

## TAKSONOMIJA RODU *Verticillium* in DOLOČANJE FITOPATOGENE GLIVE *Verticillium albo-atrum*

Kristina MARTON<sup>6</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>7</sup>

Pregledni znanstveni članek / review scientific article

Prispelo / received: 15. oktober 2015

Sprejeto / accepted: 7. december 2015

### Izveček

Fitopatogene glive rodu *Verticillium* povzročajo okužbe prevodnega sistema številnih dvokaličnic, ki vodijo v nastanek različnih bolezenskih znamenj, kot so kloroze, nekroze, venenje in odmiranje. Največje težave povzročajo pri trajnicah, kot so oljke, bombaž in hmelj, katerih nasade lahko popolnoma uničijo in posledično povzročijo ogromno gospodarsko škodo. V Sloveniji največ škode povzroča vrsta *V. albo-atrum* na hmelju, ki z letalnim patotipom PV1 povzroča odmiranje rastlin in sili pridelovalce v krčenje nasadov in večletno sanacijo tal. Pri glivah rodu *Verticillium* spolni cikl ni poznan, imajo širok nabor gostiteljskih rastlin, samo razlikovanje na osnovi morfoloških lastnosti pa je pogosto zelo zahtevno, zaradi česar ima ta rod zelo razgibano taksonomsko zgodovino. Nadgrajevanje taksonomije je izrednega pomena pri razumevanju izvora, evolucije, mehanizmov prilagajanja različnim substratom ter samega določevanja posameznih povzročiteljev bolezni. Prispevek predstavlja pregled in razlago taksonomskega razvoja rodu *Verticillium* ter načine določanja s poudarkom na hmeljnih izolatih vrste *V. albo-atrum*.

**Ključne besede:** *Verticillium* / taksonomija / diagnostika / PCR

## TAXONOMY OF GENUS *Verticillium* AND DETERMINATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *Verticillium albo-atrum*

### Abstract

Phytopathogenic fungi from the genus *Verticillium* causes infections of the vascular system of numerous dicotyledons, which leads to formation of different symptoms, such as chlorosis, necrosis, wilting and plant death. The most harmful infections are on perennial crops, such as olive trees, cotton and hops, where they can destroy entire plantations and cause extensive economic losses. In Slovenia, the most damage is caused on hop by fungus *V. albo-atrum*, whose lethal pathotype PV1 causes plant withering and forces farmers into eradications and soil sanitation process which may take more years. For fungi from the genus *Verticillium*, the sexual cycle is not known, they have a wide spectrum of host plants, and their determination based only on morphological characteristics is often very difficult. Therefore, this genus has a very diverse taxonomic history. Upgrading taxonomy is crucial in understanding the origin, the evolution, the mechanisms of adaptation to different substrates, and for pathogen determination. This paper presents an overview and explanation of *Verticillium* taxonomy and a description of different techniques of determination with an emphasis on hop isolates of *V. albo-atrum*.

**Key words:** *Verticillium* / taxonomy / diagnostics / PCR

<sup>6</sup> Univ. dipl. bioteh., Biotehniška fakulteta, Oddelek za agonomijo (Department of Agronomy), Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: kristina.marton@bf.uni-lj.si

<sup>7</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin (Plant Protection Department), Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: sebastjan.radisek@ihps.si

## 1 UVOD

Rod *Verticillium sensu stricto* predstavlja skupino fitopatogenih gliv, ki povzročajo okužbe prevodnega sistema rastlin in posledično nastanek različnih bolezenskih znamenj, kot so kloroze, nekroze, venenje in odmiranje (Klosterman in sod., 2009). Gre za skupino gospodarsko pomembnih rastlinskih patogenov, saj njeni predstavniki okužujejo veliko število vrst gojenih rastlin iz skupine dvokaličnic (Pegg in Brady, 2002). Poleg neposredne škode, ki nastaja zaradi okužb rastlin, so omenjene glive problematične zaradi sposobnosti tvorbe trajnih organov, ki jim omogočajo večletno preživetje v tleh in tako povzročajo ponavljajoč gospodarski problem. V povprečju povzročajo izpad pridelka med 10 in 15 %, pri nekaterih rastlinskih vrstah, kot so solata, krompir ali paprika, pa lahko izgube presegajo tudi 50 %. Pri trajnicah, kot so hmelj, bombaž in oljke, lahko vrste iz rodu *Verticillium* povzročijo tudi propad nasadov (Pegg, 1984; Klosterman, 2009). V Sloveniji največ škode naredi gliva *V. albo-atrum* na hmelju, ki s pojavom letalnega patotipa PV1 (genotip PG2) povzroča odmiranje rastlin in sili pridelovalce v krčenje nasadov in večletno sanacijo tal (Radišek in sod., 2004, 2006). Omenjena gliva je zaradi visoke škodljivosti hmelju v Evropski uniji uvrščena na listo karantenskih organizmov II.A.II. direktive Sveta 2000/29/ES za nadzor sadilnega in razmnoževalnega materiala.

Glive rodu *Verticillium* imajo zaradi izostanka spolnega cikla in zahtevnosti določanja posameznih vrst in patotipov razgibano taksonomsko zgodovino (Radišek in sod., 2011). Zadnjo revizijo, ki obravnava fitopatogene vrste oz. rod *Verticillium sensu stricto*, so opravili Iderbitzin in sod. (2011). Pri tem nova taksonomija, osnovana na multigenih analizah in morfoloških lastnostih, razdeljuje obstoječe vrste in hkrati opisuje nove vrste. Tovrstna proučevanja in nadgrajevanje taksonomije so izrednega pomena pri razumevanju izvora, evolucije, mehanizmov prilagajanja različnim substratom ter samega določevanja posameznih povzročiteljev bolezni. Prispevek predstavlja pregled in razlago taksonomskega razvoja rodu *Verticillium* ter načine določanja s poudarkom na hmeljnih izolatih vrste *V. albo-atrum*, ki so po zadnji taksonomski reviziji uvrščeni v vrsto *V. nonalfalfae* (Iderbitzin in sod., 2011).

## 2 TAKSONOMIJA

Rod *Verticillium* je prvi opisal nemški mikolog Nees von Esenbeck leta 1816. Ime je izpeljal iz latinske besede *verticillius*, ki pomeni vretence, saj glive tvorijo značilne vretenaste konidiofore. Dobrih dvajset let za njegovim opisom se je pojavilo tudi ime *Acrostalagmus* kot poseben rod, vendar so ugotovili, da gre za isto skupino gliv, imenovano *Verticillium* (Hoffman, 1854).

Precejšnje težavo pri taksonomskem razvrščanju predstavlja nespolni način razmnoževanja teh gliv, zato so jih najprej razvrstili v skupino Deuteromycota, razred Hyphomycetes, red Hyphomycetales in družino Moniliaceae. Ta se je dalje na osnovi morfologije ločila na štiri sekcije (Gams, 1988; Gams in Van Zaayen, 1982):

1. *Prostrata*:
  - *V. chlamydosporium* Goddard (1913),
  - *V. balanoides* (Drechsler) Dowsett in sod. (1982),
  - *V. fungicola* (Preuss) Hassebrauk (1936),
  - *V. lecanii* (Zimmermann) Viégas (1939).
2. *Albo-erecta*:
  - *V. rexianum* (Saccardo) Saccardo (1882).
3. *Verticillium*:
  - *V. tenerum* Nees (1816).
4. *Nigrescentia*:
  - *V. albo-atrum* Reinke in Berthold (1879)
  - *V. dahliae* Klebhan (1913),
  - *V. tricorpus* Isaac (1953),
  - *V. nigrescens* Pethybridge (1919),
  - *V. nubilum* Pethybridge (1919),
  - *V. theobromae* (Turconi) Mason in Hughes (1951).

Sekcija *Nigrescentia* je dobila ime po tvorbi melaniziranih trajnih organov in vključuje fitopatogene vrste, med katerimi po patogenosti izstopata glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. V ostale sekcije so bile uvrščene glive, ki parazitirajo žuželke, ogorčice, ostale glive ali pa spadajo med saprofite. Taksonomijo, ki je temeljila na morfologiji, je popolnoma prevetnilo razvrščanje gliv na osnovi analize DNK in združilo glive s spolnim ciklom z nespolnimi glivami v enoten sistem. Multigeneske molekularne analize so tako uvrstile rod *Verticillium* v družino Plectosphaerellaceae, red Hypocreales, podrazred Hypocreomycetidae, razred Sordariomycetes, poddeblo Pezizomycotina in deblo Ascomycota (preglednica 1) (Index Fungorum, 2015). Zanimivo je, da je družina Plectosphaerellaceae precej sorodna glivam iz rodu *Colletotrichum* iz družine Glomerellaceae, ki predstavlja še eno pomembno skupino fitopatogenih gliv (Zhang in sod., 2006). Zare je leta 2003 nadalje razdelil vrste rodu *Verticillium sensu lato* še na 4 rodove *Pochonia*, *Lecanicillum*, *Haptocillium* in *Simplicillum*, kar so z nadaljnji analizami podprli tudi ostali raziskovalci (Zhang in sod., 2006, Gams in sod., 2005). Rod *Verticillium sensu stricto* je po teh raziskavah zajemal le še 5 vrst (*V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *V. longisporum* in *V. nubilum*), ki predstavljajo izključno rastlinske patogene.

Poleg taksonomskih raziskovalnih skupin so skupino fitopatogenih gliv rodu *Verticillium* intenzivno proučevali tudi fitopatologi, predvsem v smeri določanja gostiteljske specifičnosti, ločevanja med posameznimi sevi ali patotipi za namene diagnostike ter razumevanja razvoja virulence in patogenosti v okviru posameznih vrst. Raziskave, usmerjene v proučevanje izolatov glive *V. albo-atrum*, so pokazale, da v okviru te vrste obstaja jasna variabilnost, ki so jo ovrednotili kot skupino izolatov Grp1, ki jo tvorita podskupina L (izolati iz lucerne) in podskupina NL (izolati vseh ostalih gostiteljskih rastlin, kamor uvršamo tudi izolate iz

hmelja), in skupino Grp2, ki predstavlja specifične izolate, izolirane iz krompirja (Nazar in sod., 1991; Robb in sod., 1993; Carder in Barbara, 1991; Mahuku in Platt, 2002a). Razlike med omenjenimi skupinami so nakazovale, da bi jih lahko obravnavali kot nove vrste, zato so Inderbitzin in sod. (2011) opravili taksonomsko raziskavo, v kateri so s filogenetsko analizo in analizo morfoloških lastnosti proučili reprezentativne izolate posameznih skupin glive *V. albo-atrum* ter v analizo vključili tudi izolate in podskupine ostalih fitopatogenih vrst rodu *Verticillium*.

**Preglednica 1:** Taksonomska uvrstitev rodu *Verticillium* (*Index fungorum*, 2015)

**Table 1:** Taxonomic classification of the genus *Verticillium* (*Index fungorum*, 2015)

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

**Preglednica 2:** Spremembe poimenovanja in sekcij vrst rodu *Verticillium* *sensu stricto* (Inderbitzin in sod., 2011)

**Table 2:** Differences in designation and clades of genus *Verticillium* *sensu stricto* (Inderbitzin et al., 2011)

Prejšnje poimenovanje	Sprememba v taksonomiji	Sedanje poimenovanje	Sekcija vrste
<i>Verticillium albo-atrum</i>	Razdelila se je na tri vrste, določen epitip za <i>V. albo-atrum</i> .	<i>V. albo-atrum</i> , <i>V. alfalfae</i> in <i>V. nonalfalfae</i>	Flavexudans Flavnonexudans Flavnonexudans
<i>Verticillium dahliae</i>	Določen epitip.	<i>V. dahliae</i>	Flavnonexudans
<i>Verticillium longisporum</i>	Nobena.	<i>V. longisporum</i>	Flavnonexudans
<i>Verticillium nubilum</i>	Določen epitip.	<i>V. nubilum</i>	Flavnonexudans
<i>Verticillium tricorpus</i>	Razdelila se je na tri vrste, določen lektotip za <i>V. tricorpus</i> .	<i>V. tricorpus</i> <i>V. isaacii</i> <i>V. klebhanii</i>	Flavexudans Flavexudans Flavexudans
-	Opisana nova vrsta.	<i>V. zaregamsianum</i>	Flavexudans

Rezultat raziskave je bila razdelitev vrst *V. albo-atrum* na tri nove: *V. albo-atrum*, *V. alfalfae* in *V. nonalfalfae*. Da pa ne bi prišlo do zamenjav v poimenovanju, je EFSA leta 2014 izdala znanstveno mnenje, kjer poimenuje nove vrste *V. albo-atrum sensu stricto*, *V. alfalfae* in *V. nonalfalfae*, vrsto *V. albo-atrum* pred novim poimenovanjem pa *V. albo-atrum sensu lato*, ker v starejših člankih ni jasno, za katero vrsto gre (Baker in sod., 2014). Podobna razdelitev na tri vrste je bila potrjena pri vrsti *V. tricorpus*, pri nekaterih vrstah pa se je potrdilo, da ne spadajo v podrod *Verticillium sensu stricto*, niti v rod *Verticillium*, zato so jih preimenovali in razvrstili drugače: *V. theobromae* v *Musicillium theobromae* ter *V. nigrescens* v *Gibellulopsis nigrescens* (Inderbitzin in Subbarao, 2014).

Poleg samega opisa 5 novih vrst so vrste razdelili tudi na 2 sekciji, Flavexudans (vrste s tvorbo rumenega pigmenta) in Flavnonexudans (neobravnane hife) (preglednica 2), ter definirali reprezentativne gostitelje posameznih vrst (preglednica 3).

**Preglednica 3:** Vrste rodu *Verticillium sensu stricto* in njihovi gostitelji (Inderbitzin in sod., 2011; Kasson in sod., 2014; Snyder in sod., 2014)

**Table 3:** Species of genus *Verticillium sensu stricto* and their hosts (Inderbitzin et al., 2011; Kasson et al., 2014; Snyder et al., 2014)

Vrsta	Gostitelj
<i>V. albo-atrum sensu stricto</i>	krompir, tla krompirjevih polj
<i>V. alfalfae</i>	lucerna
<i>V. dahliae</i>	rastlinske družine: javorovke, ščirovke, octovke, bršljanovke, nebinovke, križnice, bučevke, metuljnice, komelinovke, slezenovke, oljkovke, makovke, rožnice, razhudnikovke
<i>V. isaacii</i>	paradižnik, artičoka, solata, špinača, tla
<i>V. klebahnii</i>	solata
<i>V. longisporum</i>	oljna ogroščica, zelje, cvetača, hren, redkev, sladkorna pesa, divja redkev
<i>V. nonalfalfae</i>	hmelj, krompir, špinača, petunija, paradižnik, veliki pajesen, javor, kivi, aralije, mnogocvetni šipek, krompir, jajčevec
<i>V. nubilum</i>	kompost gojenih gob, krompir, tla
<i>V. tricorpus</i>	paradižnik, krompir, nagelj
<i>V. zaregamsianum</i>	solata

### 3 NAČINI DOLOČANJA GLIVE *V. nonalfalfae*

Pri določanju izolatov glive *V. nonalfalfae* uporabljamo različne identifikacijske pristope, ki zajemajo morfologijo, patogene teste in molekularne analize.

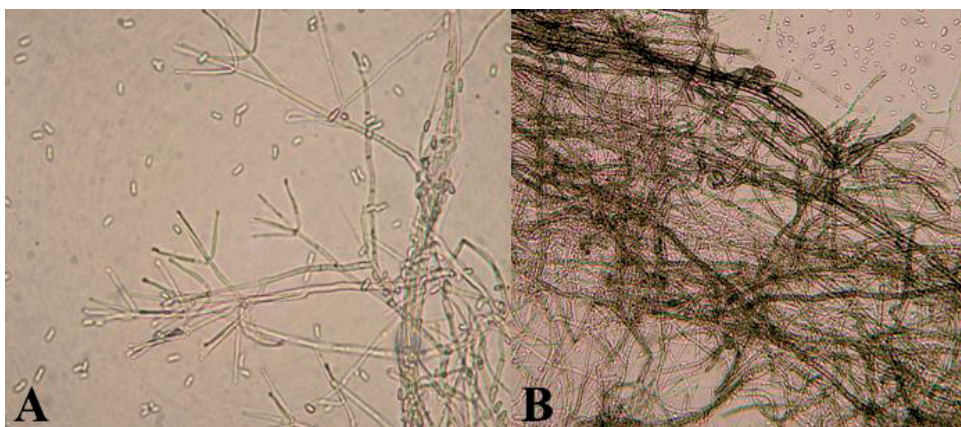
#### 3.1 Morfološke lastnosti

Po zadnjem poimenovanju (Inderbitzin in sod., 2011) za morfološko določanje glive *V. nonalfalfae* drži naslednje:

- Kolonije zrastejo na krompirjevem dekstroznem agarju po dveh tednih, na premer 3,5–5,5 cm. Sprva so bele, pozneje potemniijo, saj se začnejo formirati trajni organi.



- Tvorijo ogromno zračnega micelija v obliki šopov laskov ali belega prahu.
- Hife imajo gladko steno, v širino merijo 1,5–3  $\mu\text{m}$ .
- Konidiogene celice so fialide. 2 do 6 jih je razporejenih okoli konidiofor.
- Vretenca so med seboj oddaljena 50–160  $\mu\text{m}$ , pri apeksu so bližje. Sestavlja jih 2–5 fialid, ki izhajajo prečno iz septuma. Apikalna vretenca sestavljajo ena apikalna in več lateralnih fialid.
- Konidiofori so pokončni ali poševni, običajno so razvejeni ali nerazvejeni, hialinski, rjavo obarvani pri bazi, do 11  $\mu\text{m}$  široki. V dolžino merijo 70–570  $\mu\text{m}$  in v širino 4,5–6,5  $\mu\text{m}$ . Proti apeksu se zožijo na 2 do 2,5  $\mu\text{m}$  (slika 1)
- Konidiji so hialinski, imajo gladko steno cilindrične oblike z okroglimi ali ovalnimi vrhovi. Njihove dimenzije so  $6,0 \pm 1,0 \mu\text{m} \times 3,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , akumulirajo pa se pri koncu fialid.
- Trajni micelij je temno obarvan, sestavljajo ga rjavo obarvane hife širine 9  $\mu\text{m}$  (slika 1).



**Slika 1:** Gliva *V. nonalfalfae*; (A) konidiofori in konidiji (200x), (B) trajni micelij (100x) (Radišek, 2014)

**Figure 1:** Fungus *V. nonalfalfae*; (A) conidiophores and conidia (200x), (B) resting micelium (100x) (Radisek, 2014)

### 3.2 Skupine vegetativne kompatibilnosti (VCG)

Med začetne načine determinacije in določanje sorodnosti različnih vrst gliv iz rodu *Verticillium*, ki temeljijo na morfoloških lastnostih, uvrščamo skupine vegetativne združljivosti (ang. vegetative compatibility group, VCG), ki jih tvorijo glive istih vrst. To je tako imenovana zmožnost hif dveh sevov iste vrste, da se anastomotsko povežeta in tvorita stabilen heterokarion. Za opazovanje pripadnosti isti VCG je najprej potrebno pripraviti seve mutant, ki nimajo sposobnost izkoriščanja nitratov (ang. nitrate non-utilizing, *nit*). Izolata pripadata isti skupini VCG, če dva komplementna *nit* mutanta rasteta na minimalnem mediju. To je rezultat uspešne fuzije med sevi, ki se odraža v stabilnem heterokarionu in ne kaže mutantnega fenotipa (Leslie, 1993; Rowe, 1995; Iglesias-Garcia in sod., 2013). Pri izolatih glive *V. albo atrum sensu lato* iz različnih gostiteljskih rastlin so Correll in sod. (1988) določili dve VCG skupini. Prvo skupino so sestavljali izolati, ki so jih izolirali iz lucerne,

drugo skupino pa so sestavljali izolati iz različnih gostiteljev. Tvorbo VCG skupin med hmeljnimi izolati *V. albo-atrum* sta prva potrdila Clarkson in Heale leta 1985.

### 3.3 RFLP analize

Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) je analiza, ki temelji na razliki dolžin fragmentov, ki nastanejo med vzorci homolognih DNA molekul. Te razlike so posledica različnih zaporedij nukleotidov in posledično tudi različnih mest za restrikcijske encime (Saiki in sod., 1985). Na podlagi teh razlik lahko tudi določimo vrste gliv rodu *Verticillium* med seboj. Analiza RFLP je bila pretežno bolj v uporabi pred odkritjem PCR in objavo specifičnih začetnih oligonukleotidov, vendar je še vedno zelo uporabno orodje za determinacijo glive *V. nonalfalfae*. Zare je leta 2003 na podlagi mitohondrijske RFLP analize ločil med vsemi dotlej znanimi vrstami rodu *Verticillium*. *V. theobromae* in *V. nigrescens* sta celo kazala določene podskupine. Uporabil je encim *Hae III* po metodi Kouvelis in sod. (1999). Še pred njim pa so leta 1992 Typas in sodelavci poskušali RFLP analizo z encimoma *EcoRI* in *HaeIII* na genomski DNA gliv rodu *Verticillium*. Ugotovili so, da prvi encim ne ločuje med *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, drugi pa ju ločuje (Typas in sod., 1992). Carder in Barbara (1991) sta z RFLP določila razlike med šestimi vrstami gliv rodu *Verticillium*.

### 3.4 PCR analize - analiza nukleotidnega zaporedja ITS in IGS regij

Morfološka determinacija glive *V. nonalfalfae* sama po sebi ni dovolj, saj se lahko lastnosti, ki se uporabljajo za identifikacijo, izgubijo v laboratorijskih razmerah gojenja. Nekatere glive rodu *Verticillium* niti nimajo morfoloških lastnosti, po katerih bi jih lahko ločili med seboj. Zato se je treba poleg uporabe dihomskega ključa zateči tudi k drugim molekularnim metodam, kot so verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction, PCR), določanje nukleotidnega zaporedja in iskanje razlik v regiji jedrne ribosomalne DNA, imenovani notranji prepisni vmesnik ribosomske DNA (ang. internal transcribed spacer, ITS), z blast algoritmom. ITS regije so uradna barkoding regija za glive, poleg tega so najbolj razširjena metoda, ki temelji na identifikaciji DNA (Inderbitzin in sod., 2013; Baker in sod., 2014; Inderbitzin in Subbarao, 2014).

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; z medgenskim vmesnikom (IGS) med dvema ponovitvama 18S in 26S + 5,8S rRNA ter z notranjima prepisanimi vmesnikoma (ITS1, ITS2) med 18S in 26S rRNA. Mutacije v teh predelih so lahko podlaga za filogenetske študije, vendar 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 začeli iskati in ugotavljati še uporabnost drugih lokusov, kot so nukleotidna zaporedja genov za RNA-polimeraze, elongacijski faktor  $1\alpha$  in geni za različne strukturne proteine (aktin,  $\beta$ -tubulin) (Tang in sod., 2007).

Na podlagi PCR metode so glive rodu *Verticillium* v preteklosti poskušale razlikovati različne raziskovalne skupine (Koike in sod., 1997; Mahuku in Platt, 2002b; Lievens in sod., 2006;

Gayoso in sod., 2007; Bilodeau in sod., 2012). Kljub temu je najbolj aktualna prav zadnja objava iz leta 2013 avtorjev Inderbitzin in sod.

Inderbitzin in sod. (2011) so razvili specifične začetne oligonukleotide za polimerazno verižno reakcijo (PCR), ki lahko ločijo med vsemi desetimi vrstami gliv rodu *Verticillium* na podlagi ITS regij, genov za aktin, za elongacijski faktor  $1\alpha$ , za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo in triptofan sintazo. Še posebno težko se ločijo vrste in podvrste *V. dahliae* in *V. longisporum*, saj je *V. dahliae* starševska vrsta dveh od treh linij glive *V. longisporum*. Iz tega razloga je za določitev ostalih vrst dovolj simpleks PCR, za razlikovanje med glivo *V. dahliae* in *V. longisporum* pa je potreben multipleks PCR (Inderbitzin in sod., 2013).

Podobno kot analiza ITS nukleotidnega zaporedja je lahko podlaga za razlike med vrstami rodu *Verticillium* tudi nukleotidno zaporedje medgenskega vmesnika (ang. intergenic spacer, IGS) ribosomalne RNA. Geni, ki kodirajo ribosomalno RNA in vmesnike, se pojavljajo v več tandemskih ponovitvah, ki so dolge več tisoč nukleotidov. Ti so med seboj ločeni z IGS. Za IGS regijo so značilne podponovitve, ki so jih opazili Collins in sod. (2003). Te so tudi omogočile ločevanje med *V. alfalfae*, *V. dahliae*, *V. tricorpus* in *V. nonalfalfae*.

### 3.5 AFLP analize

Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) je analiza, ki deluje na podlagi različnih polimorfizmov na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov. Zaradi tega dobimo različno dolge pomnožene fragmente DNA med PCR (Vos in sod., 1995). Na podlagi te razlike so Collins in sod. (2003) ločili med *V. alfalfae*, *V. dahliae*, *V. tricorpus* in *V. nonalfalfae* s pomočjo treh setov začetnih oligonukleotidov (15 parov začetnih oligonukleotidov). Določili so tudi skupine, ki so se pojavile v okviru posameznih vrst. Tako so Radišek in sod. (2003a) s pomočjo AFLP analize odkrili razlike na nivoju genoma med različno virulentnima patotipoma glive *V. nonalfalfae* na hmelju.

### 3.6 RAPD analize

Naključno pomnožena polimorfna DNA (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) je analiza, ki temelji na naključnem pomnoževanju DNA segmentov. Poteka z dizajnom več arbitrarnih, od 8 do 12 nukleotidov dolgih začetnih oligonukleotidov, ki se uporabljajo za PCR genomske DNA. Kot rezultat se na gelu pojavijo unikatni profili različno dolgih fragmentov DNA za posamezne vrste (Williams in sod., 1990), na podlagi česar lahko ločimo vrste med sabo. Bhat in Subbarao (1999) sta uspešno uporabila RAPD test za določanje razlik med *V. dahliae* in *V. alfalfae*. Od 40 naključnih začetnih oligonukleotidov jih je DNA od prej omenjenih organizmov pomnoževalo 18. Ti so jasno ločevali med *V. dahliae* in *V. alfalfae*.

Prav tako so Koike in sod. (1996) ločili med sevi *V. dahliae* in *V. alfalfae sensu lato*. Na podlagi te analize so tudi določili različne podskupine med prej omenjenimi glivami.



### 3.7 Določanje patogenosti vrste *V. nonalfalfae*

Vrsta *V. nonalfalfae* uspešno okužuje širši nabor gostiteljev, vendar ne povzroča vidnih bolezenskih znamenj na vseh rastlinah. Različni sevi glive *V. nonalfalfae* povzročajo različna bolezenska znamenja. Kasson in sod. (2014) predlagajo določanje patogenosti glede na bolezenska znamenja, ki jih povzročajo različne koncentracije konidijev *V. nonalfalfae* po metodi namakanja korenin (Qin in sod., 2006). Podobno klasifikacijo predlagajo tudi Radišek in sod. (2003a in 2003b).

### 3.8 NGS

Novejše metode določevanja nukleotidnega zaporedja, kot je tudi naslednja generacija določevanja nukleotidnega zaporedja (ang. Next Generation Sequencing, NGS), so bolj namenjene iskanju razlik v posamičnih bazah, kar lahko s pridom izkoristimo za določevanje novih začetnih oligonukleotidov ali restriktijskih encimov za določanje razlik med posameznimi vrstami gliv rodu *Verticillium*. Pri tej metodi lahko določimo tudi razlike med posameznimi sevi gliv na podlagi primerjave večjih regij ali celo celega genoma, kar pa pride bolj v poštev pri študijah patogenosti posameznih podskupin organizmov ali pri iskanju regij, povezanih s povečano patogenostjo. Tak primer je tudi določanje sintenije med različnimi patotipi glive *V. nonalfalfae* naše raziskovalne skupine (neobjavljeni podatki).

## 4 ZAKLJUČEK

Rod *Verticillium* je imel od odkritja prve vrste pa vse do danes več taksonomskih revizij, ki so pomembno vplivale na samo klasifikacijo posameznih vrst in hkrati prispevale k razvoju njihovega določevanja. Največji premik je naredil napredek znanosti na nivoju molekularne biologije in posledično diagnostike, ki določa posamezne vrste ali patotipe na nivoju nukleinskih kislin, proteinov ali celo celotnih genomov. Zadnja taksonomska revizija fitopatogenih vrst rodu *Verticillium* je postavila nove temelje in hkrati odprla vrata za vključevanje novih vrst v ta rod. S fitopatološkega stališča nas zanima predvsem variabilnost v okviru posameznih vrst, ki jo določajo sevi ali patotipi. Ta vidik je pomemben zlasti pri sprejemanju ukrepov, pri reševanju bolezenskih izbruhov in hkrati pomemben pri samem razumevanju mehanizmov razvoja bolezni. Ne glede na obsežen razvoj različnih diagnostičnih tehnik pa kot osnovni del določanja še vedno ostaja morfološka analiza, ki se v procesu določanja nadgrajuje z ostalimi analizami.

## 5 VIRI

- Baker R., Bragard C., Caffier D., Candresse T., Gilioli G., Grégoire J.-C., Holb I., Jeger M. J., Evtimova Karadjova O., Magnusson C., Makowski D., Manceau C., Navajas M., Rafoss T., Rossi V., Schans J., Schrader G., Urek G., Vloutoglou I., van der Werf W., Winter S. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Verticillium albo-atrum*. *EFSA Journal*. 2014; 12(12): 3927.
- Bhat R. G., Subbarao K. V. Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. 1999; 89(12): 1218–1225.
- Bilodeau G. J., Koike S. T., Uribe P., Martin F. N. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology*. 2012; 102(3): 331–43.
- Carder J. H., Barbara D. J. Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*. *Mycological Research*. 1991; 95(8): 935–942.

- Clarkson J. M., Heale J. B. Heterokaryon compatibility and genetic recombination within a host lant between hop wilt isolates of *Verticillium albo-atrum*. *Plant pathology*. 1985; (34):129-138.
- Collins A., Okoli C. A. N., Morton A., Parry D., Edwards S. G., Barbara D. J. Isolates of *Verticillium dahliae* Pathogenic to Crucifers Are of at Least Three Distinct Molecular Types. *Phytopathology*. 2003; 93(3): 364–376.
- Correll J. C., Gordon T. R., McCain A. H. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*. 1988; (78):1017–1021.
- Gams W. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1988; (94):123-148.
- Gams W., Zare R., Summerbell R. C. Proposal to conserve the generic name *Verticillium* (anamorphic Ascomycetes) with a conserved type. *Taxon*. 2005; 54(1):179.
- Gams W., Van Zaayen A Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species I. Taxonomy. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1982; (88):57-58.
- Gayoso C., de Ilárduya O. M., Pomar F., Merino de Cáceres F. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different *Solanaceae* cultivars. *European Journal of Plant Pathology*. 2007; 118(3): 199–209.
- Hoffman H. Spermastien bier einem Fadenpilze. *Botanische Zeitung*. 1854, (12):249-254.
- Iglesias-Garcia A. M., Villarroel-Zeballos M. I., Feng C., du Toit L. J., Correll J. C. Pathogenicity, Virulence, and Vegetative Compatibility Grouping of *Verticillium* Isolates from Spinach Seed. *Plant Disease*. 2013; 97(11): 1457–1469.
- Inderbitzin P., Bostock R. M., Davis R. M., Usami T., Platt H. W., Subbarao K. V. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS one*. 2011; 6(12): e28341.
- Inderbitzin P., Davis R. M., Bostock R. M., Subbarao K. V. Identification and Differentiation of *Verticillium* Species and *V. longisporum* Lineages by Simplex and Multiplex PCR Assays. *PLoS one*. 2013; 8(6): e65990.
- Inderbitzin P., Subbarao K. V. *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes *Verticillium* wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*, 2014; 104(6): 564–74.
- Index fungorum. [www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org). 2015
- Kasson M. T., Short D. P. G., O’Neal E. S., Subbarao K. V, Davis D. D. Comparative pathogenicity, biocontrol efficacy, and multilocus sequence typing of *Verticillium nonalfalfae* from the invasive *Ailanthus altissima* and other hosts. *Phytopathology*. 2014; 104(3): 282–92.
- Klosterman S. J., Atallah Z. K., Vallad G. E., Subbarao K. V. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annual review of phytopathology*. 2009; 47: 39–62.
- Koike M., Itaya T., Hoshino K.-I., Nagao H., Ohshima S. PCR Detection of Japanese Isolates of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum* using European Subgroup-specific Primers. *Microbes and environments*. 1997; 12(1): 15–18.
- Koike M., Watanabe M., Nagao H., Ohshima S. Random amplified polymorphic DNA analysis of Japanese isolates of *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum*. *Letters in applied microbiology*. 1996; 21(2): 75-78.
- Kouvelis V. N., Zare R., Bridge P. D., Tyoas M. A. Differentiation of mitochondrial subgroup in the *Verticillium lecanii* species complex. *Letters in Applied Microbiology*. 1999; 28(4): 263-268.
- Leslie J. F. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*. 1993; 31: 127-150.
- Lievens B., Brouwer M., Vanachter A. C. R. C., Cammue B. P. A., Thomma B. P. H. J. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science*. 2006; 171(1): 155–165.
- Mahuku G. S., Platt H. W. Molecular evidence that *Verticillium albo-atrum* Grp2 isolates are distinct from *V. albo-atrum* Grp1 and *V. tricorpus*. *Molecular Plant Pathology*. 2002a; 3(2): 71-79.
- Mahuku G. S., Platt H. W. Quantifying *Verticillium dahliae* in soils collected from potato fields using a competitive PCR assay. *American Journal of Potato Research*. 2002b; 79(2): 107–117.
- Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D., Robb J. Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Molecular Plant Pathology*. 1991; 39(1): 1-11.

- Pegg G. F. The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopathologia Mediterranea*. 1984; 23(2-3): 176-192.
- Pegg G. F., Brady B. L. *Verticillium* Wilts. Wallingford, CABI Publishing, 2002; 552.
- Qin Q. M., Vallad G. E., Wu B. M., Subbarao K. V. Phylogenetic Analyses of Phytopathogenic Isolates of *Verticillium* spp. *Phytopathology*. 2006; 96(6): 582–592.
- Radišek S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. Characterization of *Verticillium albo-atrum* Field Isolates Using Pathogenicity Data and AFLP Analysis. *Plant Disease Journal*. 2003a; 87(6): 633-638.
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Dis*. 2004; 88(10): 1115–1122.
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*. 2006; 116(4): 301–314.
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. Identifikacija dveh patotipov glive *Verticillium albo-atrum* na hmelju z molekulkimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. *Hop Bulletin*. 2003b; 107–111.
- Radišek S., Javornik B. Taxonomy and variability of phytopathogenic *Verticillium* species. *Hop Bulletin*, 2011; 18: 41-55.
- Robb J., Moukhamedov R., Hu X., Platt H., Nazar R. N. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1993; 43(6): 423-436.
- Rowe R. C. Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica*. 1995; 23(1): 31-38.
- Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230(4732): 1350-1354.
- Snyder A. L., Salom S. M., Kok L. T. Survey of *Verticillium nonalfalfae* (Phyllachorales) on tree-of-heaven in the southeastern USA. *Biocontrol Science and Technology*. 2014; 24(3): 303–314.
- Tang A. M. C., Jeewon R., Hyde K. D. Phylogenetic utility of protein (RPB2,  $\beta$ -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of *Sordariomycetes* (Ascomycota, Fungi). *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007; 91(4): 327-349.
- Typas M. A., Griffen A. M., Bainbridge B. W., Heale J. B. Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992; 95(2-3), 157–162.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*. 1995; 23(21): 4407–14.
- Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*. 1990; 18(22): 6531–5.
- Zare R. A revision of plant-associated *Verticillium* species. *Rostaniha*. 2003; 4: 29 – 54.
- Zhang N., Castelbury L. A., Miller A. N., Huhndorf A. M., Schoch C. L., Seifert K. A., Rossman A. Y., Rogers J. D., Volkmann-Kohlmeyer B., Sung G. H. An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*. 2006; 98(6):1076-1087.