov (Hills in sod., 1996; Baldauf, 2003).

3.6.1.2. Program MrBayes

Omenjeno metodo štejemo med diskretne metode. MrBayes je program Bayesian povzetka filogenije, ki temelji na beleženju posteriornih verjetnosti («*posterior probabilities*«). To pridobimo na podlagi modela evolucije, narejenega na predhodni preučitvi podatkov. Na podlagi le-tega program išče drevo, ki najbolj ustreza izbranemu modelu in podatkom oz. poravnavi. Rezultat je nabor najbolj verjetnih dreves.

Program MrBayes uporablja algoritem Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo (MCMCMC). Ta izbira drevesa iz distribucije posteriornih verjetnosti («*posterior probabilities*«).

Metoda je odvisna od znakov in uporabi vsa mesta poravnave. Začne se z določenim ali naključno izbranim drevesom s kombinacijo dolžin vej, parametri substitucij in hitrosti variacije med parametri, ki določajo začetno stanje verige. Predlaga se novo stanje in izračuna verjetnost le-tega v odvisnosti od starega stanja in nato izbere novo, če je naključno izbrano število med 1 in 0 manjše od izračunane verjetnosti novega stanja. To vključuje premik veje in/ali spremembo v dolžini veje drevesa. Pri velikem številu generacij se proces zaključi s skupino dreves, pri katerih so verjetnosti tako podobne, da je njihovo sprejetje oz. zavrnitev stvar naključja. Po koncu imajo drevesa različno pogostost v distribuciji možnosti. Pri dovolj velikem številu vzorcev, je verjetnost vzorčenja različnih rešitev enako verjetna kot najboljšo drevo. Vzorčena drevesa se shranijo. Pogostost pojava določenega drevesa v naboru dreves predstavlja verjetnost, da je to najboljšo drevo izmed izbranih.

Program hkrati požene več neodvisnih verig z začetkom v istem naključno izbranem drevesu. Zaradi stohastičnih dogodkov, med verigami hitro pride do razlik. Ena od verig je hladna (*»cold chain«*) veriga in je vir dreves shranjenih na določeno število (običajno 100) generacij. Če se mrzla veriga ustavi na vrhu z nizko verjetnostjo, ima možnost zamenjave z drugo, ogrevano verigo (*»heated chain«*), ki lažje preskakuje med lokalnimi optimumi. Ta ima lahko višjo verjetnost, vendar to ni nujno (Hall 2001).

Nastala drevesa so bogata z informacijami. Metoda je bolj občutljiva na filogenetski signal in potrebuje malo informativnih mest za nastanek dobro podprtih odnosov (Hall 2001).

Primerjava obeh metod je pokazala, da imajo drevesa narejena s programom MrBayes več dobro podprtih vej kot drevesa, ocenjena s pomočjo vrednost metode vezanja (*»bootstrap«*). To naj bi bilo zaradi večje občutljivosti le-te na filogenetski signal (Alfaro in sod., 2003, cit. po Tang in sod., 2007). Po Tang in sod., (2007), pa imajo drevesa narejena s programom MrBayes precenjeno število podprtih vej, drevesa ocenjena s pomočjo vrednost metode vezanja (*»bootstrap«*) pa podcenjeno. Prav tako zaključuje, da je podprtost vej drevesa narejenih na podlagi enega filogenetskega označevalca precenjena oz. podcenjena in je zato pri interpretaciji teh rezultatov potrebna previdnost.

3.6.1.3. Določanje informativnih mest

Mesto je določeno kot nespremenljivo (*»invariant«*) če so vse zunanje točke (operacijske taksonomske enote) enake in imajo isti znak (nukleotid) na izbranem mestu. Variabilna mesta (*»variable characters«*) so lahko informativna ali neinformativna. Nukleotidno mesto je filogenetsko informativno le, če preferira določen nabor filogenetskih dreves izmed vseh možnih dreves. Določeno mesto je informativno, če favorizira drevo, ki potrebuje za spremembo oz. vrnitev nukleotida v izvorno oz. enako stanje manj sprememb kot drugo drevo. Informativna mesta, ki podpirajo notranje veje drevesa so sinapomorfije, vsa ostala informativna mesta pa so homoplazije (Graur in Li, 2000). Informativna mesta tako določajo filogenetske odnose (Graur in Li, 2000).

4. REZULTATI

4.1. PORAVNAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Pomnožili smo skupno 58 zaporedij izbranih genov, od tega 24 nukleotidnih zaporedij notranjih prepisanih vmesnikov ribosomske DNA (ITS rDNA), 18 delnih zaporedij gena za elongazo (*ELO1*) in 16 za Δ^9 - desaturazo (*OLE1*). Rezultati pomnoževanja nukleotidnih zaporedij izbranih genov so priloženi v prilogah Priloga A, Priloga B in Priloga C. Stotrinajst dodatnih zaporedij smo dodali za primerljivost in večjo natančnost filogenetskih dreves. Posebej smo pregledali tudi 31 celotnih zaporedij genov za Δ^9 - desaturazo in 10 za elongazo. Po navodilih (Diezmann in sod., 2004) smo upoštevali filogenetske odnose, podprte z vrednostmi metode vezanja (»bootstrap«), ki so bile večje ali enake 50% in večje ali enake 70% oz. posteriorne verjetnosti (»posterior probability«), ki so bile večje ali enake 95%.

4.2. VELIKA PODENOTA RIBOSOMSKE DNA (LSU rDNA)

Filogenetske odnose preučevanih gliv, kjer smo kot filogenetski označevalec uporabili veliko ribosomsko podenoto (LSU) rDNA, smo prikazali v filogenetskih drevesih (Slika 5, Slika 6). Za uspešno primerjavo le-teh z ostalimi filogenetskimi drevesi, narejenimi na podlagi drugih označevalcev, smo v raziskavo vključili nukleotidna zaporedja LSU gliv, iz katerih smo izolirali delna nukleotidna zaporedja genov za Δ^9 - desaturazo in elongazo, pridobljena v zbirki GenBank dne 13.9.2007; *Aureobasidium pullulans* (DQ470956), *Cladosporium cladosporioides* (DQ008146), *Cladosporium sphaerospermum* (AY342104), *Cryptococcus albidus* (AY296054), *Cryptococcus liquefaciens* (DQ538364), *Debaryomyces hansenii* (DQ409146), *Filobasidium floriforme* (AF459697), *Hortaea werneckii* (AY213707), *Pichia guilliermondii* (EF063134), *Rhodosporidium babjevae* (AJ749832), *Rhodotorula diobovatum* (AB217485), *Rhodotorula mucilaginoso* (DQ832198), *Saccharomyces cerevisiae* (EF063139), *Trimmatostroma salinum* (DQ678092), *Wallemia ichthyophaga* (DQ847516), *Wallemia muriae* (DQ847517) in *Wallemia sebi* (DQ847518).

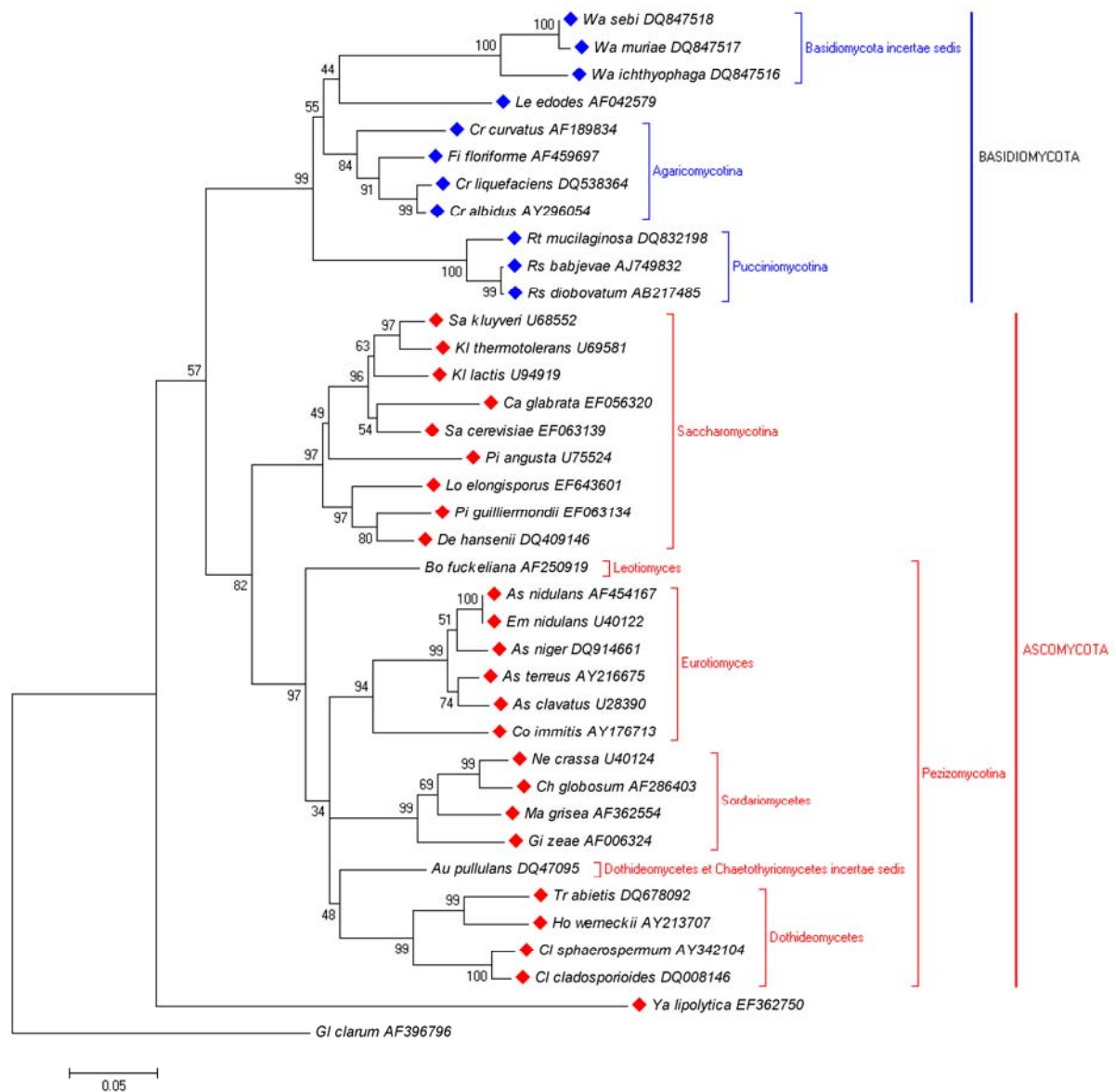
Dodali smo še nukleotidna zaporedja LSU gliv, katerih delna nukleotidna zaporedja genov za Δ^9 - desaturazo in elongazo smo uporabili pri postavljanju filogenetskih dreves za ta označevalca in sicer *Aspergillus clavatus* (U28390), *Aspergillus nidulans* (AF454167), *Aspergillus niger* (DQ914661), *Aspergillus terreus* (AY216675), *Aureobasidium pullulans* (DQ47095), *Botryotinia fuckeliana* (AF250919), *Candida glabrata* (EF056320), *Chaetomium globosum* (AF286403), *Coccidioides immitis* (AY176713), *Cryptococcus curvatus* (AF189834), *Emericella nidulans* (U40122), *Gibberella zeae* (AF006324), *Glomus clarum* (AF396796), *Kluyveromyces lactis* (U94919), *Kluyveromyces thermotolerans* (U69581), *Lentinula edodes* (AF042579), *Lodderomyces elongisporus* (EF643601), *Magnaporthe grisea* (AF362554), *Neurospora crassa* (U40124), *Pichia angusta* (U75524), *Saccharomyces kluyveri* (U68552), *Trimmatostroma abietis* (DQ678092), in *Yarrowia lipolytica* (EF362750).

Izračun filogenetskega drevesa

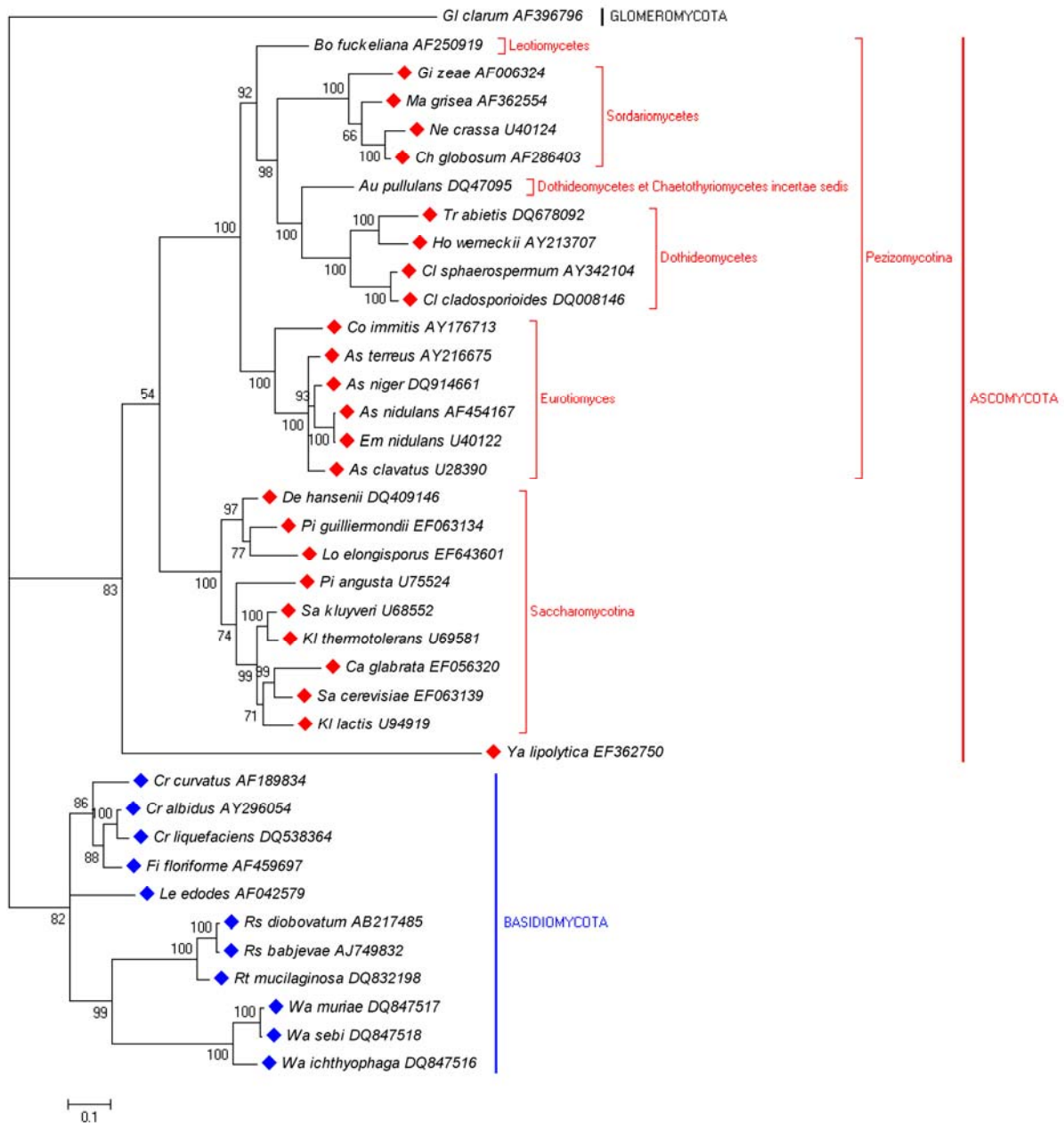
S pomočjo programa MrBayes (Slika 6) kot tudi distančne metode združevanja najbližjega soseda (Slika 5), so se v filogenetskem drevesu vrste gliv združevale v skupine na ravni debla, to so *Ascomycota*, *Basidiomycota* in *Glomeromycota*, s katero smo drevo ukoreninili, in na ravni poddebla, to so *Agaricomycotina*, *Walemiomycetes*, *Pucciniomycotina*, *Pezizomycotina* in *Saccharomycotina*. Na ravni razreda se združujejo le vrste drevesa *Ascomycota*.

V deblu *Basidiomycota* se OTE (operacijske taksonomske enote) združujejo v redove, *Wallemiales*, *Agaricales*, *Filobasidiales*, *Tremellales* in *Sporidiobolales*, ki so dobro podprti. OTE se v okviru redov združujejo v skupne rodove, kjer ni jasna (slabo podprta) le njihova medsebojna razporeditev. Združevanje v družine ni znano, zaradi pomanjkanja različnih rodov iste družine. Razporeditev taksonov je enaka za obe metodi.

V deblu *Ascomycota* prihaja do združevanja OTE v skupne razrede. Po obeh metodah se predstavniki družin, združenih v poddeblo *Pezizomycotina*, ločujejo v posamezne redove, združene v razrede. Med te štejemo redove *Hypocreales* in *Sordariales* združene v razred *Sordariomycetes*, redove *Capnodiales* in *Dothideales* v *Dothideomycetes* in redove *Eurotiales* in *Onygenales* v *Eurotiomycetes*. Vse veje oz. skupine so dobro podprte. Poddeblo *Saccharomycotina* ima predstavnike le enega redu, vrste se ne združujejo naprej v skupne rodove in družine. Artefakt v drevesu predstavlja *Yarrowia lipolytica*, katero uvrščamo v red *Saccharomycetales*.



Slika 6: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij LSU rDNA (pridobljenih iz baze podatkov GenBank) z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (»neighbour joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap«) s številom permutacij 10^4 . Kot zunanjika (»outgroup«) smo uporabili *Glomus clarum*. Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav.



Slika 7: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij LSU rDNA (pridobljenih iz baze podatkov GenBank) s programom MrBayes (število generacij 2×10^6). Številke ob razvejitvah predstavljajo verjetnosti grozdov. Kot zunanjika (»outgroup«) smo uporabili *Glomus clarum*. Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav.

4.3. FILOGENETSKO DREVO ITS rDNA

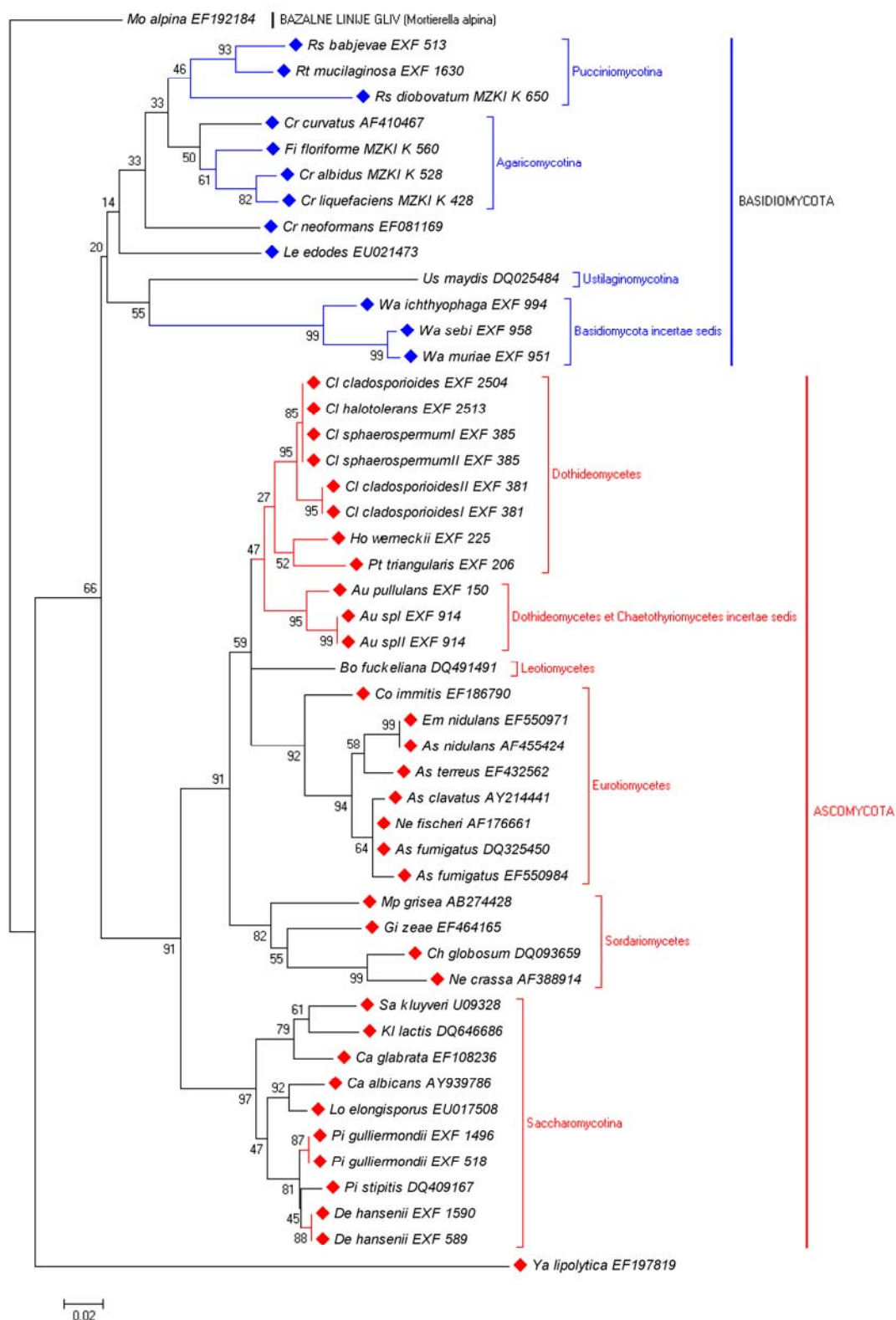
Filogenetske odnose preučevanih gliv na podlagi nukleotidnih zaporedij notranjih prepisnih vmesnikov ribosomske DNA (ITS1, ITS2 rDNA) smo prikazali v filogenetskih drevesih (Slika 7, Slika 8). Nukleotidna zaporedja določena v naši raziskavi so priložena v prilogi C. Za seznam glej Tabela 2. Za uspešno primerjavo le-teh z ostalimi filogenetskimi drevesi, narejenimi na podlagi drugih označevalcev, smo v raziskavo vključili nukleotidna zaporedja pridobljena v zbirki GenBank dne 14.9.2007 naslednjih gliv: *Aspergillus clavatus* (AY214441), *Aspergillus fumigatus* (DQ325450), *Aspergillus fumigatus* (EF550984), *Aspergillus nidulans* (AF455424), *Aspergillus terreus* (EF432562), *Botryotinia fuckeliana* (DQ491491), *Candida albicans* (AY939786), *Candida glabrata* (EF108236), *Chaetomium globosum* (DQ093659), *Coccidioides immitis* (EF186790), *Cryptococcus curvatus* (AF410467), *Cryptococcus neoformans* (EF081169), *Emericella nidulans* (EF550971), *Gibberella zeae* (EF464165), *Kluyveromyces lactis* (DQ646686), *Lentinula edodes* (EU021473), *Lodderomyces elongisporius* (EU017508), *Magnaporthe grisea* (AB274428), *Mortierella alpina* (EF192184), *Neosartorya fischeri* (AF176661), *Neurospora crassa* (AF388914), *Pichia stipitidis* (DQ409167), *Saccharomyces kluyveri* (U09328), *Ustilago maydis* (DQ025484) in *Yarrowia lipolytica* (EF197819).

Ureditev nukleotidnih zaporedij v filogenetsko drevo

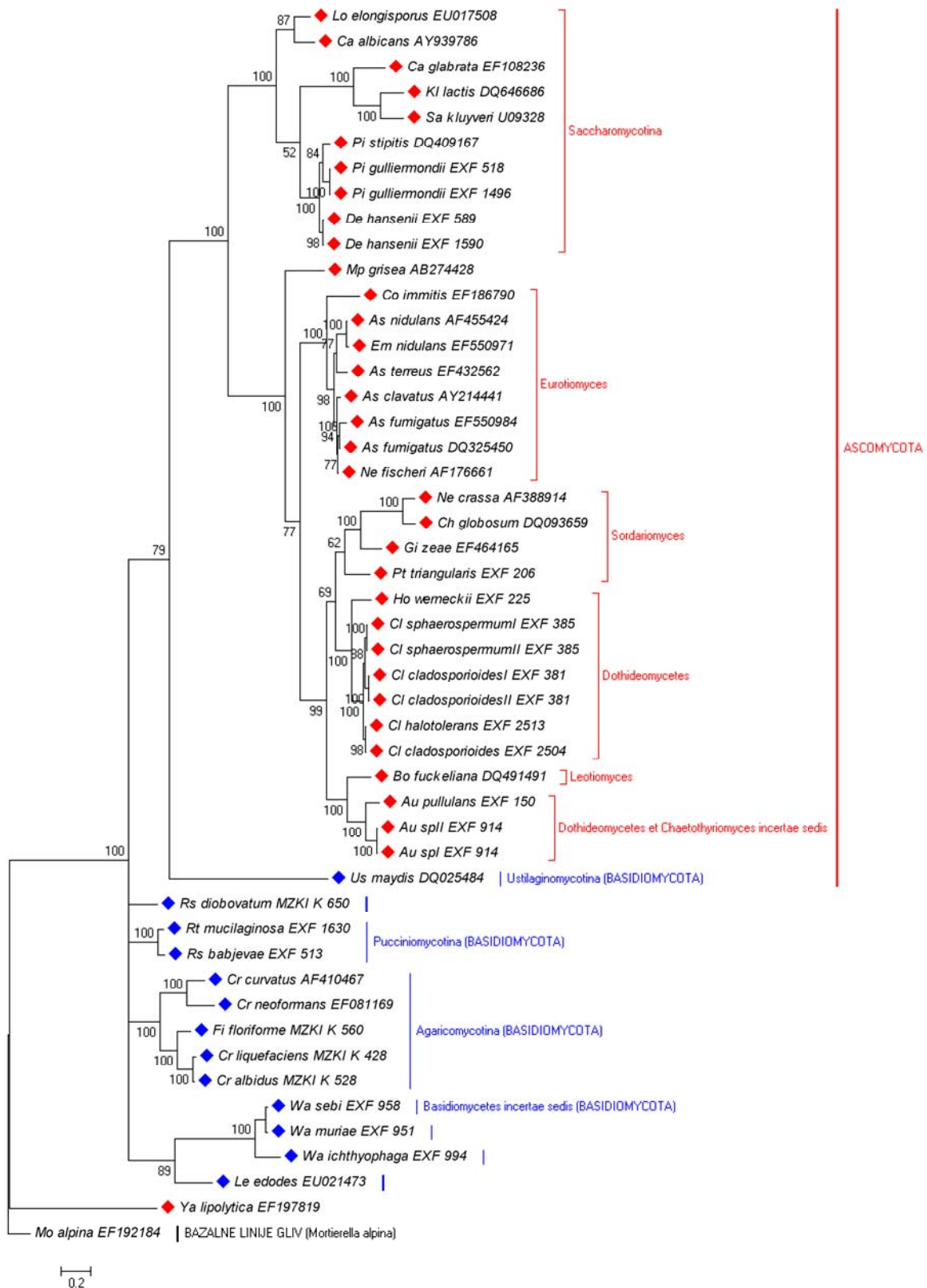
V drevesih narejenih s programom MrBayes (Slika 8), kot tudi z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (Slika 7), so se taksoni združili v skupine, ki se skladajo z uveljavljenimi debli *Ascomycota* (s poddebli *Pezizomycotina* in *Saccharomycotina*), in *Basidiomycota* (s poddebli *Agaricomycotina* in *Pucciniomycotina*) ter na ravni razreda *Walemiomycetes*. Z *Mucoromycotina* (bazalne linije gliv) smo drevo ukoreninili. Delno združitev na ravni razreda smo opazili le med vrstami debla *Ascomycota*, razen pri drevesih, narejenih s programom MrBayes, kjer so se vrste združevale v skupne razrede in redove. V deblu *Basidiomycota* so se vrste združevale na ravni redov.

V deblu *Basidiomycota* se vrste združujejo v rodove. Izjeme predstavljajo rodovi *Filobasidium*, *Neosartorya* in *Candida*. Po metodi združevanja najbližjega soseda je večina vej tega debla slabo podprta, nasprotno pa so veje oz. v tem primeru gruče pri diskretni metodi, dobljene s pomočjo programa MrBayes, bolj podprte, a je njihova razporeditev neznana, saj so gruče rodov razporejene polifiletsko.

V deblu *Ascomycota* prihaja do združevanja vrst v razrede. V filogenetskem drevesu narejenim s pomočjo programa MrBayes, se vrste združujejo na ravni redov in nato ponovno na ravni rodov, znotraj razreda *Eurotiomycetes* na reda *Onygenales* in *Eurotiales*, v razredu *Saccharomycetes* na red *Saccharomycetales* in v razredu *Sordariomycetes* na reda *Sordariales* in *Hypocreales*. Do združevanja populacij v skupne vrste in rodove prihaja v filogenetskem drevesu pri obeh metodah, to so rodovi *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Debaryomyces* in *Pichia*. V primerih kjer je več predstavnikov iste vrste oz. rodu, so veje bolj podprte. Artefakt v drevesu predstavlja *Yarrowia lipolytica*, ki se proti pričakovanjem nahaja zunaj redu *Saccharomycetales*.



Slika 8: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (»neighbour joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap«) s številom permutacij 10^6 . Kot zunanjika (»outgroup«) smo uporabili zaporedje glive *Mortierella alpina* (*Mucoromycotina*). Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z barvno črto so označene glive obravnavane v diplomskem delu.



Slika 9: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA s programom MrBayes (število generacij 2×10^6). Številke ob razvejitvah predstavljajo verjetnosti grozdov. Kot zunanjika (*«outgroup»*) smo uporabili zaporedje glive *Mortierella alpina* (*Mucoromycotina*). Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z barvno črto so označene glive obravnavane v diplomskem delu.

4.4. GEN ZA ELONGAZO (*ELO1*)

Iz poravnave delnih nukleotidnih zaporedij genov za elongaze smo z dvema metodama izračunali filogenetska drevesa (Slika 9, Slika 10). Nukleotidna zaporedja, določena v naši raziskavi, so priložena v prilogi A. Za seznam glej Tabelo 2. Za uspešno primerjavo le-teh z ostalimi filogenetskimi drevesi, narejenimi na podlagi drugih označevalcev, smo v raziskavo vključili nukleotidna zaporedja pridobljena v zbirki GenBank dne 14.9.2007 naslednjih gliv: *Botryotinia fuckeliana* (XM_001548417), *Candida albicans* (XM_706537), *Chaetomium globosum* (XM_001225412), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (XM_569369), *Debaryomyces hansenii* (XM_461784), *Gibberella zeae* (XM_387523), *Kluyveromyces lactis* (XM_452354), *Lodderomyces elongiosporus* (XM_001525596), *Magnaporthe grisea* (XM_367355), *Pichia guilliermondi* (XM_001485144) in *Pichia stipitis* (XM_001386895).

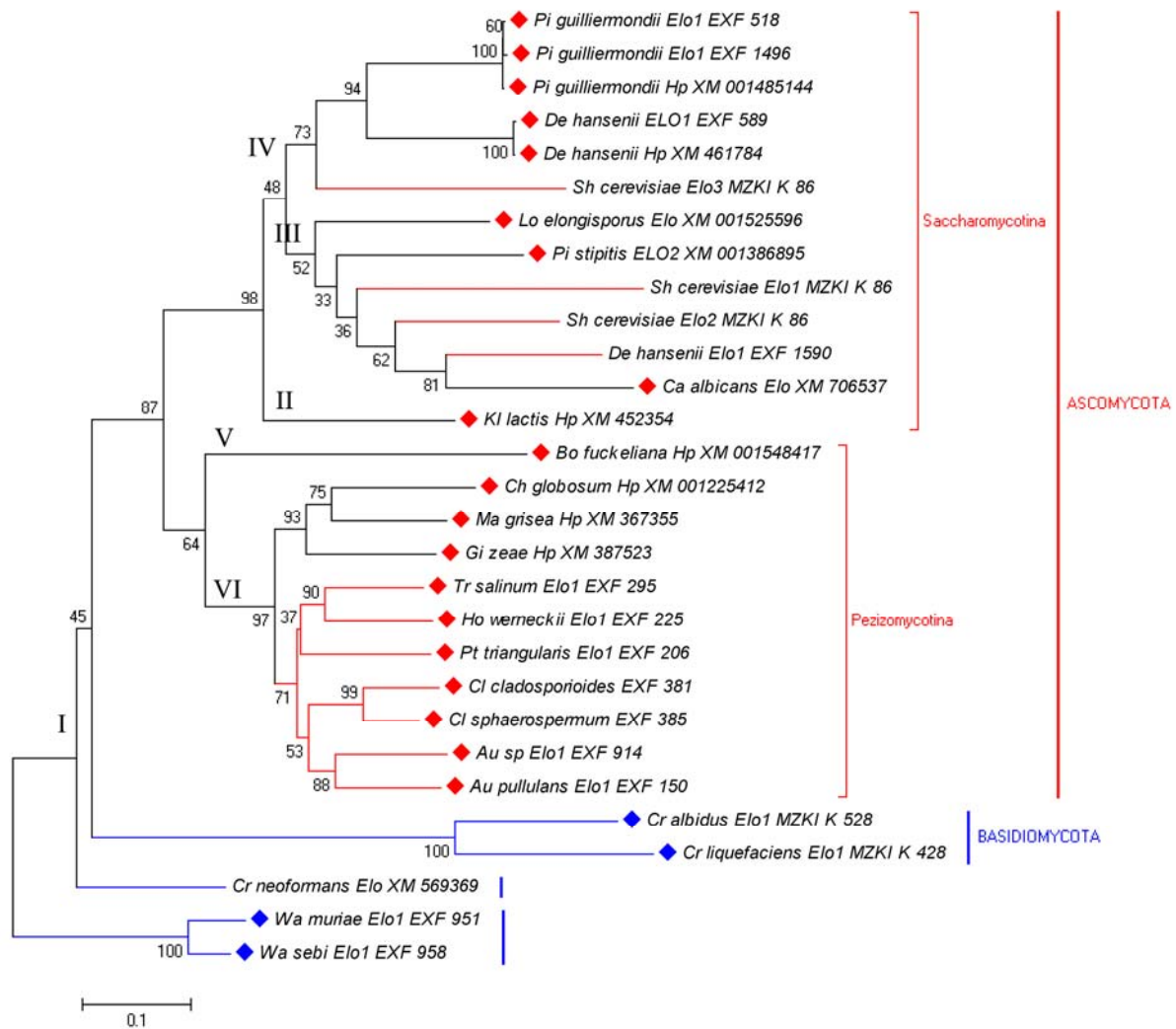
Ureditev nukleotidnih zaporedij v filogenetsko drevo

V drevesih, narejenih s programom MrBayes (Slika 10), kot tudi z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (*»neighbour joining«*) (Slika 9), so se taksoni združili v skupine, ki se skladajo z uveljavljenimi debli *Ascomycota* (s poddebli *Pezizomycotina* in *Saccharomycotina*) in *Basidiomycota* (s poddebli *Agaricomycotina* in *Pucciniomycotina*) ter na ravni razreda *Walemiomycetes*. Drevo smo ukoreninili z zunanjikom, z redom *Wallemiales*, debela *Basidiomycota*.

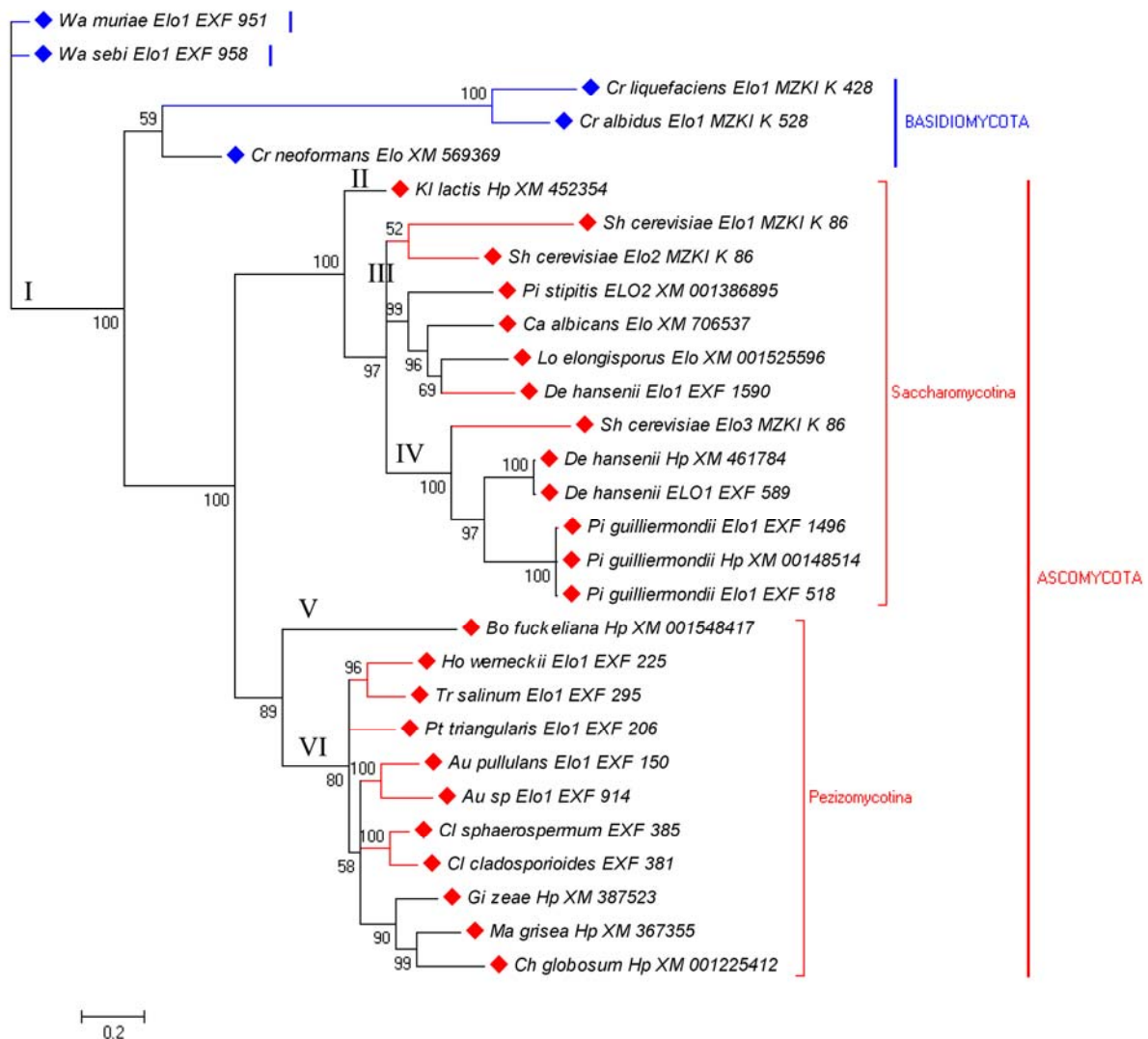
V deblu *Basidiomycota* se vrste združujejo v rodove, ki so dobro podprti. Določitev združevanja na višjih taksonomskih ravni npr. populacij v skupne vrste ni mogoča, saj v našem izboru sevov ni sestrskih skupin.

V poddeblu *Saccharomycotina*, deblo *Ascomycota*, se OTE združujejo na ravni sevov v skupne vrste pri *Pichia* in *Debaryomyces*. Združevanje ostalih vrst v skupni rod ni popolno, saj se vrste razporejajo naključno. Te veje so tudi slabo podprte. Vrsta *S. cerevisiae* ima tri nukleotidna zaporedja genov za elongazo, tri paralogne gene. Ti se ne združujejo v skupno vrsto, poleg tega je podprtost njihove razporeditve slaba. Postavitev seva s paralogom številka 3 (*ELO3*), k sorodnem rodu *Debaryomyces*, je dobro podprto. Ostala parologa se v drevesu nahajata med vejami brez pravega združevanja in sta slabo podprta.

V poddeblu *Pezizomycotina*, deblo *Ascomycota*, se OTE združujejo v dobro podprte družine in rodove. Podprtost in združevanje na taksonomski ravni redu je slabo.



Slika 10: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za elongazo *ELO1* z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (»neighbour joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap«). Kot zunanjika (»outgroup«) smo uporabili rod *Wallemia*. Rimske številke predstavljajo posamezne gručice (Tabela 5). Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z barvno črto so označene glive obravnavane v diplomskem delu.



Slika 11: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za elongazo *ELO1* s programom MrBayes (število generacij 2×10^6). Številke ob razvejitvah predstavljajo verjetnosti grozdov. Kot zunanjik (»outgroup«) smo uporabili rod *Wallemia*. Rimske številke predstavljajo posamezne gruče (Tabela 5). Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z barvno črto so označene glive obravnavane v diplomskem delu.

4.5. GEN ZA Δ^9 -DESATURAZO (*OLE1*)

Iz poravnave delnih nukleotidnih zaporedij genov za desaturazo smo z dvema metodama izračunali filogenetska drevesa (Slika 11, Slika 12). Nukleotidna zaporedja določena v naši raziskavi so priložena v prilogi B. Za seznam glej Tabelo 2. Za uspešno primerjavo le-teh z ostalimi filogenetskimi drevesi, narejenimi na podlagi drugih označevalcev, smo v raziskavo vključili nukleotidna zaporedja pridobljena v zbirki GenBank dne 14.9.2007: *Aspergillus clavatus* (XM_001273427), *Aspergillus fumigatus* (XM_743825), *Aspergillus nidulans* (XM_659243), *Aspergillus niger* (XM_001391245), *Aspergillus terreus* (XM_001215520), *Botryotinia fuckeliana* (XM_001547712), *Candida albicans* (XM_712486), *Candida glabrata* (XM_447271), *Chaetomium globosum* (XM_001224011), *Coccidioides immitis* (XM_001240994), *Cryptococcus curvatus* (Y10421), *Cryptococcus curvatus* (Y10422), *Cryptococcus neoformans* (XM_567496), *Emericella nidulans* (AF510861), *Histoplasma capsulatum* (X85963), *Kluyveromyces thermotolerans* (D83186), *Lentinula edodes* (AB110447), *Lodderomyces elongisporus* (XM_001528022), *Mortierella alpina* (AB015611), *Mortierella alpina* (AB015612), *Mortierella alpina* (AB195980), *Mortierella alpina* (AF085500), *Mortierella alpina* (Y18553), *Mortierella alpina* (Y18554), *Neosartorya fischeri* (XM_001261538), *Neurospora crassa* (XM_956731), *Pichia angusta* (AB024576), *Pichia angusta* (D83185), *Pichia guilliermondii* (XM_001482866), *Pichia stipitis* (XM_001383175), *Saccharomyces kluyveri* (AB071696), *Ustilago maydis* (XM_752009) in *Yarrowia lipolytica* (D83187).

Ureditev nukleotidnih zaporedij v filogenetsko drevo

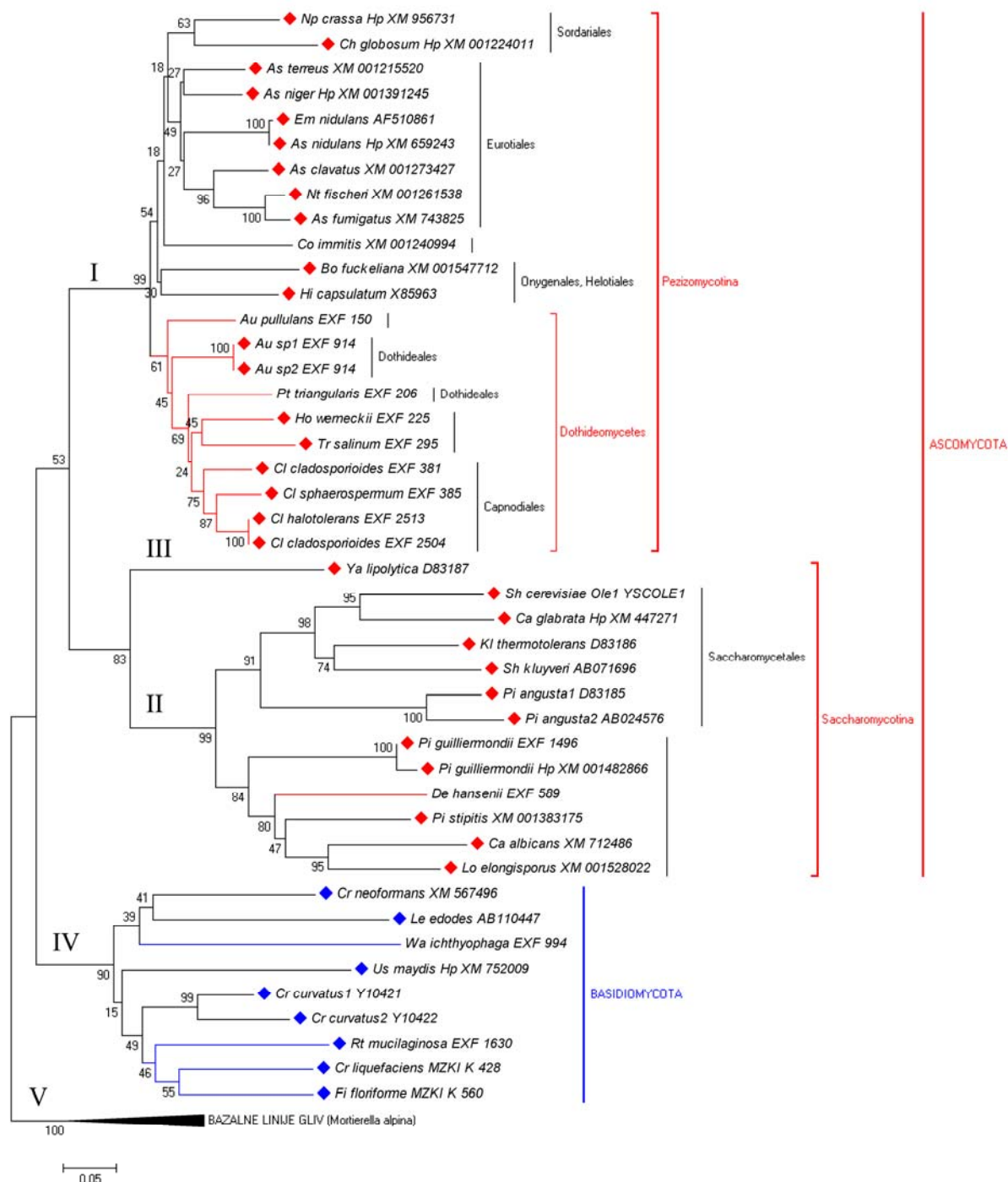
V drevesih narejenih s programom MrBayes (Slika 12), kot tudi distančne metode združevanja najbližjega soseda (*»neighbour joining«*) (Slika 11), so se taksoni združili v skupine, ki se skladajo z uveljavljenimi debli *Ascomycota* (s poddebli *Pezizomycotina* in *Saccharomycotina*), *Basidiomycota* (s poddebli *Agaricomycotina* in *Pucciniomycotina*) ter na ravni razreda *Walemiomycetes*. Z *Mucoromycotina* (bazalne linije gliv) smo drevo ukoreninili.

V deblu *Basidiomycota* se sevi oz. OTE združujejo na ravni sevov v skupne vrste pri *Cryptococcus curvatus*. Ti odnosi so dobro podprti. Na taksonomskih ravni redu pride do delnega združevanja v gruče, ki so slabo podprte. Pri drevesih narejenih s programom MrBayes, je njihova razporeditev neznana, saj se pojavi polifilija.

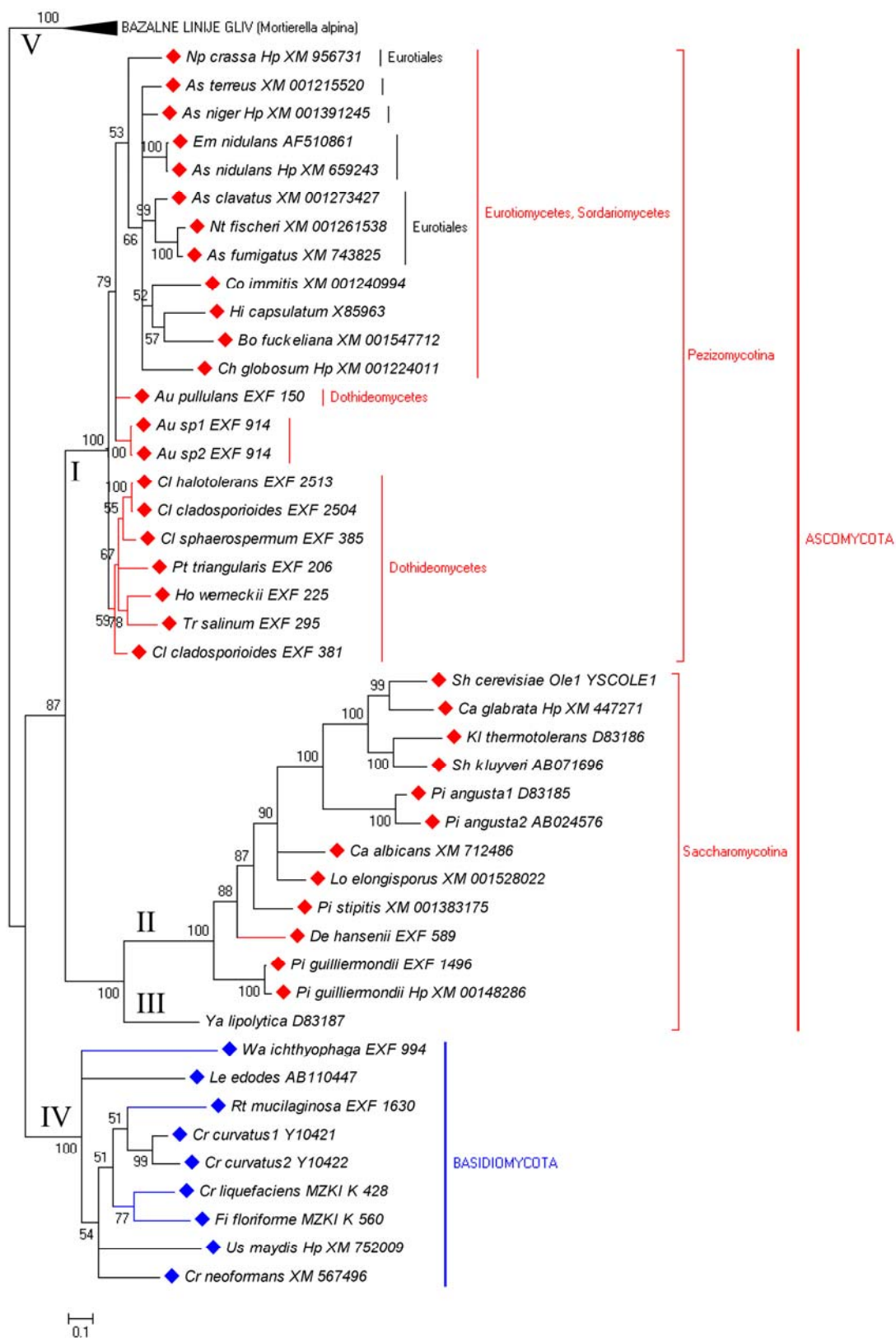
V poddeblu *Saccharomycotina*, debli *Ascomycota*, se nekateri sevi združujejo v skupno vrsto *Pichia angusta* in *Pichia guilliermondii*. Do združevanja ne prihaja na ravni rodov *Saccharomyces* in *Candida* in njihovih družin. Ti odnosi so dobro podprti. Način združevanja v gruče in razporeditev vej v drevesu so pri obeh metodah zelo podobni. Tako se taksoni združujejo v skupni red *Eurotiales*, *Sordariales* in *Saccharomycetales*, vendar so ti odnosi slabo podprti.

V poddeblu *Pezizomycotina* se vrste združujejo v dobro podprte rodove. Ali prihaja do združevanja v skupne družine ni mogoče določiti zaradi prisotnosti le enega predstavnika v družini. Združevanje v skupne redove ni popolno npr. pri redu *Onygeales* in prav tako njihova razdelitev in združevanje v

višjo taksonomsko raven – podrazred. Znotraj posameznih skupin npr. pri redu *Eurotiales*, se pojavljajo združitve vrst na ravni od redu do rodu.



Slika 12: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za desaturazo *OLE1* z distančno metodo združevanja najbližjega soseda (»neighbour joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap«) s številom generacij 10^4 . Kot zunanjika (»outgroup«) smo uporabili *Mortierella alpina* (*Mucoromycotina*). Rimske številke predstavljajo posamezne gruče (Tabela 6). Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z barvno črto so označene glive obravnavane v diplomskem delu.



Slika 13: Filogenetsko drevo, narejeno po analizi nukleotidnih zaporedij gena za elongazo *OLE1* s programom MrBayes (število generacij 2×10^6). Številke ob razvejitvah predstavljajo verjetnosti grozdov. Kot zunanjika (»outgroup«) smo uporabili *Mortierella alpina* (*Mucoromycotina*). Rimske številke predstavljajo posamezne gruče (Tabela 6). Na dnu kladograma je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav. Z barvno črto so označene glive obravnavane v diplomskem delu.

4.6. POVZETEK STATISTIKE DELNIH ZAPOREDIJ IZBRANIH GENOV

Primerjava lastnosti nukleotidnih zaporedij genov, izbranih za filogenetske označevalce, je odkrila več razlik. Izbrani delni nukleotidni zaporedji genov za elongazo (*ELOI*) in desaturazo (*OLEI*) sta za tretjino krajši kot nukleotidni zaporedji za referenčna označevalca velike ribosomske podenote LSU (26S rDNA) in znotrajprepisne vmesniške regije (ITS). Število vrst, ki tvori filogenetska drevesa, se med nukleotidnimi zaporedji razlikuje. Največ smo jih dobili za nukleotidna zaporedja ITS in *OLEI*, najmanj pa za *ELOI*. Nastala filogenetska drevesa so različno podprta, najslabše je *OLEI*, kjer po programu MrBayes količina podprtih vej, po merilu $\geq 95\%$ posterioorne verjetnosti, predstavlja le polovico vseh vej v filogenetskem drevesu. To drži tudi pri metodi združevanja najbližjega soseda (*»neighbour joining«*), po merilu $\geq 50\%$ in $\geq 70\%$. Najbolje podprto drevo pri slednji metodi je drevo regije LSU, kjer predstavlja delež podprtih vej po merilu $\geq 50\%$, 88,2 oz. 73 odstotkov po merilu $\geq 70\%$, tej sledi drevo gena za elongazo in regiji ITS.

Število popolnih mest (brez delecij in insercij v katerem koli nukleotidnem zaporedju) se med označevalci zelo razlikuje. Najmanjše je pri regiji ITS, kjer predstavlja le 188 mest oz. 30 odstotkov celotnega zaporedja. Največje pa je za nukleotidno zaporedje Δ^9 -desaturaze, kjer je skoraj ves odsek popoln. Sledi mu nukleotidno zaporedje za elongazo, z 80 odstotki oz. 380 mesti in regija LSU s 60 odstotki oz. 385 mesti. Število informativnih mest je približno enako za preučevana gena, ki kodirata elongazo in Δ^9 -desaturazo. To število je za polovico večje od števila informativnih mest že preučevanih označevalcev regije ITS in LSU. Oba izbrana gena imata dovolj informativnih mest za pridobivanje smiselnih informacij s filogenetskim drevesom.

Tabela 4: Podatki o uporabljenih filogenetskih označevalcih in podprtost skupin v drevesih izračunanih po metodi združevanja najbližjega soseda in s pomočjo programa MrBayes.

Filogenetski označevalec	LSU	ITS	<i>ELOI</i>	<i>OLEI</i>
Število skupnih mest / nukleotidov	660	607	436	409
Število vrst	38	49	29	50
Število popolnih mest (<i>»complete«</i>)	385 (58%)	188 (31%)	380 (87%)	391 (96%)
Število ohranjenih mest	166 (43%)	99 (53%)	76 (20%)	100 (26%)
Število neinformativnih / variabilnih mest	219 (57%)	89 (47%)	304 (80%)	291 (74%)
Število informativnih mest	188 (28%)	76 (12,5%)	272 (62,4%)	273 (66,8%)
Odstotek taksonov $\geq 70\%$ <i>»bootstrap«</i> (NJ)	73%	54%	66%	58%
Odstotek taksonov $\geq 50\%$ <i>»bootstrap«</i> (NJ)	88,2%	80,5%	80,7%	73,6%
Odstotek taksonov $\geq 95\%$ posterioorne verjetnosti (MrBayes)	67%	76%	68%	50%

4.7. GRUČE SEVOV IZBRANIH FILOGENETSKIH OZNAČEVALCEV

Nukleotidna zaporedja genov za elongazo (*ELO1*) in desaturazo (*OLE1*) so se v filogenetskem drevesu združila v več dobro ločenih gruč. Vsaka je dobro podprta, saj je verjetnost gruč oz. razvejišča visoka. Za te posamezne skupine smo preverili vsebnost informativnih mest in jih primerjali z vsebnostjo informativnih mest celotnega drevesa (vsebuje vsa nukleotidna zaporedja) (Tabela 5, Tabela 6)

Med gruče zaporedja gena za elongazo razvrščamo skupine, ki spadajo v deblo *Basidiomycota* – skupina I, skupina II; *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* (*ELO1*, *ELO2* MZKI 86), skupina III; *Pichia stipitis*, *Candida albicans*, *Lodderomyces elongiosporus*, *Debaryomyces hansenii* (*ELO1* EXF 1590), skupina IV; *Debaryomyces hansenii* (Hp XM 461784, *ELO1* EXF 589), *Pichia guilliermondi* (*ELO1* EXF 1496, *ELO1* EXF 518 in Hp XM 00148514), *Saccharomyces cerevisiae* (*ELO3* MZKI 86), sev *Botryotinia fuckeliana* – skupina V in poddeblo *Pezizomycotina* – skupina VI (Tabela 5).

Tabela 5: Ohranjenost nukleotidnih zaporedij gena za elongazo znotraj posameznih grozdov.

Skupina gena za elongazo	I	II	III	IV	V	VI
Število skupnih mest / nukleotidov	436	436	436	436	436	436
Število sevov v skupini	5	3	4	6	1	10
Število popolnih mest (»complete«)	380 (87,2%)	398 (91,3%)	404 (62,6%)	404 (92,6%)	-	401 (91,9%)
Število ohranjenih mest	150 (39,5%)	219 (55,0%)	220 (54,5%)	241 (59,7%)	-	206 (51,4%)
Število neinformativnih / variabilnih mest	230 (60,5%)	179 (44,9%)	184 (83,6%)	163 (40,3%)	-	195 (48,6%)
Število informativnih mest	126 (28,8%)	-	38 (8,7%)	96 (22,0%)	-	144 (33,0%)

Med gruče zaporedja gena za desaturazo razvrščamo skupine, ki spadajo v poddrevo *Pezizomycotina* – skupina I, poddrevo *Saccharomycotina* – skupina II, sev *Yarrowia lipolytica* – skupina III, drevo *Basidiomycota* – skupina IV in drevo *Mucoromycotina* – skupina V (Tabela 6).

Tabela 6: Ohranjenost nukleotidnih zaporedij gena za desaturazo znotraj posameznih grozdov.

Skupina gena za desaturazo	I	II	III	IV	V
Število skupnih mest / nukleotidov	409	409	409	409	409
Število sevov v skupini	22	12	1	9	6
Število popolnih mest (»complete«)	406 (99,2%)	397 (97,0%)	-	404 (98,7%)	407 (99,5%)
Število ohranjenih mest	223 (55,0%)	166 (41,8%)	-	168 (41,6%)	292 (71,7%)
Število neinformativnih / variabilnih mest	183 (45,0%)	231 (58,1%)	-	236 (58,4%)	115 (28,3%)
Število informativnih mest	145 (35,4%)	204 (49,8%)	-	160 (39,1%)	77 (18,8%)

Nukleotidna zaporedja znotraj posameznih gruč genov za elongazo in desaturazo imajo zelo visok odstotek popolnih mest, tako velik kot zaporedja celotnega filogenetskega drevesa. Število ohranjenih mest je visoko in se za elongazo nahaja v intervalu od 40 do 60 odstotkov (Tabela 5) in za desaturazo v intervalu od 40 do 70 odstotkov (Tabela 6). V številu informativnih mest gena za elongazo, so posamezne gruče podobne gručam referenčnih nukleotidnih zaporedij regije ITS in LSU. Število informativnih mest gena za desaturazo posameznih gruč pa ti regiji presega do enkrat.

4.8. POVZETEK STATISTIKE CELOTNIH ZAPOREDIJ IZBRANIH GENOV

Δ^9 -desaturaza (*OLE1*)

V poravnavo smo iz zbirke GenBank dne 14.9.2007 vključili vsa dostopna celotna nukleotidna zaporedja gena za desaturazo (*OLE1*) različnih gliv. Za umestitev izbranega odseka na referenčno nukleotidno zaporedje glive *Cryptococcus neoformans* smo uporabili pridobljeno nukleotidno zaporedje *Filobasidium floriforme* (FfA II). Odseke nukleotidnih zaporedij, ki so bila daljša od našega nukleotidnega zaporedja, smo pregledali in določili primernost uporabe teh regij za filogenetske študije. To smo določili v programu Phylo_win, s pomočjo ugotavljanja števila informativnih mest. Za nadaljno analizo smo izbrali nukleotidna zaporedja gena za Δ^9 -desaturazo pri glivah *Aspergillus clavatus* (XM_001273427), *Aspergillus fumigatus* (XM_743825), *Aspergillus nidulans* (XM_659243), *Aspergillus niger* (XM_001391245), (AM270290:85315-86644), *Aspergillus terreus* (XM_001215520), *Botryotinia fuckeliana* (XM_001547712), *Candida albicans* (AACQ01000053:135936-137396), (XM_712560), (XM_712486), *Candida glabrata* (XM_447271), *Chaetomium globosum* (XM_001224011), *Coccidioides immitis* (XM_001240994), *Cryptococcus curvatus* (Y10421:221-1888), *Cryptococcus neoformans* (XM_567496), (Y10422:451-1932), *Debaryomyces hansenii* (XM_460535), *Emericella nidulans* (AF510861:611-2030), *Lentinula edodes* (AB110447), *Lodderomyces elongisporus* (XM_001528022), *Mortierella alpina* (AB015611), (Y18553:1472-3321), *Neosartorya fischeri* (XM_001261538), *Neurospora crassa* (XM_956731), *Pichia angusta* (AB024576:1081-2436), *Pichia guilliermondii* (XM_001482866), *Pichia stipitis* (XM_001383175), *Saccharomyces cerevisiae* (NC_001139:398631-400163), (J05676:346-1878), *Saccharomyces kluyveri* (AB071696) in *Ustilago maydis* (XM_752009).

Za merilo poravnave nukleotidnih zaporedij in določitve odsekov smo vzeli nukleotidno zaporedje glive *Cryptococcus neoformans* (XM_567496).

Preučitev celotnega zaporedja gena za desaturazo je pokazala nizko vsebnost informativnih mest. Ta je zanašala le 38 odstotkov, skoraj polovico manj od izbranega delnega zaporedja gena, uporabljenega za izdelavo filogenetskih dreves. Primerjava ostalih odsekov gena je pokazala, da so robni odseki najslabši, z najmanj informacij. Odseka takoj ob izbranem delnem zaporedju imata sorazmerno visok odstotek informativnih mest, vendar pa približno enako oz. manjše število informativnih mest (Tabela

7). Delno nukleotidno zaporedje gena za desaturazo je dobro izbrano in primerno za filogenetske študije.

Tabela 7: Podatki o uporabljenem filogenetskem označevalcu (*OLE1*).

Filogenetski označevalec OLE1	Celotno zaporedje	Delno zap. OLE1	Odsek	Odsek	Odsek	Odsek
Interval (XM_567496)	$0 < x < 2106$	$700 < x < 1160$	$1160 \leq x$	$x \geq 700$	$1160 < x < 1576$	$382 < x < 700$
Število skupnih mest / nukleotidov	2304	473	961	868	429	482
Število vrst	31	31	31	31	31	31
Število popolnih mest (»complete«)	1195	455	417	310	407	310
Število neinformativnih / variabilnih mest	1080	393	383	293	373	293
Število informativnih mest	879	299	326	249	316	249
Odstotek informativnih mest [%]	38,2	63,2	33,9	28,6	73,6	51,6

Elongaza (*ELO1*)

V poravnavo smo iz zbirke GenBank dne 14.9.2007 vključili vsa dostopna celotna nukleotidna zaporedja gena za elongazo (*ELO1*) različnih gliv. Za umestitev izbranega odseka na referenčno nukleotidno zaporedje glive *Candida glabrata* smo uporabili pridobljeno nukleotidno zaporedje *Pichia guilliermondii* (PgA). Odseke nukleotidnih zaporedij, ki so bila daljša od našega nukleotidnega zaporedja, smo pregledali in določili primernost uporabe teh regij za filogenetske študije. To smo določili v programu Phylo_win, s pomočjo ugotavljanja števila informativnih mest. Za nadaljno analizo smo izbrali nukleotidna zaporedja gena za elongazo pri glivah *Pichia guilliermondii* (XM_001485144), *Aspergillus nidulans* (XM_676294), *Debaryomyces hansenii* (XM_461984), *Saccharomyces cerevisiae* (NC_001142), *Pichia angusta* (AB194620), *Candida albicans* (XM_715934), *Candida glabrata* (CR380953), *Kluyveromyces lactis* (CR382122), *Aspergillus clavatus* (XM_001276254) in *Neosartorya fischeri* (XM_001266254).

Za merilo poravnave nukleotidnih zaporedij in določitve odsekov smo vzeli nukleotidno zaporedje glive *Candida glabrata* (CR380953).

Preučitev celotnega zaporedja gena za elongazo je pokazala nizko vsebnost informativnih mest. Ta je zanašala le 57 odstotkov, torej manj od izbranega delnega zaporedja gena, uporabljenega za izdelavo filogenetskih dreves. Primerjava ostalih odsekov gena je pokazala, da so robni odseki najslabši, z najmanj informacij. Odseka takoj ob izbranem delnem zaporedju imata enako velik odstotek informativnih mest, vendar pa v primerjavi z preučevanim delnim zaporedjem gena za elongazo, manjše število informativnih mest (Tabela 8). Tako je najprimernejši del za filogenetske študije gena za elongazo naše izbrano delno zaporedje.

Tabela 8: Podatki o uporabljenem filogenetskem označevalcu (*ELO1*).

Filogenetski označevalec ELO1	Celotno zaporedje	Delno zap. ELO1	Odsek	Odsek	Odsek	Odsek
Interval (CR380953)	$0 < x < 1102$	$228 < x < 638$	$638 \leq x$	$x \geq 366$	$638 < x < 942$	$55 < x < 228$
Število skupnih mest / nukleotidov	1131	420	469	243	309	182
Število vrst	10	10	10	10	10	10
Število popolnih mest (»complete«)	807	386	265	156	265	156
Število neinformativnih / variabilnih mest	736	342	245	149	245	149
Število informativnih mest	644	296	218	130	218	130
Odstotek informativnih mest [%]	56,9	70,5	46,5	53,5	70,5	71,4

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1. RAZPRAVA

Sistematika gliv je zaradi zapletenih strategij razmnoževanja in različnih življenjskih oblik zelo kompleksna in še vedno v precejšnji meri nedorečena. Danes se v taksonomiji za reševanje filogenetskih odnosov v večji meri uporablja molekularne tehnike (Guarro in sod., 1999). Te temeljijo na bioloških analizah nukleotidnih zaporedij. Prevladujejo metode, ki temeljijo na tehnikah verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Vaughan-Martini, 2003).

V zadnjem času je poudarek na iskanju nukleotidnih zaporedij genov proteinov, primernih za študij filogenetskih odnosov gliv (Moriera in sod., 1999). Pri preučevanju se je pokazala različna uporabnost le-teh za različne taksonomske ravni (Budin in Philippe, 1998).

Gena za encim elongazo in desaturazo sta razširjena v različnih kraljestvih, saj sodelujeta pri modifikaciji maščobnih kislin in s tem opravljata pomembno funkcijo ohranjanja primerne fluidnosti membran. Ohranjanje le-te je ključnega pomena za delovanje membran, na ravni črpanja ionov, privzemanje hranil in respiracije (Berry in Foegeding, 1997). Delovanje desaturaz in elongaz omogoča prilagajanje membran oz. maščobnih kislin na spreminjajoča se okolja, kot so okolja z izjemno nizkimi temperaturami ali visokimi koncentracijami soli.

V raziskavi smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za dele genov za encima Δ^9 -desaturazo in elongazo. Po določitvi njunega delnega nukleotidnega zaporedja pri izbranih glivah smo za primerljivost in večjo natančnost dreves dodali tudi nukleotidna zaporedja izbranih genov drugih vrst, ki so bila že dostopna v podatkovni zbirki GenBank. Ustreznost izbranih regij za filogenetske študije smo ocenili s primerjavo z že uveljavljenima označevalcema ITS in LSU.

5.1.1. Poravnava nukleotidnih zaporedij in variabilnost

Za učinkovito pridobivanje informacij o filogenetskih odnosih je potrebno zadostno število filogenetsko informativnih mest in tudi več združenih setov podatkov – genov, kar zmanjšuje vpliv šuma (Wiens 2003). Pomembna je tudi zadostna variacija zaporedij med izbranimi taksoni. Količina le-te mora biti dovolj nizka in razširjena tako, da so multiple spremembe na istem mestu redke. Za študij odnosov vrst z velikimi filogenetskimi razdaljami in tistih z glavnimi taksoni, je najbolj primerna uporaba genov s počasno in enakomerno evolucijo (Liu in sod., 2006).

Pri večanju števila nukleotidov v poravnavi in hkratne uporabe večih genov, se poveča ločljivost drevesa in podpora vej (Tang in sod. 2007).

Pri poravnavi izbranih zaporedij smo ugotovili, da sta referenčni zaporedji velike ribosomske podenote (LSU) in znotrajprepisne vmesniške regije (ITS) za tretjino daljši od delnih nukleotidnih zaporedij genov za elongazo (*ELO1*) in Δ^9 -desaturazo (*OLE1*), vendar pa imata izbrana gena za elongazo in desaturazo dva- do tri- krat večje število informativnih mest, kot referenčna nukleotidna zaporedja (Tabela 4).

Po pričakovanjih naj bi bilo v izbranih delnih zaporedjih genov za proteine podobno razmerje med informativnimi mesti in dolžino nukleotidnega zaporedja. Tako naj bi bilo v izbranih genih za elongazo in Δ^9 -desaturazo manj informativnih mest, ki določajo kvaliteto filogenetskega signala. Drugačen rezultat razlagamo z višjim odstotkom variabilnih mest gena za elongazo in Δ^9 -desaturazo, ki je skoraj enkrat večji kot pri referenčnih zaporedjih regij ITS in LSU. Ta posledično vpliva na pojav večjega odstotka informativnih mest (enkrat večji). Razliko v vsebnosti variabilnih mest razlagam z velikim številom popolnih mest v poravnavi genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo. Da je nukleotidno zaporedje primeren filogenetski označevalec mora biti tudi dovolj ohranjeno (Liu in sod., 2006). To velja za oba preučevana filogenetska označevalca *ELO1* in *OLE1*. Tako ima zaporedje velike ribosomske podenote LSU, ki je primerno za preučevanje bazalnih taksonov (Hwang in Kim, 1999), največ ohranjenih mest; 166 (Tabela 4). Znotrajprepisna vmesniška regija (ITS), primerna za študij apikalnih taksonov (Hwang in Kim, 1999), ima za tretjino manj ohranjenih mest; 99 (Tabela 4). Preučevana filogenetska označevalca genov za elongazo in desaturazo sta podobno ohranjena kot znotrajprepisna vmesniška regija (ITS), saj ima gen za elongazo (*ELO1*) 76 in gen desaturazo (*OLE1*) 100 ohranjenih mest (Tabela 4).

5.1.2. Pregled združevanja nukleotidnih zaporedij izbranih filogenetskih označevalcev

Splošna primerjava nukleotidnih zaporedij je pokazala, da se nukleotidna zaporedja genov za Δ^9 -desaturazo in elongazo združujejo v več dobro ločenih gruč, med katerimi je vsaka dobro podprta.

Ugotovili smo, da je znotraj posameznih gruč nukleotidnih zaporedij genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo, vsebnost informativnih mest podobna oz. višja kot v referenčnih nukleotidnih zaporedjih velike ribosomske podenote LSU (26S rDNA) in znotrajprepisne vmesniške regije (ITS). To drži tudi za vsebnost variabilnih mest. Ugotovili smo tudi, da je odstotek ohranjenih mest znotraj posameznih gruč nukleotidnih zaporedij genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo med seboj podoben. Vsebnost le-teh je narasla na velikost pri referenčnih zaporedjih regije ITS in LSU, torej z 20 odstotkov na 40 do 60 odstotkov pri genu za elongazo in s 26 odstotkov na 40 do 70 odstotkov gena za Δ^9 -desaturazo.

Izbrani filogenetski označevalci imajo dovolj filogenetskega signala in so primerno ohranjeni za ureditev primerne filogenetskega drevesa. Razlike med gručami in celotnim filogenetskim drevesom kažejo na neprimernost filogenetskih označevalcev genov za Δ^9 -desaturazo in elongazo za reševanje filogenetskih odnosov na ravni bazalnih taksonomskih ravni oz. vrst z velikimi filogenetskimi razdaljami, med katere štejemo kraljestva, debla in poddebla.

Možni odgovor na grupiranje nukleotidnih zaporedij izbranih filogenetskih označevalcev v različne skupine in posledično neujemanja razporeditve vrst v filogenetskem drevesu, kot sta npr. *Botryotinia*

fuckeliana in *Yarrowia lipolytica*, bi lahko bila hitra variacija mest nukleotidov med taksoni (Kuhner and Felsenstein, 1994). Te povzročajo učinek privlačnosti dolgih vej (»long branch attraction«) (Baldauf, 2003). Vendar pa po Felsenstein-u (1988) in Li-ju (1997) naj bi izbira primernih metod, modelov in parametrov omogočila postavitve pravilnega filogenetskega drevesa. Metodi, učinkoviti pri teh razlikah, naj bi bili metoda sosedskega odnosa in metoda največje verjetnosti (»maximum likelihood«) (Baldauf, 2003). Mogoč vzrok za artefakt bi lahko bile tudi napake v bazi podatkov, kot je npr. napačno ime ali slabo določeno nukleotidno zaporedje.

5.1.3. Določitev primernosti celotnih zaporedij genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo

Nukleotidna zaporedja, primerna za filogenetske študije, morajo biti primerno ohranjena, a tudi dovolj variabilna za specifično ločevanje izbranih OTE (Liu in sod., 2006).

Kot prvi smo določili delno zaporedje genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo kserofilnih in halofilnih gliv (Tabela 2). Celotnih znanih nukleotidnih zaporedij genov, predvsem elongaznih, je v podatkovnih zbirkah malo. Prav tako ni bilo narejene raziskave, ki bi določila primeren odsek teh genov za študij filogenetskih odnosov. Zato smo pregledali celotno zaporedje genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo.

Za določitev primernega odseka za študij filogenetskih odnosov smo razvili preprosto metodo, pri kateri smo se opirali na število informativnih mest na dolžino zaporedja. Tako smo po poravnavi celotnih nukleotidnih zaporedij izbranih sevov preverili vsebnost informativnih mest v posameznih odsekih in s pomočjo vsebnosti informativnih mest iskali najprimernejše odseke za določitev filogenetskih odnosov.

Ugotovili smo, da sta obe že prej izbrani delni nukleotidni zaporedji znotraj genov (Gostinčar 2004, 2007) primerni za ugotavljanje filogenetskih odnosov, saj imata veliko vsebnost informativnih mest glede na dolžino odseka. Odseka, ki bi bil bolj primeren od že prej izbranih delnih nukleotidnih zaporedij nismo našli.

5.1.4. Določitev taksonomskega ravni občutljivosti filogenetskega označevalca

V vseh filogenetskih drevesih, se OTE (operacijske taksonomske enote) združujejo na taksonomski ravni debel in poddebel, pri drevesih ribosomske podenote LSU (26S rDNA) in znotrajprepisne vmesniške regije (ITS) tudi na ravni razreda. Na teh bazalnih filogenetskih ravneh prihaja zaradi širokega nabora vrst, ki so filogenetsko bolj oddaljene, do ločevanja. Do ločevanja po gručah pride zaradi večjega razlikovanja v nukleotidnem zaporedju.

Druge ravni, na katerem so se OTE združevale v pričakovane skupine je tista raven, za katero je izbrani filogenetski označevalec občutljiv. Na tej taksonomski ravni so se OTE specifično ločevale. Za merilo občutljivosti oz. določitev taksonomske ravni izbranih označevalcev smo izbrali že znane označevalce. To sta velika ribosomska podenota in znotrajprepisna vmesniška regija. Velika ribosomska podenota LSU (26S rDNA) je dobro ohranjen filogenetski označevalec in kot tak uporaben za oris srednjih taksonomskih ravni, kot so razredi, redovi in družine. V nasprotju z njim so znotrajprepisne vmesniške regije (ITS) zaradi manjšega selekcijskega pritiska zelo variabilne in se jih uporablja za ločevanje OTE znotraj rodu. Geni, ki kodirajo proteine, naj bi imeli različen razpon uporabe, ki naj bi segal od reda pa vse do populacije (Hwang in Kim, 1999), zato smo predvidevali, da bosta regiji občutljivosti filogenetskih označevalcev na taksonomski ravni med obema referenčnima regijama.

Interpretacija filogenetskih dreves je dokaj subjektivna metoda iskanja filogenetskih odnosov, saj je podvržena presoji raziskovalca. Poleg povzemanja napačnih zaključkov iz filogenetskih dreves zaradi človeškega dejavnika, do tega lahko pride tudi zaradi slabe kvalitete drevesa. To so drevesa, ki nimajo koristnih filogenetskih informacij ali so celo zavajajoča, saj je kvaliteta odvisna od poravnave nukleotidnih zaporedij. V teh morajo biti popolna mesta, izključeni pa naj bodo tudi nezanesljivo poravnani odseki (Baldauf, 2003). Za nastanek čim bolj natančnih in zanesljivih dreves je pomembno tudi število in način izbire OTE ter vrst filogenetskih označevalcev. Nejasne filogenetske odnose reši tudi hkratna uporaba večih filogenetskih označevalcev z različno občutljivostjo za taksonomske ravni (Tang in sod., 2007).

Izbira metode, s katero analiziramo podatke, prav tako vpliva na sestavo filogenetskega drevesa. Distančna metoda združevanja najbližjega soseda (*»neighbour joining«*) je direktna in relativno preprosta, saj vsebuje malo informacij, kot je razporeditev OTE (Baldauf, 2003). Uporablja se za prvi in splošen pregled filogenetskih odnosov (Hills in sod., 1996). Drevesa, narejena po diskretni metodi s programom MrBayes, so bogata z informacijami. Tu lahko sledimo evoluciji gena oz. specifičnih regij v genomu (Baldauf, 2003). Za preučitev izbranih filogenetskih označevalcev smo uporabili dve zelo različni metodi in tako zajeli celoten razpon možnih razporeditev OTE.

5.1.4.1. Velika ribosomska podenota (LSU)

Z uporabo označevalca LSU (26S rDNA) so se OTE združile v pričakovane skupine na taksonomski ravni redov in razredov (Hwang in Kim, 1999). Raven združevanja se je med drevesi *Ascomycota* in *Basidiomycota* razlikovala zaradi različne izbire OTE. Odsotnost sestrskih taksonov je onemogočila ugotovitev ali se sevi združujejo tudi v višje taksone. Tak primer predstavljata redova *Wallemiales* in *Sporidiobolales*, za katera ne moremo določiti ali jima ta filogenetski označevalec omogoča združevanje v višjo filogenetsko raven (razred), saj sta brez sestrskega rodu.

Zaradi podobne izbire OTE pri izdelavi filogenetskih dreves preučevanih nukleotidnih zaporedij predvidevamo, da ne bo mogoče določiti celotnega razpona taksonomskih ravni primernosti označevalcev Δ^9 -desaturaze in elongaze za filogenetske odnose.

Združevanje OTE po gručah na taksonomski ravni redov in razredov, za katera je ta označevalec primeren (Hwang in Kim, 1999), je za obe metodi enaka. Razlike znotraj omenjenih gruč se pojavljajo le v razporeditvi sestrskih taksonov.

5.1.4.2. Znotrajprepisna vmesniška regija (ITS)

Z uporabo označevalca ITS so se OTE združile v pričakovane skupine na taksonomski ravni rodov in vrst (Hwang in Kim, 1999). Artefakt v drevesu predstavlja *Yarrowia lipolytica*, ki se proti pričakovanjem nahaja zunaj redu *Saccharomycetales*. Označevalec je neprimeren za ločevanje filogenetsko bolj oddaljenih vrst.

Združevanje OTE po gručah na taksonomski ravni rodu in vrst, za katera je ta označevalec primeren (Hwang in Kim, 1999), je za obe metodi enaka.

5.1.4.3. Gen za elongazo (*ELO1*)

Z uporabo gena za elongazo kot označevalca so se OTE združile v pričakovane skupine na taksonomski ravni rodov in vrst (Hwang in Kim, 1999). V poddrevesu *Pezizomycotina* pa tudi na ravni družine. Veje teh taksonomskih ravni so dobro podprte pri obeh metodah (Slika 9, Slika 10). Raven združevanja se je med debli *Ascomycota* in *Basidiomycota* razlikovala zaradi načina izbire OTE. Odsotnost dodatnih OTE je onemogočilo ugotovitev ali se znotraj debla *Basidiomycota* združujejo OTE tudi na ravni vrst. Prav tako je tu nemogoče ugotoviti združevanje na ravni družin. Glede na to, da v poddrevesu *Saccharomycotina* OTE niso združene v skupne družine, torej *Saccharomycetaceae* in mitosporne *Saccharomycetaceae* sklepamo, da označevalec za širši obseg filogenetsko bolj oddaljenih vrst ni občutljiv za taksonomsko raven družine. Združevanje OTE po gručah na taksonomski ravni rodu in vrst je za obe metodi enaka. Razlike znotraj omenjenih gruč se pojavljajo le v razporeditvi sestrskih taksonov.

V primerjavo filogenetskih odnosov smo vključili tudi vrsto *S. cerevisiae*, pri kateri so znani trije paralogni geni za elongazo. Ti se ne združujejo v ločeno gručo, vendar je tudi podprtost skupin, kamor se uvrščajo posamezni izogeni slaba. Gen *ELO3* se je uvrstil v isto gručo kot geni iz predstavnikov rodov *Debaryomyces* in *Pichia* in sicer v dobro podprto skupino, kljub večji sorodnosti rodov *Kluyveromyces* in *Saccharomyces* (Diezman in sod. 2004). Gena *ELO1* in *ELO2* sta sicer v isti gruči kot *Kluyveromyces*, a se ne združujeta skupaj z le-tem in odnosi tudi niso dobro podprti. Glede na to, da je ta filogenetski označevalec občutljiv za raven vrst, paralogi pa so kopije istega gena, bi se ti morali združiti v skupno gručo. Odstopanje razlagamo z nastankom paralogov zgodaj v evoluciji.

Zaradi sorazmerno majhnega števila OTE v filogenetskem drevesu ne moremo zaključiti, kateri od paralogov bi se združil v gručo po pričakovanju. To bi bil izvorni gen in bi predstavljal pravi sorodstveni odnos do ostalih vrst gliv. Prav tako ni znano ali imajo ostale vrste gliv paralogne gene. V

tem primeru bi morali v filogenetsko drevo vključiti vse obstoječe paraloge, da bi določili pravilni potek razvoja paralognih genov in filogenetskih odnosov (Baldauf, 2003). Prisotnost treh paralognih genov v vrsti *S. cerevisiae* nam pove le filogenetski čas odcepitve prednika. Ta se je zgodil zgodaj v evoluciji *Saccharomyces*, s pomnožitvijo gena.

Filogenetski označevalec za elongazo je na splošno primeren za določanje odnosov OTE na ravni vrst in rodov. Na bazalnih taksonomskih ravneh kot so debla, poddebla in v primeru poddebla *Saccharomycotina* tudi na višjih taksonomskih ravneh, različnost skupin nukleotidnih zaporedij onemogoča uporabo gena za elongazo kot primerne filogenetskega označevalca. Različnost se pojavlja zaradi manjšega števila ohranjenih mest, podobno kot pri regiji ITS.

Za določitev ali je izbrani filogenetski označevalec v deblu *Basidiomycota* občutljiv tudi za najvišje taksonomske ravni, kot je vrsta, bi bilo potrebno v vzorec vključiti več OTE (sevov), ki predstavljajo sestrške OTE (seve) znotraj izbrane skupine. Za taksone z manjšo medsebojno oddaljenostjo (in manjšo razliko) je potreben za popolno ločitev vrst oz. taksonov vzorec z večjim številom OTE (Kalinovski in sod., 2005).

Na podlagi občutljivosti filogenetskega označevalca zaključujemo, da je gen za elongazo podvržen hitri evoluciji. Dobra podpora združevanja OTE izolirane iz različnih okolij nakazuje, da ni vpliva adaptacije oz. homoplazije na izbrani gen, ter da je primeren kandidat za filogenetske študije.

5.1.4.4. Gen za Δ^9 -desaturazo (*OLE1*)

Z uporabo gena za Δ^9 -desaturazo kot označevalca so se OTE združile v pričakovane skupine na taksonomski ravni vrst (Hwang in Kim, 1999). Te so bile v obeh drevesih dobro podprte, prav tako tudi rodovi, kjer so se pojavljali (Slika 11, Slika 12). Razlike znotraj omenjenih gruče se pojavljajo le v razporeditvi sestrskih taksonov. V skupni rod so se združile le vrste rodov *Aspergillus*, *Aureobasidium* in *Cladosporidium*, ostale vrste rodov, to so *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus* in *Saccharomyces*, pa ne. Do združevanja na ravni družine ni prišlo. Na višjih taksonomskih ravneh je prišlo do združevanja skupin v gruče že zaradi prevelike filogenetske razdalje. V skupni red se združuje le nekaj družin, katerih veje so slabo podprte. To so rodovi *Eurotiales*, *Sordariales* in *Saccharomycetales*.

Določitev taksonomske ravni filogenetskega označevalca gena za Δ^9 -desaturazo zaključujemo z ugotovitvijo, da je ta označevalec primeren za taksonomsko raven vrste, saj so ti odnosi v primerjavi z redom dobro podprti. Ali je ta filogenetski označevalec primeren za višje taksonomske ravni do redu je vprašljivo. Združevanje na ravni družin je možno le v družini *Trichocomaceae* in *Saccharomycetaceae*, in predstavlja le majhen delež. Na rezultat tako lahko upliva šum (Wiens 2003), zato je nezanesljivo trditi, da je ta taksonomska raven del občutljivostnega polja filogenetskega označevalca. V poddrevesu *Pezizomycotina* prihaja tudi do dobro podprtega združevanja na ravni rodu. Tako lahko sklepamo, da bi bil lahko za to poddeblo filogenetski označevalec gena za Δ^9 -desaturazo primeren tudi za taksonomsko raven od vrste do družine. Za podprtje te hipoteze bi za sestavo filogenetskega drevesa morali vključiti več OTE, ki bi se nahajale v sestrskih rodovih tega poddrevesa.

Na podlagi občutljivosti filogenetskega označevalca zaključujemo, da je gen za Δ^9 -desaturazo podvržen hitri evoluciji. Dobra podpora združevanja OTE izolirane iz različnih okolij nakazuje, da ni vpliva adaptacije oz. homoplazije na izbrani gen, ter da je primeren kandidat za filogenetske študije.

5.2. SKLEPI

Izbrana filogenetska označevalca, gena za elongazo in Δ^9 -desaturazo, imata dovolj filogenetskega signala za ureditev primerne filogenetskega drevesa. Sta dovolj ohranjena, pa tudi dovolj variabilna za specifično ločevanje OTE (organizacijska taksonomska enota).

Na bazalnih filogenetskih ravneh kraljestva, debla in poddebla, prihaja zaradi širokega nabora vrst, ki so filogenetsko bolj oddaljene, do ločevanja zaporedij na skupine (gruča). Do ločevanja po gručah prihaja zaradi večjega razlikovanja v nukleotidnem zaporedju izbranih filogenetskih označevalcev genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo, saj sta bolj primerna za ločevanje apikalnih taksonomskih ravni.

Filogenetski označevalec za elongazo je na splošno primeren za določanje odnosov izbranih sevov na ravni vrst in rodov. Odsotnost dodatnih OTE je onemogočilo ugotovitev ali se znotraj debla *Basidiomycota* združujejo OTE tudi na ravni vrst. Združevanje OTE po gručah na taksonomski ravni rodu in vrst, je za metodi združevanje najbližjega soseda in MrBayes enaka. Elongaza je podvržena hitri evoluciji.

Filogenetski označevalec za Δ^9 -desaturazo je na splošno primeren za določanje odnosov izbranih sevov na ravni vrst. V poddrevesu *Pezizomycotina* prihaja tudi do dobro podprtega združevanja na ravni rodu. Za podprtje te hipoteze bi za sestavo filogenetskega drevesa morali vključiti več OTE, ki bi se nahajale v sestrskih rodovih tega poddrevesa. Δ^9 -desaturaza je podvržena hitri evoluciji.

6. POVZETEK

Sistematika gliv je zaradi zapletenih strategij razmnoževanja in različnih življenjskih oblik zelo kompleksna in v precejšnji meri nedorečena. Veliko taksonomije še vedno sloni na tradicionalnih morfoloških in biokemijskih metodah, ki so zamudne, težavne in dajo variabilne rezultate. Z večjimi novimi sistematičnimi projekti klasifikacije gliv in postavljanjem temeljev molekularne identifikacije, na pomenu hitro pridobivajo tudi sodobni pristopi, kot so povsod uporabne molekularne tehnike.

Z uporabo novih molekularno bioloških tehnik je bil sistem klasifikacije gliv precej prenovljen. V ospredje so prišle metode, temelječe na tehnikah verižne reakcije s polimerazo (PCR). Prvi molekularni označevalci uporabljeni, v ta namen so bili nukleotidno zaporedje rDNA male in velike ribosomske podenote, vključno z notranjimi prepisanimi vmesniki (ITS). Tu so se pojavile prve omejitve, saj regije, ki so določile in razjasnile sorodnost med določenimi taksoni, niso bile uporabne pri določanju sorodnosti med drugimi taksoni. Ena od pomembnih ugotovitev je, da je za popolno določitev taksonomskih odnosov potrebna kombinacija večih označevalcev, zato so začeli iskati in ugotavljati uporabnost še drugih lokusov, kot so nukleotidna zaporedja genov za RNA-polimeraze, elongacijski faktor 1α in geni za različne strukturne proteine (aktin, β -tubulin).

Gena za encima elongazo in desaturazo sodelujeta pri pomembni funkciji ohranjanja primerne fluidnosti membran, ki je ključnega pomena za pravilno delovanje membran. Pričujoče delo je poskušalo ugotoviti razširjenost in določiti uporabnost teh genov za filogenetske študije. S pomočjo začetnih oligonukleotidov smo z verižno reakcijo s polimerazo določili delno nukleotidno zaporedje genov za Δ^9 -desaturazo in elongazo pri izbranih glivah. Na tej osnovi smo izdelali filogenetska drevesa in jih primerjali med seboj in z drevesi, izdelanimi na podlagi regij ITS in 26S rDNA (LSU). Določili smo tudi ohranjenost in vsebnost informacij nukleotidnih zaporedij za rekonstrukcijo filogenije izbranih gliv. To smo ugotovili s pomočjo ohranjenih in informativnih mest.

Ugotovili smo, da sta izbrana gena za Δ^9 -desaturazo in elongazo razširjena v vseh izbranih glivah iz različnih kraljestev, kot smo predvidevali. Skupaj z določitvijo ohranjenosti izbranih nukleotidnih zaporedij in količine informativnih mest smo ugotovili, da sta izbrana filogenetska označevalca primerna za rekonstrukcijo filogenije izbranih gliv, saj sta primerno ohranjena, pa tudi dovolj variabilna za ločevanje gliv. Pri določanju območja uporabe filogenetskega označevalca smo ugotovili, da je le-ta za elongazo na splošno primeren za določanje odnosov izbranih sevov na apikalni taksonomski ravni, na ravni vrst in rodov, filogenetski označevalec za Δ^9 -desaturazo pa le na ravni vrst. Sevi se združujejo v gruče najverjetneje zaradi večjega razlikovanja v nukleotidnem zaporedju izbranih filogenetskih označevalcev genov za elongazo in Δ^9 -desaturazo, saj sta primerna za ločevanje apikalnih taksonomskih ravni. Paralogi gena za elongazo se niso združili v skupno gručo, ker so se pojavili najverjetneje zgodaj v evoluciji *Saccharomycetes*, s pomnožitvijo gena.

7. VIRI

- Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. 1997. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402.
- Alfaro M.E., Zoeller S., Lutzoni F. 2003. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Mol. Biol. Evol.*, 20:255-266.
- Baldauf S. L., Palmer J. D., Doolittle W. F. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7749–7754.
- Baldauf S. L., Doolittle W. F. 1997. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12007–12012.
- Baldauf S. L. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6):345-351.
- Berry E. D., Foedgeding P. M. 1997. Cold Temperature Adaptation and Growth of Microorganisms. *Journal of Food Protection*, 60(12):1583-1594.
- Biswas K. S., Yokoyama K., Nishimura K., Miyaji M. 2001. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:1191-1199.
- Breuer U., Harms H. 2006. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23:415-437.
- Buchalo A. S., Nevo E., Wasser S. P., Oren A., Molitoris H. P. 1998. Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *Proc. R. Soc. London B.*, 265:1461–1465.
- Budin K., Philippe H. 1998. New insights into the Phylogeny of Eukaryotes Based on Ciliate Hsp70 Sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 15(8):943-956.
- Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2005b. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett*, 244:229-234.
- Butinar L., Sonjak S., Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005c. Population dynamics of melanized halophilic fungi in solar salterns. *Botanica Marina*, in press.
- Butinar L., Spencer-Martins I., Gunde-Cimerman N. 2007. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91:277-289.
- Cummings M. P., Otto S. P., Wakeley J. 1995. Sampling properties of DNA Sequence Data in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.*, 12(5):814-822.
- Daniel H. M., Sorrell T. C., Meyer W. 2001. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:1593-1606.
- de Hoog S., Zalar P., van den Ende B. G., Gunde-Cimerman N. 2005. Relation of Halotolerance to Human-Pathogenicity in the Fungal Tree of Life: An Overview of Ecology and Evolution under Stress. *Adaptation to life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. V: Cellular Origin and Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. UR: Springer Netherlands, 9:371-395.
- de Hoog, G. S., Gerrits van den Ende A. H. G.. 1992. Nutritional pattern and eco-physiology of *Hortaea werneckii*, agent of human tinea nigra. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 62:321–329.
- Deak T., Beuchat L. R. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, CRC Press, USA.

- Diezmann S., Cox C. J., Schonian G., Vilgalys R. J., Mitchell T. G. 2004. Phylogeny and Evolution of Medical Species of *Candida* and Related Taxa: a Multigenic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12):5624-5635.
- Felsenstein J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.*, 22:521-565.
- Fernandez-Espinar M. T., Esteve-Zarzoso B., Querol A., Barrio E. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and differentiation of Flor yeasts. *Ant. v. Leeuwenhoek*, 78:87-97.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. 1996 SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, 12:543-548.
- Geleta M., Bryngelsson T., Bekeke E., Dagne K. 2007. AFLP and RAPD analysis of genetic diversity of wild and/or weedy *Guizotia* (Asteraceae) from Ethiopia. *Hereditas*, 144:53-62.
- Gostinčar C. 2004. Vpliv slanosti na transkripcijo genov za desaturazi in elongazo pri kvasovki *H. werneckii*. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Odd. za biologijo.
- Gostinčar C. 2007. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo (osebni vir, 2007).
- Graur D., Li W.-H. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Guarro J., Gene J., Stchigel A.M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3):454-500.
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns—natural habitats for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32, 235–240.
- Gunde-Cimerman N., Sonjak S., Zalar P., Frisvald J. C., Diderichsen B., Plemenitaš A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28:1273-1278.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98. *Nucleic Acids Symp Ser.*
- Hall B. G. 2001. *Phylogenetic Trees Made easy*, Sinauer associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.*, 95: 641-655.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimator revisited. *Mycological Research*, 105:1422-1432.
- Hayashi K. 1991. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. *PCR Methods and Applications*, 1:34-38.
- Hazel J. R. in Williams E. E. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physiological environment. *Progr. Lipid Res.*, 29:167-227.
- Hibbett D. S. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5):509-547.
- Hillis D. M., Moritz C., Mable B. K. 1996. Applications of molecular systematics. Pp.515-543. v *Molecular Systematics*, D. M. Hillis, C. Moritz, B. K. Mable(eds.) Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8): 754-755.
- Hwang U.-W., Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37(4):215-228.

- Kalinowski S. T. 2005. Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity*, 94:33-36.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16:111–120.
- Kogej T., Ramos J., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. The halophilic Fungus *Hortaea werneckii* and the Halotolerant Fungus *Aureobasidium pullulans* Maintain Low Intracellular Cation Concentrations in Hypersaline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11):6600-6605.
- Kuhner M. K., Felsenstein J. 1994. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.*, 11:459-468.
- Kurtzman C. P., Robnett C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Ant. v. Leeuwenhoek*, 73: 331-371.
- Li W.-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Liu Y. J., Hall B. D. 2004. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:4507-4512.
- Liu Y. J., Hodson M. C., Hall B. D. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology*, 6:74.
- Los D. A., Murata N. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1394:3-15.
- Martin C. E., Oh C.-S., Yang Y.. 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771:271-285.
- Michael R. T., Daniel J. R. 1999. Partial beta-Tubulin Gene Sequences for Evolutionary Studies in the Basidiomycotina. *Mycologia*, 91(3):468-474.
- Moreira D., Le Guyander H., Philippe H. 1999. Unusually High Evolutionary Rate of the Elongation Factor 1 α Genes from the Ciliophora and Its Impact on the Phylogeny of Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 16(2):234-245.
- Nakamura M. T., Nara T. Y. 2004. "Structure, function and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$ and $\Delta 9$ desaturases". *Annual Review of Nutrition*, 24:345-76.
- Oh C.-S., Toke D. A., Mandala S., Martin C. E. 1997. ELO2 and Elo3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.*, 272:17376-17384.
- Pitt, J. I. 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia*, 65:1135–1157.
- Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii* to high environmental salinity. V :Ginde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš (eds) *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 455-470.
- Rozman D., Jezernik K., Komel R., 1994. Ultrastructure and genotypic characterisation of the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus* in comparison to the anamorphic strain *Culvularia lunata*. *FEMS Microbiology Letters*, 117(1):35-40.
- Ruisi S., Barreca D., Selbmann L., Zucconi L., Onofri S. 2007. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 6:127-141.
- Russell N. J., Evans R. I., Steeg P. F., Hellemons J., Verheul A., Abee T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 28:255-261.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406–425.

- Sakai H., Kajiwaru S. 2003. Membrane lipid profile of an edible basidiomycete *Lentinula edodes* during growth and cell differentiation. *Lipids*, 39(1):67-73.
- Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvald J. C., Filtenborg O. 2002. Introduction to Food and Airborne Fungi, 6th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Schneiter R., Tatzer V., Gogg G., Leiter E., Kohlwein S.D. 2000. Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1 Δ^9 to C16:1 Δ^{11} fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182(13):3655-3660.
- Schoch C. L., Shoemaker R. A., Seifert K. A., Hambleton S., Spatafora J. W., Crous P. W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98(6):1041-1052.
- Shanklin J., Cahoon E. B. 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, 49:611-641.
- Shechter Y. 1973. Electrophoresis and Taxonomy of Medically Important Fungi. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 100(5):277-287
- Spatafora J. W., Johnson D., Sung G.-H., Hosaka K., O'Rourke B., Serdani M., Spotts R., Lutzoni F., Hofstetter V., Fraker E., Gueidan C., Miadlikowska J., Reeb V., Lumbsch T., Lücking R., Schmitt I., Aptroot A., Roux C., Miller A., Geiser D., Hafellner J., Hestmark G., Arnold A.E., Büdel B., Rauhut A., Hewitt D., Untereiner W., Cole M.S., Scheidegger C., Schultz M., Sipman H., Schoch C. 2006. A five-gene phylogenetic analysis of the Pezizomycotina. *Mycologia*, 98: 1020-1030.
- Stukey J. E., McDonough V. M., Martin C. E. 1989. Isolation and Characterisation of OLE1, a Gene Affecting Fatty Acid Desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(28):16537-16544.
- Stukey J. E., McDonough V. M., Martin C. E. 1990. The OLE1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes the Δ^9 Fatty Acid Desaturase and Can Be Functionally Replaced by the Rat Stearoyl-CoA Desaturase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(33):20144-20149.
- Sugiyama J. 1998. Relatedness, phylogeny, and evolution of the fungi. *Mycoscience*, 39:487-511.
- Sugiyama J., Hosaka H., Suh S.-O. 2006. Early diverging Ascomycota: phylogenetic divergence and related evolutionary enigmas. *Mycologia*, 98(6):996-1005.
- Suutari M. 1995. Effect of growth on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiology*, 164(3):212-216.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596-1599.
- Tang A. M. C., Jeewon R., Hyde K. D., 2007. Phylogenetic utility of protein (RPB2, β -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of Sordariomycetes (Ascomycota, Fungi). *Antonie van Leeuwenhoek*, 91:327-349.
- Tarr S. 2004. Yeasts from Lesotho – Their classification and possible applications. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, <http://etd.uovs.ac.za/ETD-db/theses/available/etd-09292005-160929/unrestricted/TARRS.pdf>
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Residues*, 22:4673–4680.
- Toke D. A., Martin C. E., 1996. Isolation and Characterization of a Gene Affecting Fatty Acid Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31):18413-18422
- Trotter P. 2001. The Genetics of Fatty Acid Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.*, 21:97-119.

- Turk M., Mejanelle L., Šentjerc J. O., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, 8:53-61.
- UniProtKB taxonomy; <http://beta.uniprot.org/taxonomy/>
- van de Peer Y., Jansen J., De Rijk J., De Wachter R.. 1997. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.*, 25:111–116.
- Vaughan-Martini A. 2003. Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine. *International Microbiology*, 6(3):175-182.
- Vinnere O. 2004. Approaches to Species Delineation in Anamorphic (mitosporic) Fungi: A Study om Two Extreme Cases. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 917. 72pp. Uppsala. http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902-1__fulltext.pdf
- Vishniac H. S., Onofri S. 2003. *Cryptococcus antarcticus* var. *Circumpolaris* var. *Nov.*, a basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83(3):231-233.
- Watanabe K., Oura T., Sakai H., Kajiwara S. 2004. Yeast $\Delta 12$ Fatty Acid Desaturase: Gene Cloning, Expression, and Function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(3):721-727.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York. W, 315–322.
- Wiens J. J. 2003. Missing data, incomplete taxa, and phylogenetic accuracy. *Syst Biol*, 52:528–538.
- Zabeau M., Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.
- Zalar P., de Hoog G. S., Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Stud. Mycol.*, 43:38-48.
- Zalar P., de Hoog G. S., Schroers H. J., Frank J. M., Gunde-Cimerman N. 2005. Taxonomy and phylogeny of the osmophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek* 87:311-328.

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorici, dr. Martini Turk za neutrudno vodstvo po poti, ki je pripeljala do tega diplomskega dela in mentorici, prof. dr. Nini Gunde-Cimerman, brez katere te poti sploh ne bi bilo. Njej, prof. dr. Ani Plemenitaš in prof. dr. Blagajani Herzog-Velikonja se posebej zahvaljujem tudi za pregled diplomskega dela.

Hvala zaposlenim na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, ki so mi pomagali do odgovorov na moja številna vprašanja.

Posebna zahvala gre mojim staršem, ki so me podpirali skozi vsa leta študija.

PRILOGE

Priloga A

Delna zaporedja gena za elongazo (*ELO1*)

>Aureobasidium_sp_EXF_914_Elo1

TGCTACATCATCATATTTCGGAGGTCGCGAGTTGATGCGCGGCCGTGAGCCCTTCAAGCTCAATGGC
CCATTCAAGGTGCACAACCTTCTACCTTACTGCCATCAGCGGTGTTCTTCTCGCCCTTTTCCTGGAGC
AATTGATTCCGGAGTTGGCCAGGAACGGCGTCTTCCATGCCATCTGCGCCTACGAGGGCGGCTGGA
CCGACAAGCTTGTGGTTCTTACTACGTGAGTAGACTGGTATAACACCTAGAAGACGATCCGGCAA
ACTAACGGCAACCAGCTCAACTACCTGACTAAGTACCTCGAGCTGATCGACACCTGCTTCCTCTTCC
TCAAGAAGAAGCCACTCAGTATGTCTAGCAATCGCTACATTCACCATCCTCACACTGACCTGACTC
CCCAGCCTTCTTACACCTACCACCACGGCGCTACCGCTCTCCTTTGCTACACCCAGCTCCTCGGT
CATACCGCCGTCTCCTGGGTTCCAATCACCTCAACCTGATGGTCCACGTCGTCATGTA

>Aureobasidium_sp_2_EXF_914_Elo1

CTACATCATCATGTTTGGGGTTCGCGAGTTGATGCGCGGCCGTGAGCCCTTCAAGCTCAATGGCCC
ATTCAAGGTGCACAACCTTCTACCTTACTGCCATCAGCGGTGTTCTTCTCGCCCTTTTCCTGGAGCAA
TTGATTCCGGAGTTGGCCAGGAACGGCGTCTTCCATGCCATCTGCGCCTACGAGGGCGGCTGGACC
GACAAGCTTGTGGTTCTTACTACGTGAGTAGACTGGTATAACACCTAGAAGACGATCCGGCAAAC
TAACGGCAACCAGCTCAACTACCTGACTAAGTACCTCGAGCTGATCGACACCTGCTTCCTCTTCCCT
AAGAAGAAGCCACTCAGTATGTCTAGCAATCGCTACATTCACCATCCTCACACTGACCTGACTCCC
CAGCCTTCTTACACCTACCACCACGGCGCTACCGCTCTCCTTTGCTACACCCAGCTCCTCGGTCA
TACCGCCGTCTCCTGGGTTCCAATCACCTCAACCTGATGGTCCACGTCGTCATGTA

>Aureobasidium_pullulans_EXF_150_Elo1

GTCATCTACTACATCATCATATTTGGCGGCAGAGAGTTCATGCGTGGTCGCGAGCCCTTCAAGCTC
AACTTCTTCTTCAAGGTCCACAACCTTACCTGACCCTGATCAGTGGTCTTCTCCTGCTTTTGTTCGT
CGAGCAGCTTCTGCCCGAGCTCGTCAGAAACGGCGTCTTCCACGCTGTCTGCGCCTACGAGGGTGG
CTGGACCGACAAGCTCGTTGTTCTTTACTACGTATGTTCCGCCGAATCCGCGACCACGAGACGCGC
GTACTGACAGATTGCAGCTCAACTACCTCACCAAGTACCTCGAGCTGATTGACACCTGCTTCCTTTT
CCTCAAGAAGAAGCCCTTGAGTAAGCACAGATCAATCTCAATTGCCAATTGCGCCAGCTAATTGAT
TTCCTAGCTTTCCTCCACACCTACCACCACGGTGCCACCGCCCTCCTCTGCTTACCCAGCTCCTCG
GCCACACCGCAGTCTCATGGGTCCCCATTACCCTGAACTTGACCGTCCACGTCGTCATGTACTGGTA
CTACTTCCAGTCCGC

>Cryptococcus_albidus_MZKI_K_528_Elo1

ACGAGAATTGATGAGGTGAGTAACGATTCTACGCGGTCCGGATGGGCGTGGTGTACGATGAGGAC
GGACCGTCGTCGTGGAATACCACTTGTGGAAAATCGAGAGAATAGAACGCTGACTCGATTACTCTT
CCAGAAACCGAGCTCCCTTCAAGCTTCAGTTCCTCTTCCGAGTGCACAATCTTTGCTCTCTGCCGG
TAGCGCCATCCTGTTGGCTTTAATGCTGGAAGAAATGTAGGGGATCCTCGTCGCGAACGTTGAACC
AAATGTTGATTAGCTTTGCCCTTCGCAAGTGTCCCGATATTCCGCAAAGAACGGTCCATTCTACTCCAT
CTGCAACACCCGAGCCTTCACTCCTGTATGTAAAAGCGTTACCGTGCAACAGCAAACAGCGAACAA
CAGCTAATCCCTTGCCTTATAGCGTCTCGTCTCATACTACATCATCAACTACTACTTCAAA
TACGTTGAATTGATTGACACCTTGTTCCTGGTTCCTCAAGAAGAAGAAGCTGGGTGAGTTGAGTTAC
GGGTCTTTGCAGAAGCCAACATTTACCAATGTGCACCAATCTAGCATTCTTGCACGTTTTCCACCAC
GCTGCCACTGCCGTTCTCTGTTTCAACCAGCTCGAAGGAAAGACTTCCGTTGTGGGTACCCTGGGA
AATGGCCTGTCCGTCTAGCCTGACCTCTCGTATACAGCAATGGGTGTCATCACCTTGAACCTCTT
GTTACGTCATCATGTACTA

>Cryptococcus_liquefaciens_MZKI_K_428_Elo1

ACGTGAATTGATGAGGTGGGTGCGGGTCTAGAGGTTTTTGTATGGGATGATCGATGTGGATCAGCCC
GATCGTGTGTTTTCAGCGAAAAAACGACCTTACTGATTGCATTCATCAACTCCAGGAACCGAGCA
CCGTTCAAGCTTCAATTCCTCTTCCGAGTCCACAACCTTCTTGTCTCTGCGGGAAGTGCCTTCTCCT
AGCCCTGATGCTGGAAGAAATGTGAGTGACCGGTTCCGTGGTAAGTTTTCGCGATGCTGAACAGTC
CTTTCGCGCTGTTAGTGTGCCGATATTCTTGAAGAACGGCCCTTCTACTCTATCTGCAACACTCGT
GCCTTCACTCCTGTAGGTGTTAGCGATTTGCAAATTGCCATGGAATACTGACCTCGGGTTTGTCTTA
GCGTCTCGTCTCATACTACATCATCAATTACTACTTCAAATACGTTGAACTGATCGACACCGTCTTC
CTGGTTCTCAAGAAGAAGAAGCTGGGTAGTCCCTGGTGATGATGGCGAAACCTGGTCGTAACCTGAA
CCATGGCGTTCCCTCAGCGTTCCTGCACGCTTCCACCACGCCGCTACTGCCGTTGTGTGCAGAAC
CAATTGGAGGGCAAGACATCTGTCTGAGTTTACTTTGATCGAGAAGTGAATCCCGCTCATCTTC
GGCCATAGCAATGGGTGTCATCACCTGAACCTGTTTCGTTACGTCATCATGTACTAT

>Cladosporium_cladosporioides_EXF_381_Elo1

TGCTACATCATCATATTCCGAGGCCGTGAGCTCATGAGGAGCCGCGCGGCTTTCAGCCTGAACGGT
CCTTTCAGGTCCACAACCTTACTTGACCATCATCAGCGGTGGTCTTTTGGCTCTCTTCATTGAGC
AGCTGCTCCCTACGCTCGTCAGGAACGGTGTCTTCTACACTATTTGCGACCTCAACGGTGGCTGGAC
CGACAAGCTGGTTCTGCTTTACTACGTAAGTGCCGCAATACAGCATTTCGAAGGGAGAACAATGAAT
CGCTAATACCACTCTCCAGCTGAACTACCTGACCAAGTACCTCGAATTGATTGACACCGTCTTCCT
TGTCTCAAGAAGAAGCCGTTACCTTCTTGCACACCTACCACCACGGTGCCACCGCCCTTCTCTGC
TACACCAGCTCCTTGGCAACACCGCTGTCTCCTGGGTGTCATCACGCTCAACCTTACCGTCCACG
TCGTCATGTA

>Cladosporium_halotolerans_II_EXF-2513_Elo1

NGTAGTAATATTAATTCCAGTCCGCCCAGTGGGGGTCATTTGCTACATCATCATTTTTGGGGGTGG
TCTTCTGGCTCTTTTCATTGAGCAGCTTCTGCCACCCTGGTCAGGAACGGCGTGTTTTACGCGATT
TGCGACCTGAACGGTGGCTGGACTGACCAGCTCGTTCTGCTTTATTACGTGAGTTTTGAGGCTATTG
AGGCAGCAGCATTGAAACATCGCAGAACTAACAATGCTTGTCCAGCTCAATTACCTCCCAAGTA
CCTGGAGGTGATGGACACCGTCTTCTCGTCTCAAGAAGAAGCGGCTCACCTT

>Cladosporium_sphaerospermum_EXF_385_Elo1

TTTGGGGGTCGCGAGCTCATGAGGAACCGCGCGGCCTTCAGGTTGAACGGTCCCTTCAAGATTAC
AACCTGTACTTGACCATCATCAGCGGTGGTCTCCTTGCCTCTTCATTGAGCAGCTCCTCCCCACC
TGGTCAGGAATGGTGTCTTCTACGCTATCTGCGACCTAACGGTGGCTGGACTGACAAGCTCGTTCT
GCTTACTACGTGAGTTTTGCGCTTGAAGAAGAAGGGAACCTCAAGCAGAGGACCAAACTAACATG
CAATTTACCAGCTCAACTACCTACCAAGTACCTCGAGCTGATCGACACTGTCTTCTCGTTCTCA
AGAAGAAGCCGCTCACCTTCTCCACACCTACCACCACGGCGCCACTGCCCTTCTCTGCTACACCC

AGCTTCTCGGCAACACCGCCGTCTCCTGGGTTGTTATCACCCCTCAACTTGACCGTCCACGTCGTCAT
GTA

>Debaryomyces_hansenii_EXF_1590_Elo1

TTTGGGGGCAACTATTTGTTCAAAAAATTTCAAATTAAGACCATTTGTGTTGAACGGATTATTTCAA
CTTCATAATCTAGTCTTGACTACTTTGTGCGATTACTTTGCTTGTGTTAATGGCTGAACAATTAATTC
CTATGGTTTACCACCACGGGTTATTCTTTGCTATTTGTCATCCTCAAGCATGGTCCCAAGAATTGGT
TTGTTTGTACTACTTGAATTACTTGATTAAGTTCACTGAATTTCTTGATACCGTGTTTTTAGTGGTTA
AACAAAAGAAATTAACCTTTTTACATACTTACCACCATGGGGCAACTGCGCTTTTTATGTTACACTCA
ATTGATTGGCTTGACTCCTATCTCGTGGGTTCCAATCACACTTAACTTGGGTGTTCACTGTGTGATG
TACTA

>Debaryomyces_hansenii_EXF_589_Elo1

TTTGGGGGTAGAGCATTGTCATCTAAGTTAAAATTACCAGCATTGAAGTTGAACTTTTTGTTCCAAT
TGCACAACATTGTGTTAACTTTATTTTCATTATCATTATTATTGTTGACCATTGAGCAATTAATTCCA
ATCTTGTACCATCACGGTATTTTCTACGCTATTTGCCATAAGAATGCGTTTGCTCCAAAATTGGTTA
CCTTGTACTACTTGAACTACTTGACTAAGTACTTGGAAATTGATTGATACCGTTTTCTTGGTGTGAA
AAAGAAGAAGCTTTTGTCTTGCACACCTACCATCATGGTGCTACCGCTCTTTTATGCTACACCCAA
TTAACAGGATCCACCTCAGTGGAAATGGGTTCCCTATCACTTTGAACTTGCCGTTTACGTCGTCATGT
ACTA

>Pichia_guilliermondii_EXF_1496_Elo1

CATCTGCTACATCATCATATTCGGAGGAAGATCGTTAATGAACAAGTTGAATGCGCCGGCTTTCAA
ATTAAACTTTTTGTTCCAGATCCACAACCTGGGATTAACCTTTGATTTTCGTTGGCATTATTGTTACTTG
CCATTGAACAATTAATCCCATTTTGTATCATCATGGTCTCTTTTATGCCATCTGTGACAAAAATGC
ATTTGCTCCCAAGTTGGTTCAGTGTACTATTTGAACTACTTGACCAAGTATTTAGAGTTGATCGAC
ACGATATTCTTGGTGTGAAAAAGAAAAAGTTGATGTTTTTGCACACCTACCACCATGGAGCCACT
GCATTGTTGTGCTACACGCAATTGACCGGATCCACCTCGGTGCAATGGGTACCAATCACGCTTAAT
TTAGCAGTCCACGTCGTGATGTA

>Pichia_guilliermondii_EXF_518_Elo1

TTTGGGGGAAGATCGTTAATGAACAAGTTGAATGCGCCGGCTTTCAAATTAAACTTTTTGTTCCAG
ATCCACAACCTGGGATTAACCTTTGATTTTCGTTGGCATTATTGTTACTTGCCATTGAACAATTAATTC
CCATTTTGTATCATCATGGTCTCTTTTATGCCATCTGTGACAAAAATGCATTTGCTCCCAAGTTGGTC
ACGTTGTACTATTTGAACTACTTGACCAAGTATTTAGAGTTGATCGACACGATATTCTTGGTGTGTA
AAAAGAAAAAGTTGATGTTTTTGCACACCTACCACCATGGAGCCACTGCATTGTTGTGCTACACGC
AATTGACCGGATCCACCTCGGTGCAATGGGTACCAATCACGCTTAATTTAGCAGTCCACGTCGTGA
TGACTA

>Phaeothea_triangularis_EXF_206_Elo1

TGCTACATCATCATATTCGGAGGCAGAGAGTTGATGAGGAACAGGGAGCCGATGCAGTTGAACGG
CCTCTTCAAGATCCACAACCTTCTACTTGACCGCAATCAGTGCGATACTGTTGGCACTCTTCATTGAG
CAGCTTCTGCCAACCTCGTGAGGCACGGCTTGTTTTACGGCATTGCGCATAACGAGGGAGGCTGG
TCCAACCAACTGGTTGTGCTTTACTACGTAAGCGCTACTTTTCTGATCTTAAGGCTGTGCCCTAGTG
CTGACATTCTGCAAAGCTCAACTACCTACCAAGTACCTCGAACTGATCGACACTGTCTTTCTCTTC
CTCAAGAAGAAGCCATTGACCTTCTCCACACTTACCACCACGGCGGACTGCCCTCCTCTGCTAC
ACCCAGCTTCTCGGCAACACCGCAGTATCATGGGTACCCATCACCTAAACCTAACAGTCCACGTC
GTCATGTA

>Rhodotorula_mucilaginosa_EXF_1630_Elo1

TGCTACATCATCATATTCGGAGGTTCGCGAGTTGATGCGCGGCCGTGAGCCCTTCAAGCTCAATGGC
CCATTCAAGGTGCACAACCTTCTACCTTACTGCCATCAGCGGTGTTCTTCTCGCCCTTTTCTGGAGC
AATTGATTCCGGAGTTGGCCAGGAACGGCGTCTTCCATGCCATCTGCGCCTACGAGGGCGGCTGGA
CCGACAAGCTTGTGGTTCTACTACTGAGTAGACTGGTATAACACCTAGAAGACGATCCGGCAA
ACTAACGGCAACCAGCTCAACTACCTGACTAAGTACCTCGAGCTGATCGACACCTGCTTCCTCTTCC
TCAAGAAGAAGCCACTCAGTATGTCTAGCAATCGCTACATTCACCATCCTCACACTGACCTGACTC
CCCAGCCTTCTTCACACCTACCACCACGGCGCTACCGCTCTCCTTTGCTACACCCAGCTCCTCGGT
CATACCGCCGTCTCCTGGGTTCCAATCACCTCAACCTGATGGTCCACGTCGTCATGTA

>Rhodosporidium_diobovatum_MZKI_K_650_II_Elo1

NACCGTGCGTGTCATTTGCTACATCATCATTTTTGGGGGTTGTAAGCGCGATCGGTATAAGAGATG
ATCCCAAAGAAGGATATACGTTGACGACTTCGCTGCCGGATGTGGACCCTGCAGTTGTATTGGACT
CGGTTATTGAGAGAGTGCCATTGTGCGAGGGGCGTCACCGAAACACTNGTGGAAGTTGNGACTGTCT
CGTTAAGCCAGTAGGTATTGAAGCTACCACCAAACAGAACGCTTTTGTCCGGACTTGCTGCGTTGT
TGATAGCTATACTGAGAATATCTGCGTTGATGCCCTTGAACCCTCAAATCCAAGCGGTGACCACG
TGAATGTACTGTGATTCCAGGCGGGGGGCATTCTAGTTAGTCA

>Hortaea_werneckii_EXF_225_Elo1

GTCATCTACTACATCATCATTTTTGGCGGGAGGGAGTTCATGAAGGACCGGCCCGCCGATGAAGCTG
AACGGGCTGTTCAAGATCCATAACTTCTACTTGACCGCAATTAGTGGGATTCTGTTGGGGCTGTTCC
TCGAGCAGCTGATCCCGACTTTGGTCCGGAATGGTGTCTTCTATGCGATTGCGATTACAATGGTGG
CTGGACGCCGACGCTTGTGGTGTGTACTACGTACGATTTGCGACCTGATCAACGAAACGACCTC
CGCGCAAGTTTTGTTGGGGTGATTTGACTGACAGAGGATGTCTTTTGCAGCTTAACCTGACCA
AGTTCCTCGAGCTCCTCGATACCGTCTTCTCTTCTCAAGAAGAAGCCCCTCACCTTCTGCACAC
CTACCACCACGGCGCGACGGCCCTGCTCTGCTACACCCAGCTGCTCGGCTACACGGCTGTCTCCTG
GGTCCCATCACTCTGAACCTGACCGTCCACGTCGTCATGTATTACTACTACTTCCAGTCCGCCCGA

>Trimmatostroma_salinum_EXF_295_Elo1

TTTGGGGGCAGGGAGGTCATGCGCAACCGCGAGCCGCTGAAGCTCAATGGCTTGTTCAAGATCCAC
AACTTCTACCTCACGGTCATCAGTGGTGCCTGCTGGCGCTCTTCTCGAGCAGCTTATCCCGACGC
TTGTGAGGAGGGGACTTTCTACGCGATTTGCGATATCAATGGTGGATGGACGCCACAGCTGGTTG
TGCTTTACTACGTAAGCGCGCCTTGAAGAGACTTGCAGCAGACGTAATAATCGCTAACACAATTCTC
AGCTCAACTACCTAACCAAGTATCTCGAGCTGATCGACACCGTCTTCTCTTCTCAAGAAGAAGC
CTCTGACCTTCTACACACCTACCACCACGGCGCCACAGCTCTCCTCTGCTTACGCAGCTGCTCGG
CAACACGGCAGTCTCCTGGGTCCCGATCACGCTCAACCTGACCGTCCACGTCGTCATGTA

>Wa_sebi_EXF_958_II_Elo1

TGCGCGTCATCTGCTACATCATCATATTTGGGGGCAGGGAGGTCATGCGCAACCGCGAGCCGCTGA
AGCTCAATGGCTTGTTCAAGATCCACAACCTTCTACCTCACGGTCATCAGTGGTGCCTGCTGGCGCT
CTTCTCGAGCAGCTTATCCCGACGCTTGTGAGGAGGGGACTTTCTACGCGATTTGCGATATCAAT
GGTGGATGGACGCCACAGCTGGTTGTGCTTTACTACGTAAGCACGCCTTGAAGAGACTTGCAGCAG
ACGTAATAATCGCTAACACAATTCTCAGCTCAACTACCTAACCAAGTATCTCGAGGTGATCGACACC
GTCTTCTCTTCTCAAGAAGAAGCCTCTGACCTTCTTACACCCACCACCCTGGCGG

>Wallemia_muriae_EXF_951_Elo1

TTTGGGGGTAGGGAAATCATGAAGGGCAGACCGGCATTTAAGCTCAAAAATACCGTTCCAGATCCAC
AACACTATCTTGTACGCTGGTAGTGCTTTGTTGTTGGCATTAAATGGCCGAGGAAGTCGTTCCAATGA
TCTACAAGCATGGATTTTACTATTCAATCTGCAGCACATCAGCCTGGACTAGCAGATTAGAATTCTA

CTACATTATTA ACTACTATTTCAAGTACATCGAACTTATTGACACTGTCTTCCTTGTTTTGAAGAAG
AAACCATTGGCATTCTTGCACGTATTCCACCACGCAGCTACTGCAGCACTTTGCTACACACAGTTAG
AGGGTGAAACAGCCGTCTCATGGGTCGTAATTTCACTCAATTTGGGCGTACACGTTTTGATGTACT

>Wallemia_sebi_EXF_958_Elo1

TTTGGGGGTAGGGAAATCATGAGAGGCAGACCGGCATTCAAGCTCAAGATACCGTTCCAGATACA
CAACACTATCTTATATGTTGGTAGCGCTTTGTTGTTGGCCTTAATGGCTGAGGAAGTCGTTCCAATG
ATCTACAACCACGGATTTTACTACTCAATTTGCAGCACATCAGCCTGGACTAGAAGATTAGAATTTT
ATTACATTGTGAACTACTATTTCAAGTACATTGAACTTATCGACACTGTTTTCTCGTTTTAAAGAA
GAAACCATTGGCATTCTTACACGTATTCCACCACGCAGCTACTGCAGCGCTCTGCTACACTCAGCTC
GAGGGTGAAACTGCCGTCTCATGGGTCGTTATCTCACTCAACTTGGCCGTACACGTTTTGATGTA

Priloga B

Delna zaporedja gena za Δ^9 -desaturazo (*OLE1*)

>Aureobasidium_sp_EXF_914_Ole1

TTACACCGATTACCGACAAGGACCCCTACAGTGTTGCAAGGGTCTCCTCTACTCTCACCTTGGCTG
GATGATCATGAAGCAGAACCCAAAGAGAATTGGCCGTACCGACATCTCCGACCTCAACGACGACC
CAGTCGTGGTCTGGCAGCACCGCAACTACCTGAAGGTCGTTTTCTTCATGGGTCTCGTCTTCCCAAT
GATTGTCGCTGGACTCGGCTGGGGTGATTGGTTCGGTGGCTTCATCTACGCTGGTATCCTCCGCATC
TTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGCGTCAACTCCCTCGCCACTGGCTCGGTGACCAGCCATTTCG
ACGACCGCAACTCTCCTCGTGACCACGTCATCACCGCTCTTGTCACTCTCGGTGAAGGCTACCACA
ACTTCCACC

>Aureobasidium_pullulans_EXF_150_Ole1

CATCTCCGACCTCAACGACGACCCCGTTGTCGTCTGGCAGCACAAGAACTACCTCAAGGTCGTTTT
CGGCATGGGTTTGATCTTCCCCACCCTCGTTGCCGGTCTCGGCTGGGGTGACTGGCTCGGTGGTTTC
ATCTACGCTGGTATCCTCCGTATCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGTGTCAACTCCCTTGCCCA
CTGGCTCGGTGACCAGCCTTTCGATGACCGCAACTCTCCTCGTGATCACGTCATCACCGCCATCGTC
ACTCTCGGTGAGGGCTACCACA ACTTCCACCAGAGTT

>Cryptococcus_liquefaciens_MZKI_K_428_Ole1

TTACACCGATAACCGACAAGGACCCCTACAGCGCACACCACGGCTTCTGGTGGGCCCACGTCGGATG
GATGCTCGTCAAGCCTCGGACCAAGATTGGCGTCGCCGACGTGTCCGACCTGACGCGCAACAAGGT
TGTTGATGGCAGCACAAGAACTACCTCTCGTTGCTCGTCTTTATGGGCTTCATCTTCCCCACGGCT
GTCGCCGGTCTCGGATGGGGCGACTGGCGCGGCGGATTCTTCTTTGCCGGTGCCGCTCGCTTGTGT
TTGTCCATCACTCGACGTTCTGCGTCAACTCGCTCGCGCACTGGCTCGGTGAGACGCCGTTTCGATAA
CAAACATTGCGCGGAGACCATATCATTACGGCGCTCGTGACGATCGGCGAGGGGCTACCACA ACTT
CCACC

>Cladosporium_cladosporioides_EXF_381_Ole1

TTACACCGANTACCGACAAGGACCCCTACAGCGTCAGGAAGGGTCTTCTCTACTCCCACTTCGGCT
GGATGCTCATGAAGCAGAACCCCAAGAGAATTGGCCGCACCGACATCTCCGACCTCAACGACGAT
GCCGTTGTCGTCTGGCAGCACAAGCACTACCTCAAGGTTGTCCTCTTCATGGGTCTCATCTTCCCGA
CTCTCGTTGCCGGTCTCGGCTGGGGTGACTGGCTCGGAGGCTTCGTCTATGCAGGCATTCTCCGCAT
CTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGTGTTAACTCCCTTGCCCACTGGCTCGGTGACCAGCCCTTC
GACGACCGCAACTCTCCCCGTGACCACGTCATCACTGCTCTTGTCACTCTTGGTGAGGGGCTACCACA
ACTTCCACC

>Cladosporium_halotolerans_EXF-2513_Ole1

TTACACCGATAACCGACAAGGACCCCTACAGCGTCAGGAAGGGTCTCCTGTACTCTCACTTCGGCTG
GATGCTCATGAAGCAGAACCCCAAGCGCATTGGCCGCACCGACATCTCCGACCTGAACGATGACG

CCGTCGTTGTCTGGCAGCACAAGCACTACCTCAAGGTCGTTCTCTTCATGGGTCTCATCTTCCCCAC
TCTCGTTGCTGGCCTCGGCTGGGGTACTGGCTCGGCCGCTTCGTCTATGCTGGTATCCTCCGCATC
TTCTTCGTCCAGCAGGCCACTTCTGCGTCAACTCTCTGGCTCACTGGCTCGGCCGACCAGCCTTTCG
ACGACCGCAACAGCCCCGTGACCACGTCATCACCGCTCTTGTCCTCTCGGTGAGGGCTACCACA
ACTTCCACCAC

>Cladosporium_halotolerans_EXF-2513_II_Ole1

CTGTACTIONTCACTTCGGCTGGATGCTCATGAAGCAGAACCCCAAGCGCATTGGCCGCACCGACATC
TCCGACCTGAACGATGACGCCGTCGTTGTCTGGCAGCACAAGCACTACCTCAAGGTCGTTCTCTTC
ATGGGTCTCATCTTCCCCACTCTCGTTGCTGGCCTCGGCTGGGGTACTGGCTCGGCCGCTTCGTCT
ATGCTGGTATCCTCCGCATCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACTTCTGCGTCAACTCTCTGGCTCACTG
GCTCGGCCGACCAGCCTTTCGACGACCGCAACAGCCCCGTGACCACGTCATCACCGCTCTTGTCAC
TCTCGGTGAGGGCTACCACAACCTTCCACCACGAGTT

>Cladosporium_sphaerospermum_EXF_385_Ole1

TTACACCGATAACCGACAAGGACCCCTACAGCGTTCGCAAGGGTCTCCTGTACTCTCACTTCGGATG
GATGCTCATGAAGCAGAACCCCAAGAGAATTGGCCGCACCGACATCTCCGACCTCAACGACGACG
CTGTCGTTGTCTGGCAGCACAAGCATTACCTGAAGGTCGTCCTCTTCATGGGTCTCATCTTCCCCAC
CCTCGTTGCTGGTCTCGGCTGGAACGATTGGCTCGGCCGCTTTGTCTACGCTGGTATCCTCCGCATC
TTCTTCGTCCAGCAGGCTACCTTCTGCGTCAACTCTCTTGCCCACTGGCTCGGTGACCAGCCCTTCG
ACGACCGCAACAGCCCCGTGACCACATCATCACCGCTCTTGTCCTCTCGGTGAGGGCTACCACA
ACTTCCACCAAC

>Debaryomyces_hansenii_EXF_589_Ole1

TTACACCGATAACCGACAAGGACCCCTACGATGCCAGACAAGGGTTATGGTACTCGCACATGGGATG
GTTGTTGGTTAAAGCCAACCCTAAGAATAGAGCCAGGGCAGATATTTCTGACTTAACTGGTACTG
GGTGGTTAACTTCCAACACCGTCATTATCTCGTGATTATGATTTTTATGGCTCTTGTGCTTCCA
TGATTGCTGGATTAGGATGGGGTGATTACTGGGGTGGTTTCGTCTACGGAGGTATCATCAGATCTTT
CTTCATTCAACAAGCCACATTTGCCATCAATTCGTTAGCACACTGGATTGGAAGTCAACCATTTCGAC
GATAGAAGAACCCTAGAGATAACGTTATCACTGCATTGGTCACCTTTGGTGAAGGTTACCACAAC
TTCCACCA

>Filobasidium_floriforme_MZKI_K_560_II_Ole1

TTACACCGATAACCGACAAGGACCCCTACTCGGCCACGAAGGGTCTGGTGGGCACATGTTGGTTG
GATGATCTTCAAGCCTAGGACCAAGATCGGTGTCGCCGACATTTCCGACTTGACCCGAAGCAAGGT
CGTCAGGTGGCAGCACAACAATACTTGTGCTTCTGTTGGTCATGGGATTGCTCTTCCCCATGGGT
GTTGCCGGTCTCGGTTGGGGCGATTGGAAGGGAGGTTTCTTCTTTGCCGGTGCCGCTAGGTTGTTGT
TTGTCCATCACGTGAGTAGTCGTATGTATACGTGTTGTTGCTTCACTGCTGACCCGAGTGACATCTA
TAGTCCACTTTCTGTGTCAACTCGTTGGCTCATTGGCTCGGAGAGCACACTTTCGACGACAAGCACA
CTCCTCGTGACCACTTCATCACCGCTTTGGTACCATCGGCCGAGGGATACCACAACCTTCCACCAC

>Glomus_clarum_J05676_Ole1-GBSc

ACACTCAACAAACCTTATCTAGTGCCCAACCAGGTGTGCTTCTACGAGTCTTGCTCACTCAGACAC
ACCTATCCCTATTGTTACGGCTATGGGGATGGCACACAAAGGTGGAAATAATAGTAGTTAAACAATA
TATGCAGCAAATCATCGGCTCCTGGCTCATCGAGTCTTGCAAATCAGCATATACATATATATATGG
GGCAGATCTTGATTCATTTATTGTTCTATTTCCATCTTTCCTACTTCTGTTTCCGTTTATATTTTGT
TTACGTAGAATAGAACATCATAGTAATAGATAGTTGTGGTGATCATATTATAAACAGCACTAAAAC
ATTACAACAAAGATGCCAACTTCTGGAATACTATTGAATTGATTGACGACCAATTTCCAAAGGAT
GACTCTGCCAGCAGTGGCATTGTCGACGAAGTCGACTTAACGGAAGCTAATATTTTGGCTACTGGT
TTGAATAAGAAAGCACCAAGAATTGTCAACGGTTTTGGTTCTTTAATGGGCTCCAAGGAAATGGTT
TCCGTGGAATTCGACAAGAAGGGAAACGAAAAGAAGTCCAATTTGGATCGTCTGCTAGAAAAGGA
CAACCAAGAAAAAGAAGAAGCTAAAATAAAATTCACATCTCCGAACAACCATGGACTTTGAATA

ACTGGCACCAACATTTGAACTGGTTGAACATGGTTCTTGTGGTATGCCAATGATTGGTTGGTA
CTTCGCTCTCTGGTAAAGTACCTTTGCATTTAAACGTTTTCTTTCTCCGTTTTCTACTACGCTGT
CGGTGGTGTCTTACTACTGCCGTTACCATAGATTATGGTCTCACAGATCTTACTCCGCTACTGG
CCATTGAGATTATTCTACGCTATCTTCGGTTGTGCTTCCGTTGAAGGGTCCGCTAAATGGTGGGGCC
ACTCTCACAGAATTCACCATCGTTACTGATACTTGTAGAGATCCTTATGACGCTCGTAGAGGTCT
ATGGTACTCCCACATGGGATGGATGCTTTTGAAGCCAAATCCAAAATACAAGGCTAGAGCTGATAT
TACCGATATGACTGATGATTGGACCATTAGATTCCAACACAGACACTACATCTTGTGATGTTATTA
ACCGCTTTCGTCATTCCAACCTTATCTGTGGTTACTTTTTCAACGACTATATGGGTGGTTTGATCTA
TGCCGTTTTTATTCGTGTCTTTGTCATTCAACAAGCTACCTTTTGCATTAACCTCCATGGCTCATTACA
TCGGTACCCAACCATTGATGACAGAAGAACCCTCGTGACAACCTGGATTACTGCCATTGTTACTTT
CGGTGAAGGTTACCATAACTTCCACCACGAATCCCAACTGATTACAGAAACGCTATTAAGTGGTA
CCAATACGACCCAACCTAAGGTTATCATCTATTTGACTTCTTTAGTTGGTCTAGCATAACGACTTGAAG
AAATTCTCTCAAAATGCTATTGAAGAAGCCTTGATTCAACAAGAACAAGAAAGATCAATAAAAA
GAAGGCTAAGATTAACGGGGTCCAGTTTTGACTGATTTGCCAATGTGGGACAAACAACCTTCTT
GGCTAAGTCTAAGGAAAACAAGGGTTGGTTATCATTTCTGGTATTGTTCCACGACGTATCTGGTTAT
ATCTCTGAACATCCAGGTGGTGAACCTTTAATTAATAACTGCATTAGGTAAGGACGCTACCAAGGCT
TTCAGTGGTGGTGTCTACCGTCACTCAAAATGCCGCTCAAAATGTCTTGGCTGATATGAGAGTGGCT
GTTATCAAGGAAAGTAAGAACTCTGCTATTAGAATGGCTAGTAAGAGAGGTGAAATCTACGAAAC
TGGAAGTTCTTTAAGCATCACATTACAATAACAAAACCTGCAACTACCATTAATAAAAAAATTGAA
AAATCATAAATTAATAAAAAAAAAAATCAATTGAATTTTTTTTTTTCATGATTACGTTTTGACATTTT
TCCTTTTTTTTTCTCTTATTACGATTTACCTTTTTTATTTATTTTTTTTCATTTTAGTATTTTATTCTTCG
TTATTTATGTATAGAAATTTTCATTTTCATTTAGATTTCAGATTTGGTTATCTTTTTTTCATTATATATCT
TTTGCATAAGTTTCAGCTTAAGTTCTATTTTTTATTTTTTTTTTCTGGGCCCTGGAGCAATAGATAT
GGGATGGCTTACTGCATCTCTTCAAAATTTACAGTCATGCTCACCCCTTAAGTTCTCAACCTTTT

>Hortaea_werneckii_EXF_225_Ole1

TACACCGATACCGACAAGGACCCCTACAGCGTCAGGAAGGGTCTTCTCTACTCGCACTTCGGCTGG
ATGATCATGAAGCAGAACCCGAAGAGAATCGGCCGTAAGTACATCTCCGACCTGAACGACGACGC
CGTTGTCGTCTGGCAGCACAAGCACTACCTCAAGGTCGTCCTCTTCATGGGCTTGATCTTCCCTTGC
TTGGTCAGCGGTCTCGGCTGGGGTGACTGGATGGGTGGATTTCATCTACGCCGGTATCCTCCGCATCT
TCTTCGTTACAGAGGCTACTTTCTGTGTGAACTCCCTCGCACACTGGCTCGGCGACCAGCCATTTGA
CGACCGCAACAGCCCGCGTGACCACGTCATACCGCCCTCGTCACGCTCGGAGAGGGCTACCACAA
CTTCCACCACGAGTTCC

>Pichia_guilliermondii_EXF_1496_Ole1

TTACACCGATTACCGACAAGGACCCCTATGATGCTCGTCAAGGATTGTGGTACTCGCACATGGGAT
GGATGTTGGTTAAGCCAATCCAAAGAACCGTGCACGTGCTGACATTTCCGATTTGACTTCTGACT
GGGTAGTTAGATTTCAACATCGTCACTACCTTACTTTGATGCTTTTGTGACTTGTATTGCCACT
ATCATTGCTGGTGTCTTCTGGGGTGACTGGTGGGGAGGGTTCATTTATGGAGGAATCTTCAAATCGT
TTGTTATTCAACAAGCTACCTTCTGTGTCAACTCATTGGCCATTGGATCGGCTCTCAACCATTGCA
TGACCGCAGAACCCCTCGTGACCACGTCATTACCGCTTTGGCTACTTTTGGTGAAGGTTACCACAAC
TTCCACCAAC

>Pichia_guilliermondii_EXF_518_Ole1

TTACACCGATACCGACAAGGACCCCTACAGCGTCCGCAAGGGTCTTCTCTACTCCCACTTCGGCTG
GATGTTGATGAAGCAGAACCCCAAGCGCATCGGCCGTACCGACATCAGCGACCTCAACGACGACA
AGGTTGTCGTATGCAGCACAAGCACTACCTCAAGGTCGTTCTTTTCATGGGCCTCATCTCCCAT
GATGGTTGCCGGTCTCGGCTGGGGTGACTGGGTGCGGTGGTTTCATCTACGCCGGTATCCTCCGCATC
TTCTTCGTCCAGCAAGCTACCTTTTGCGTCAACTCTCTCGCACATTGGCTCGGTGACCAGCCTTTTG
ACGACCGCAACAGCCCCGCGACCACGTCATACCGCTCTGGTCACCCTCGGCGAAGGCTACCACA
ACTTCCACCA

>Phaeotheca_triangularis_EXF_206_Ole1

TTACACCGAATACCGACAAGGACCCCTACAGCGTCCGCAAGGGTCTTCTCTACTCCCCTTCGGCT
GGATGTTGATGAAGCAGAACCCCAAGCGCATCGGCCGTACCGACATCAGCGACCTCAACGACGAC
AAGGTTGTCGTCATGCAGCACAAGCACTACCTCAAGGTCGTTCTTTTCATGGGCCCTCATCTTCCCA
TGATGGTTGCCGGTCTCGGCTGGGGTGACTGGGTTCGGTGGTTTCATCTACGCCGGTATCCTCCGCAT
CTTCTTCGTCCAGCAAGCTACCTTTTTCGCTCAACTCTCTCGCACATTGGCTCGGTGACCAGCCTTT
GACGACCGCAACAGCCCCCGGACCACGTCATCACCGCTCTGGTCACCCTCGGCGAAGGCTACCAC
AACTTCCA

>Rhodotorula_mucilaginosa_EXF_1630_Ole1

TTACACCGAATACCGACAAGGACCCCTACAGTGTTCGCAAGGGTCTCCTCTACTCTCACCTTGGCTG
GATGATCATGAAGCAGAACCCAAAGAGAATTGGCCGTACCGACATCTCCGACCTCAACGACGACC
CAGTCGTGGTCTGGCAGCACCGCAACTACCTGAAGGTCGTTTTCTTCATGGGTCTCGTCTTCCCAAT
GATTGTCGCTGGACTCGGCTGGGGTGATTGGTTCGGTGGCTTCATCTACGCTGGTATCCTCCGCATC
TTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGCGTCAACTCCCTCGCCCACTGGCTCGGTGACCAGCCATTTCG
ACGACCGCAACTCTCCTCGTGACCACGTCATCACCGCTCTTGTCACTCTCGGTGAAGGCTACCACA
ACTTCCACCA

>Rhodotorula_mucilaginosa_EXF_1630_II_Ole1

CGCACGTCGGCTGGATGATCGTCAAGCCTCGTCGCCGCCCGGTGTCGCGGACGTTAGCGACCTTT
CCGTCAACCCGGTTCGTCCAGTGGCAGCACCGCTGGTACCTGCCCTTGATCGTCGGCATGGGCTTCG
TCTTCCCGACGGTTCGTGCCCGCCTCGGATGGGGCGACTGGCGCGGCGGCTTCTTCTTCGCCGGCG
CCGCTCGCCTGCTGTTTCGTCCACCACTCGACCTTCTGCGTCAACTCGCTCGCTCATTGGCTCGGTGA
GACACCGTTCGACGACAAG

>Trimmatostroma_salinum_EXF_295_Ole1

TTTACACCGATAACCGACAAGGACCCCTACAGCGTCAGAAAGGGTCTGCTCTACTCGCACTTTGGCT
GGATGCTCATGAAGCAGAACCCGAAGAGAATTGGTTCGCACTGACATTTCCGATTTGAACGACGAC
GCTGTTGTGGTTTGGCAGCACAAGCATTACCTAAAGGTCGTCCTTTCATGGGTCTCGTCTTTCCCA
TGCTTGTGTCTGGCTTGCTCTGGGGTGATTGGCTCGGTGGTTTCATCTACGCTGGCATCCTCCGCAT
CTTCTTCGTTACGAAGCCACTTTCTGCGTCAACTCCCTCGCCCACTGGCTCGGCGACCAGCCTTTC
GACGACCGTAACAGTCCGCGTGACCACGTCATCACTGCTCTTGTACCCTTGG

>Wallemia_ichthyophaga_EXF_994_II_Ole1

TTACACCGATAACCGACAAGGACCCCTACAACGCTCATCGCGGTTTCTGGTACTCTCACGTTGGTTGG
ATGCTTGTCAAACCACGTATCAAGCCAGGTGTTGCTGATATCTCTGATTTGATCAAGAACCTGTGA
TTAGATTCCAACAAAAGCATTACGTTAAGTTATGCTCATCATGGGTTTCATTATTCCAACGTTTT
ACCTGGTTTATTATGGGGTGATTACCGCGGTGGTTACTTTTACGCTGGTGTCTCGCTTGTATTTC
GTTACCACTCCACATTCTGTGTAACAGTTTAGCACATTGGTTAGGTGAACAACCAATTTCGATGATA
AAAACACACCAAGAAATCACTTATCACTGCTTATGTACTGTTCGGTGAAGGCTACCACAACCTTCC
ACCAC

Priloga C

Delna zaporedja znotrajprepisne vmesniške regije (ITS) ribosomske DNA

>Aureobasidium_pullulans_EXF_150_ITS

CATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTTGTTGTTAAAACTACCTTGTGCTT
TGGCGGGACCGCTCGGTCTCGAGCCGCTGGGGATTCTGCCAGGCGAGCGCCCGCCAGAGTTAAAC
CAAACCTCTTGTTATTTAACCGTCTGAGTTAAAATTTGAATAAATCAAACCTTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTCG
AGCGTCATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCGTCGTCCTTAGTTGGGCGCGCCTTAAAG
ACCTCGGCGAGGCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTATTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGG
AACTCTGCCGACTGAAACCTTTATTTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCA

>Aureobasidium_sp_EXF_914_I_ITS

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAGTAAGGGTCTCACGGCCCGACC
TCCAACCCTTTGTTGTTAAAACACCCTTGTGCTTTGGCGTGGACCGCCGCTGTAAAAAGCGGCTGC
CGGTCTTAGGCCCGGCATGCGCCCGCCAGAGGTAATACAACTCTTGTCTTTAACAGTCGTCTGA
GTTATAATTTAAATAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTCTGCTTGG
TATTAGGCGTCCGTCTGTCTGAAAAGGCAGGCGCGCCCCAAAACCTTCGGCGAAGTCTTACCGACT
TTGGGCGCAGTAGAATTTCTAACAACGCTCTTTGGGTCGGTACGGTCTTTTGCCGCTAAATTGAATT
TATTCATTTTTCTTAGGTGACCTCGA

>Aureobasidium_sp_EXF_914_II_ITS

CATTAATGAGTAAGGGTCTCACGGCCCGACCTCCAACCCTTTGTTGTTAAAACACCCTTGTGCTTT
GGCGTGGACCGCCGCTGTAAAAAGCGGCTGCCGGTCTTAGGCCCGGCATGCGCCCGCCAGAGGTA
ATACAAACTCTTGTCTTTAACAGTCGTCTGAGTTATAATTTAAATAAATTTAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTCG
AGCGTCATTACACCACTCAAGCTCTGCTTGGTATTAGGCGTCCGTCTGTCTGAAAAGGCAGGCGCG
CCCCAAAACCTTCGGCGAAGTCTTACCGACTTTGGGCGCAGTAGAATTTCTAACAACGCTCTTTGG
GTCGGTACGGTCTTTTGCCGCTAAATTGAATTTATTCATTTTTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTA
GGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

>Cryptococcus_albidus_MZKI_K_528_ITS

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGATTGACCGTCTGTTCGAGCTTGC
TCACAGGCACATCATATCCATAACACCTGTGCACTTGTTCGGATGGCTTAGTGAAGACCGCAAGGTT
GAATCTATCCATCTACTTTACATAACAATTCTGTAACAAATGTAGTCTTATTATAACATAATAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAG
CATGCCTGTTTGGAGTGTATGAAAACCCTCAACCCTAGATTGGTTAAAACCTTTCTTTGGTTTGGAT

TTGGACGTTTGCCGATGACAAGTCGGCTCGTCTTAAAAGTAATAGCTGGATCTGTCTCGCGACATG
GTTTGACTIONTGGCGTAATAAGTATTTTCGCTAAGGACATCTTCGGATGGCCGCGTTGCAGGACTAAAG
ACCGCTTTCTAATCCATTGATCTTC

>Cryptococcus_liquefaciens_MZKI_K_428_ITS

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGATTAACCTGTCTGTGAGCTTGC
TCACAGACTTATCATATCCATAACACCTGTGCACTTGTTCGGATGGCTTAGTGAAGACCGCAAGGTT
GGATCTATCCATCTACTTTACATAACAATCTAGTAACAAATGTAGTCTTATTATAACATAATAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCTCCCTGGTATTCCGGGGAG
CATGCCTGTTTGAAGTGTATGAAAACCTCAACCTTAGATTGGTTAACACCTTTCTTTGGCTTGGAT
TTGGACGTTTGCCGATGATAAGTCGGCTCGTCTTAAAAGTAATAGCTGGATCTGTCTCGCGACATG
GTTTGACTIONTGGCGTAATAAGTATTTTCGCTAAGGACATCTTCGGATGGCCGCGTTGCAAGACTAAAG
ACCGCTTTCTAATCCATTGATCTTCGGATTAATATT

>Cladosporium_cladosporioides_EXF_2504_ITS

CATTACAGTTGACCCCGGCCCTCGGGCCGGGATGTTTACGACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCT
CCGGGGCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACATTTCAAACCTTTCGTAACCTTTGCA
GTCTGAGTAAATTTAATTAATAAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTC
GCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTTTCGTCCTCCCTC
AGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGCCGCGGGAGGCCACGCCGTAAAACAACCCCATTTCT
AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

>Cladosporium_cladosporioides_EXF_381_I_ITS

GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTACGGCCGGG
ATGTTTATAACCCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGGCTC
CGGGTGGACACTTCAAACCTTTCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAAATTTAAAC
TTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG
CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCG
TGCTCAAACCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGT
TCGGGAGGCTACGCCGTAATAA

>Cladosporium_cladosporioides_EXF_381_II_ITS

CATTACAGTGACCCCGGCTACGGCCGGGATGTTTATAACCCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCG
GGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTCGTAACCTTTGCAGTC
TGAGTAAACTTAATTAATAAAATTTAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGC
TTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCTCAAACCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGC
GTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAATAACAACCCCATTTCTAAGG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA

>Cladosporium_halotolerans_EXF_2513_ITS

CATTACAGTTGACCCCGGCCCTCGGGCCGGGATGTTTACGACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCT
CCGGGGCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACATTTCAAACCTTTCGTAACCTTTGCA
GTCTGAGTAAATTTAATTAATAAAATTTAAACTTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC

GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACCTCAAGCCTC
GCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTTTCGTCCCCTC
AGCGTTGTGAAACTATTCGCTAAAGGGTGCCGCGGGAGGCCACGCCGTAAAACAACCCCATTTCT
AAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCA

>Cladosporium_sphaerospermum_EXF_385_I_ITS

GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCCGGCTCCGGCCGG
GGATGTTATAACCCCTTGTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTTTCACGGGCGG
GGCCCCGGGTGGACACATCAAACTCTTGCCTAACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAA
TTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC
GGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACCTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGACGCGGTC
CGCCGCGCCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTCAGCGTTGTGGAACTATTTCGCTAA
AGGGTGCCACGGGAG

>Cladosporium_sphaerospermum_EXF_385_II_ITS

CATTACAGTGACCCCCGGCTCCGGCCGGGAATGTTTATAACCCCTTGTGTCCGACTCTGTTGCCT
CCGGGGCGACCCTGCCTTTTCACGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACACATCAAACTCTTGCCTAACT
TTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACCTCA
AGCCTCGCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGT
CCCCCAGCGTTGTGGAACTATTTCGCTAAAGGGTGCCACGGGAGGCCACGCCGAAAAACAACC
CATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATA

>Debaryomyces_hansenii_EXF_1590_ITS

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTTGCCAGCGCTTAAT
TGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTTTTTTGTTATTACAAGAACTTTTGCTTTGGTCTGGAC
TAGAAATAGTTGGGCCAGAGGTTACTGAACTAAACTTCAATATTTATATTGAATTGTTATTTATTT
AATTGTCAATTTGTTGATTAAATTCAAAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTC
TCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGAACTAGGCGTTTGCTTGAAATGTATTG
GCATGAGTGGTACTGGATAGTGCTATATGACTTTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAATAG
TTAATGGTATATTTCTCGGTATTCTAGGCTCGGCCTTACAATATAACAAACAA

>Debaryomyces_hansenii_EXF_589_ITS

CATTACAGGTATTCTTTTTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTTTTTT
GTTATTACAAGAACTTTTGCTTTGGTCTGGACTAGAAATAGTTTGGGCCAGAGGTTTACTGAACTAA
ACTTCAATATTTATATTGAATTGTTATTTATTTAATTGTCAATTTGTTGATTAAATTCAAAAAATCTT
CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCA
GAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTT
AGTTGAACTAGGCGTTTGCTTGAATGTATTGGCATGAGTGGTACTGGATAGTGCTATATGACTTTCT
AATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAATAGTTAATGGTATATTTCTCGGTATTCTAGGCTCGGC
CTTACAATATAACAAACAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACT

>Filobasidium_floriforme_MZKI_K_560_ITS

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTTAGATTGAACCATAGGCGA
AAGCCAGTGGTTCTTCTTTTCATATCCATAACACCTGTGCACTGTTGGATGCTTGCATCCACTTTTAA

ACTAAACATTATTGTAACAAATGTAGTCTTATTATAACATAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCA
TGAAACCCTCAAACCAAGTTTTGGATTTTCGATCCATGCTTGAGTTTGGATTTGGATGTTGCCGGT
GATGAACCGACTCATCTTAAAAGTATTAGCTTGGATCTGTCTATATGACTGGTTTACTTGGCATAA
TAAGTATTTTGGCTGAGGACATCTTCGGATGGCCAGGACCTAGACTACTGTCTGCTAACTAAACCAT
CACTTTAAGTGCATCTTTGGA

>Hortaea_werneckii_EXF_225_ITS

TAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGTGGGCTCCGGCCCTACCTC
CAACCCCATGTGAAACGACTCTGTTGCCTCGGGGGCGACCCGGCCTTCGGGCGTCCGGGGCCCCG
GCGGACACCTTCATAACTCTTGCATCTCTTGCCTGAGTGATACATATAATCAATCAAACTTTCA
ACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGC
CTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGAGCGCCGCGGCCTGCCCGCGCGC
TCCAATGTCTCCGGCTGAGCCGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGAATAGCGATCGCTTGCAGGGCCCG
GCGCGCTCGACCGGTTAAACCCCCATTTTCTATGGTGACCTCGAT

>Pichia_guilliermondii_EXF_1496_ITS

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTGCCAGCGCTTAACT
GCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTTGATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAG
ATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAAACACAATTTAATTATTTTTACAGTTAGTCAAATTTTGAATT
AATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT
ATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGTTTGGTATTGAGTGAT
ACTCTTAGTCGGACTAGGCGTTTGTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTAGATAGTGCTGTTCG
ACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGG
CCC

>Pichia_guilliermondii_EXF_518_ITS

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTGCCAGCGCTTAACT
GCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTTGATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAG
ATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAAACACAATTTAATTATTTTTACAGTTAGTCAAATTTTGAATT
AATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT
ATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGTTTGGTATTGAGTGAT
ACTCTTAGTCGGACTAGGCGTTTGTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTAGATAGTGCTGTTCG
ACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGG
CCC

>Phaeothea_triangularis_EXF_206_ITS

TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAGAACACCGGTGTAAAAGC
CGGGCTCTTAAACCCTTGTGTAACAAAACCCAGTTGCCCGGGGGCGACCCCGCCGCTCCTTTAC
CGGCAGCAGGCGAGGGGCCCCGGCGGTCCACTAAACACTGCATCAATGCGTCTGAGTAAGATTA
TTAAATCAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC
CTGGCATTCCGGGGGGCACGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGG
AGACGCGGTTAGCCGCGCTCCTCGATTCTCTTCGGCTGGGCCAACGAACCCCTAGCGTAGTAACA
TAACAGTTTCGCTGCGGGAGAGGGGGGCATCCGGCCGTTAAAGACCACCATCAAAGGTGACCTCG
AT

>Rhodosporidium_babjevae_EXF_513_ITS

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAATCTAGGACGTCCGACTTAACT
TGGAGTCCGAACCTCTACTTTCTAACCCGTGTCATCTGTAAATTGGACTAGTAGCTCTTCGGAGTG
AACCGCCATTCACTTATAAACACAAAGTCTATGAATGTAAACAAATTTATAACAAAACAAAACCTT
CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT
GCCTGTTTGAGTGCATGAAATCTTCAACCCACCTCTTCTTAGTGAATCTGGTGGTGCTTGGTTTCT
GAGCGCTGCTCTGCTTCGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAACCGAACTTCGGATTG
ACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTAGTTTTACTAGAGCCGAGTTGGGTAAAGGAAG
CTCCTA

>Rhodosporidium_diobovatum_MZKI_K_650_ITS

TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTTTAGGACTCTCTTTTTA
GAGGTCCGACCCTTTCATTTCCATACACTGTGCACACACTTCTTTTCACACATTTTAACACTATAGT
ATAAGAATGTAACAGTCTCTTTATTGAGCATAAATAAAAATAAAACTTTCAGCAACGGATCTCTTG
GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCTTTGGTATTCCGAAGAGTATGTCTGTTTGAGTGTCTG
AAACTCTCAACCCCTATTTTGTAAATGAGATGGGCGTGGGCTTGGATTATGACTGCTGTGCGCGTA
ATTGCCGGCTCAGTTGAAATACACGAGCAACCCATTTGAAATAAACGGCTTACTCGGCGTAATAA
TTATTTGCTGAGGACGTTTTCTTCAAAGTTAGAGGTGCTTCTAATGC

>Rhodotorula_mucilaginosa_EXF_1630_ITS

CATTAGTGAATATAGGACGTCCAACCTTAACTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCGTGTCAT
TGTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAAAGTCTATGAA
TGTATTAATTTTATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTCTGAACTTCAACCCCTCCTC
TTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTACGGTCTAGCTCGTTCGT
AATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATT
CTAGTCTTCGGACTAGAGCCGGGTTGGGTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTAAG
ATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCAT

>Wallemia_ichthyophaga_EXF_994_ITS

ATCATTAGTGATTTTAAAAATTATTTTAAAGATACTGCTAAGATTTAATTTTACAGTCTTAAAAATAA
TTATAACAAAATAAATCTAAACCACTGTTTAAAAATGTTTTATTAGAATGTTTAAATGTGTGTTATTA
AAAAACCACAGAAAGATTTTATAAATTTATAATAAAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTCAGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCAAATGGCGCTCTATGGTATTCCGTAGAGCACGTCTGTTTGGAGCGTCGCGAACATCTC
CAAAATTAACCTTTTTCAATTGTTAATTGAGGGTTATGAGGTTGTTTATGCCTAGTCATAGACTTTCT
TAAAATAATTAGTAGGACTCTATTAAGGGTTAATACTGTGTGTTATAGTGGAAATTTAATCTCCA
TCACCAGTCAGTAACTTTCAAGTTATGCCTTTTAAATATTAGTCAATCTGCTTCTAACAGTTGTATTA
TACAACAATTTAAACTGATCAAATCGACC

>Wallemia_muriae_EXF_951_ITS

ATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGATAAAAACTCATAATCTTCTACAAACCACTGTTTTAAAATG
TTTACTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGTTGAAATATTA AAAAGTTTTATAAAACTTTCAGCAACG
GATCTCTTGGTTCAGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATA
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCACTCTATGGTATTCCGTAGAGTACGTCTGTTTGA
GCTCGCGAACATCTCCATAATTAGTTTTTTTAAATTAATTAAGGGTTTTGAGGTTGTCATTGTATT

ATGACTCCCTTTAAAATAATTAGTGATGACCTTATGAATGGGTTAATACTGTGTGTTATAATGGATT
ACATCCATCACCAGTCAGAGAGTAATCTCGCCTTAGTAATTTGATAGTGATTGCTTCTAATCGCCTT
TATTGGCAACCTAATGATCAAATCGACC

>Wallemia_sebi_EXF_958_ITS

ATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGTA AAAA ACTCATAATCTTCCTATACAAACCACTGTTTTAAAAT
GTTTACTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGTTGAAATTATAAAAGTTTAATAAAAACCTTCAGCAAC
GGATCTCTTGGTTCAGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAT
ACAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCACTCTATGGTATCCGTAGAGTACGTCTGTTG
AGCGTCGCGAACATCTCTATAATTAGTTTTTTATTA AATTGATTATGGGTTTTGAGGTTGTCATGTA
TAATGACTCCCTTTAAAATGATTAGTGATGACCTTATGAATGGGTTAATACTGTGTGTTATAATGGA
TTACATCCATCACCAGTCAGAGAGTAATCTCGCCTTAGTAATTTGTAGTGATTGCTTCTAACTGCCA
ATTTTTGGCAAACAACCTGATCAAATCGACC