

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Aljaž MAJER

**IDENTIFIKACIJA GENOV ZA ODPORNOST NA
HMELJEVO UVELOST**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Aljaž MAJER

**IDENTIFIKACIJA GENOV ZA ODPORNOST NA
HMELJEVO UVELOST**

DOKTORSKA DISERTACIJA

IDENTIFICATION OF HOP WILT RESISTANCE GENES

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Doktorska disertacija je zaključek doktorskega Interdisciplinarnega podiplomskega študija biomedicine – področje genetike. V celoti je bila opravljena na Katedri za biotehnologijo, genetiko, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 21.9.2011 (po pooblastilu Senata Univerze v Ljubljani z dne 20.1.2009) je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje genetike. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Jernej Jakše in za somentorico prof. dr. Branka Javornik.

Komisija za oceno:

- Predsednik: doc. dr. Andreja Čerenak
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
- Član: prof. dr. Jernej Jakše
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: prof. dr. Zlatko Šatović
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Komisija za zagovor:

- Predsednik: doc. dr. Andreja Čerenak
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
- Član: prof. dr. Jernej Jakše
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: doc. dr. Nataša Štajner
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: prof. dr. Zlatko Šatović
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Datum zagovora: 9. april 2014

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Aljaž MAJER

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 577.2:575.1:632.24:631.524.86(043.3)
KG	molekularna genetika/odpornost rastlin/molekulski označevalci/hmelj/hmeljeva uvelost/bolezni rastlin/ <i>Verticillium albo-atrum</i>
KK	AGRI F30
AV	MAJER, Aljaž, univ. dipl. bioteh.
SA	JAKŠE, Jernej (mentor)/JAVORNIK, Branka (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biomedicine
LI	2014
IN	IDENTIFIKACIJA GENOV ZA ODPORNOST NA HMELJEVO UVELOST
TD	Doktorska disertacija
OP	XVIII, 121, [4] str., 19 pregl., 35 sl., 1 pril., 278 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Slovensko hmeljarstvo ogroža napredujoča oblika hmeljeve uvelosti, ki jo povzroča gliva <i>Verticillium albo-atrum</i>. Edini učinkovit ukrep proti bolezni je sajenje odpornih kultivarjev. Žlahtnjenje hmelja je dolgotrajen proces, ki se navadno vrši v žlahtniteljskih programih inštitutov, vezanih na hmeljarska območja. Žlahtnjenje hmelja lahko poenostavi in poceni selekcija ob pomoči molekulskih označevalcev (MAS). Cilj naloge je bila priprava molekulskih označevalcev (MO), uporabnih za selekcijo križancev za namene žlahtnjenja na odpornost, ter kloniranje genov za odpornost na hmeljevo uvelost iz odpornega kultivarja hmelja. Iz spletne baze oznak izraženih zaporedij smo pridobili set analogov odpornostnih genov hmelja, iz katerega smo pripravili 24 potencialnih molekulskih označevalcev tipa EST-RGA. Štirinajst smo jih kartirali na karto povezanosti odpornega kultivarja hmelja. Izolirali in klonirali smo tudi dva paradižnikovemu genu za odpornost na verticilij (gen Ve1) podobna lokusa pri hmelju in klonom določili nukleotidna zaporedja. Iz enega od zaporedij, ki smo ga poimenovali HLVe1-2, smo razvili MO HLVe1-2M, povezan s segregacijo odpornosti v potomstvu križanja. Izvedli smo filogenetske analize, ki so pokazale, da so bili HLVe1-2 aleli odpornega kultivarja s križanji vnešen iz ameriške dednine, kar se sklada z znanim rodovnikom, ter da na zaporedje HLVe1-2 deluje pozitivna selekcija. HLVe1-2M predstavlja dobrega kandidata za selekcijo ob pomoči markerjev v smeri žlahtnjenja za odpornost na hmeljevo uvelost.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.2:575.1:632.24:631.524.86(043.3)
CX Molecular genetics/plant resistance/molecular markers/hop/hop wilt/plant diseases/*Verticillium albo-atrum*
CC AGRIS F30
AU MAJER, Aljaž
AA JAKŠE, Jernej (supervisor)/JAVORNIK, Branka (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine
PY 2014
TI IDENTIFICATION OF HOP WILT RESISTANCE GENES
DT Doctoral Dissertation
NO XVIII, 121, [4] p., 19 tab., 35 fig., 1 ann., 278 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Hop production in Slovenia is threatened by the appearance of a progressive form of hop wilt. The only efficient preventative measure is the deployment of resistant cultivars, which can only be obtained through a lengthy and labour-intensive breeding process carried out in dedicated institutes, usually located in hop growing regions. Breeding can be amended using molecular markers in marker assisted selection. The aims of this dissertation were the acquisition of molecular markers useful for marker-assisted selection for resistance breeding and the cloning of potential resistance genes linked to resistance to hop wilt from a resistant hop cultivar. By scanning EST databases, a set of R gene analogs was obtained, and 24 potential RGA markers developed. Of these, 14 were mapped onto a linkage map of the resistant hop cultivar 'Wye Target'. In addition, complete coding regions of two distinct putative hop Ve1-like loci were retrieved, cloned and sequenced. A segregating marker was successfully developed for one of them, termed HLVe1-2. It appears to be linked to wilt resistance segregation of the mapped progeny. HLVe1-2 of the resistant cultivar appears to have been introgressed from an American wild hop accession, which is in accordance with pedigree data. Sequence analyses of HLVe1-2 sequences from different germplasm sources have shown that the sequence evolution of this locus is driven by positive selection. This marker represents a possible marker of choice for MAS towards wilt resistance.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Seznam prilog	XV
Okrajšave in simboli	XVI
Slovarček	XVIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ODKRIVANJE RASTLINSKIH GENOV ZA ODPORNOST	4
2.1.1 Odziv rastlin na okužbo s patogenom	4
2.1.2 Molekulsko ozadje pojava kvalitativne odpornosti	5
2.1.2.1 S PAMP sproženo odpornost (PTI) omogočajo receptorji na celični membrani	8
2.1.2.2 Z efektorji sproženo odpornost (ETI) omogočajo citoplazemske beljakovine	8
2.1.2.3 Izolacija R genov	11
2.2 HMELJ	12
2.2.1 Genetske raziskave hmelja	15
2.2.2 Bolezni hmelja	16
2.2.2.1 Hmeljeva uvelost	18
2.3 ODPORNOST RASTLIN NA VERTICILIJ	20
2.3.1 Gen Ve1 podaja odpornost na verticilij pri paradižniku	21
2.3.2 Ve1 homologi drugih rastlinskih vrst	24
3 MATERIAL IN METODE	26
3.1 UPORABLJEN RASTLINSKI MATERIAL	26
3.1.1 Seznam uporabljenih vzorcev	26
3.1.2 Izolacija rastlinske DNA	27
3.2 ZASNOVA Z ODPORNOSTNIMI GENI POVEZANIH MO	27
3.2.1 Določitev identitete oznak izraženega zaporedja z orodjem BLAST	28
3.2.2 Predvidevanje meje med eksoni in introni	28
3.2.3 Zasnova začetnih oligonukleotidov	28
3.2.4 Pomnoževanje v PCR	29
3.2.5 Ločevanje in ogledovanje produktov PCR z gelsko elektroforezo	29
3.2.6 Čiščenje PCR produkta	30
3.2.7 Pridobivanje NZ po Sangerju	30
3.2.8 Analiza kromatogramov	31
3.2.9 Izvedenotenje EST-RGA	31
3.3 IZOLACIJA VE1 HOMOLOGOV HMELJA	31
3.3.1 Zasnova začetnih oligonukleotidov	32
3.3.2 Ciljana pomnožitev obrobnihih regij s TAIL-PCR	33
3.3.3 Izrezovanje in čiščenje fragmentov iz agaroznega gela	33
3.3.4 Določitev NZ izrezanih fragmentov	34
3.3.5 Molekulsko kloniranje izčiščenih fragmentov	34
3.3.5.1 Ligacija	34
3.3.5.2 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5- α	35
3.3.5.3 Pomnožitev kloniranih insertov s PCR na osnovi kolonije	36

3.3.6	Analiza pridobljenih NZ in sestavljanje NZ v soseske in nadsoseske	36
3.4	IZOLACIJA IN KLONIRANJE VE1-PODOBNIH NZ HMELJA	37
3.4.1	Pomnožitev s PCR	37
3.4.2	Kloniranje	38
3.4.3	Čiščenje produktov reakcij PCR in določevanje NZ	38
3.4.4	Izolacija plazmidov	39
3.4.5	Popravljanje mutacij v kloniranih Ve1-podobnih zaporedjih hmelja	39
3.4.5.1	Ciljana mutageneza	39
3.4.5.2	Digestija z restrikcijskimi encimi in ligacija	40
3.5	KARAKTERIZACIJA PRIDOBMLJENIH HMELJNIH VE1-PODOBNIH NZ	41
3.6	ANALIZA SEGREGACIJE VE1-PODOBNIH NZ HMELJA	41
3.6.1	Priprava molekulskih označevalcev iz zaporedij HLVe1-1 in HLVe1-2	41
3.6.2	Analiza segregacije HLVe1-1	42
3.7	KARTIRANJE EST-RGA IN HLVE1-2M	42
3.8	FILOGENETSKE ANALIZE VE1-PODOBNIH ZAPOREDIJ	43
3.8.1	Filogenetske analize HLVe1-1 in HLVe1-2 lokusov hmelja	43
3.8.2	Vključitev HLVe1-1 v filogenijo Ve-podobnih zaporedij	44
3.8.3	Določitev filogenetskih dreves	44
3.9	PREDLOŽITEV NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ V GENBANK	45
4	REZULTATI	46
4.1	NA PODLAGI EST PRIPRAVLJENI R GENSKI MO HMELJA	46
4.1.1	Analiza potencialnih RGA-EST z orodjem BLAST	46
4.1.2	Predvidevanje mej med eksoni in introni	49
4.1.3	Pomnoževanje hmeljevih EST-RGA v PCR in pridobivanje NZ produktov	50
4.1.4	Analiza pridobljenih nukleotidnih zaporedij	52
4.1.4.1	Določitev mej med eksoni in introni in statistika dolžin intronov	52
4.2.1.2	Validacija polimorfizmov na ravni nukleotidnega zaporedja	52
4.2	PRIDOBIVANJE VE1-PODOBNIH HMELJNIH NZ IZ HMELJA	56
4.2.1.	Zasnova in potek poskusa	56
4.2.2	Pridobivanje dodatnih NZ bočnih regij HLVe1-1 in HLVe1-2 s TAIL-PCR	57
4.2.3	Sestavljanje pridobljenih Ve1-podobnih zaporedij hmelja v soseske	60
4.2.4	Začetna karakterizacija Ve1-podobnih zaporedij hmelja	63
4.3	IZOLACIJA IN KLONIRANJE HMELJNIH HOMOLOGOV GENA VE1	65
4.4	KARAKTERIZACIJA HMELJNIH HOMOLOGOV GENA VE1	70
4.4.1	Promotorni regiji HLVe1-1 in HLVe1-2	70
4.4.2	Analiza kodirajočih regij HLVe1-1 in HLVe1-2	71
4.4.1.1	Poravnava različnih alelnih oblik HLVe1-1 in HLVe1-2	71
4.4.1.2	Domene prevedenih AZ posameznih oblik HLVe1-1 in HLVe1-2	72
4.5	PRIPRAVA MOLEKULSKIH OZNAČEVALCEV HLVE1-1 IN HLVE1-2	75
4.6	DODAJANJE NOVIH MO NA KARTO POVEZANOSTI	78
4.7	FILOGENETSKA ANALIZA HMELJNIH VE1 HOMOLOGOV	81
4.7.1	Filogenetska analiza NZ Ve1 homologov hmelja	86
4.7.2	Filogenetska analiza AZ Ve1 homologov pri različnih rastlinskih vrstah	87
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	90
5.1	PRIDOBIVANJE HMELJNIH EST-RGA MO	90
5.2	IZOLACIJA VE1 HOMOLOGOV PRI HMELJU	93
5.3	KARAKTERIZACIJA HLVE1-1 IN HLVE1-2	96
5.4	FILOGENETSKA ANALIZA HLVE1-1 IN HLVE1-2	97
6	POVZETEK (SUMMARY)	99

6.1	POVZETEK	99
6.2	SUMMARY	102
7	VIRI	105
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Seznam vseh v raziskavi uporabljenih vzorcev dednine hmelja, ki obsega kultivarje, žlahtniteljske linije in akcesije divjega hmelja	26
Preglednica 2: Degenerirani začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje bočnih regij Ve1 homologov hmelja s TAIL-PCR	32
Preglednica 3: Specifični začetni oligonukleotidi, uporabljeni v postopku izolacije hmeljnih homologov Ve gena s TAIL-PCR. Začetni oligonukleotidi so razporejeni po stopnjah izvedbe TAIL-PCR (1° – primarna, 2° – sekundarna, 3° – terciarna).	32
Preglednica 4: Pogoji pomnoževanja za izvedbo TAIL-PCR (Liu in sod., 1995)	33
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje celotnih kodirajočih zaporedij hmeljnih Ve1 homologov	37
Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za pridobivanje nukleotidnih zaporedij HLVe1-1 oz. HLVe1-2	38
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za popravljanje klona Ve2A-1 s ciljano mutagenezo	40
Preglednica 8: Para začetnih oligonukleotidov za pomnožitev MO HLVe1-1M in HLVe1-2M	42
Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi za pridobivanje nukleotidnih zaporedij HLVe1-1 oz. HLVe1-2 iz hmeljnih akcesij	43
Preglednica 10: Dodeljene pristopne številke zaporedij za bazo GenBank, ki smo jih pridobili v sklopu naloge	45
Preglednica 11: Določitev predvidene funkcije posameznih EST-RGA na podlagi najdenih referenčnih genov. Referenčni geni so bili najdeni na podlagi BLASTx poravnave med EST-RGA zaporedji in bazo aminokislinskih zaporedij nr na strežniku NCBI. Predvidena funkcija EST-RGA je bila nato določena na podlagi opisa najboljših rezultatov BLASTx. Dolžina izhodiščnih EST-RGA je podana v prilogi A.	47
Preglednica 12: Celokupno število intronov v referenčnih genih in ustrezajočih amplikonih EST-RGA zaporedij s podatkom o tem, kateri intron referenčnega gena je predvidoma prisoten v EST-RGA pomnožku	49
Preglednica 13: Dolžine NZ za posamezne EST-RGA, pridobljene s posameznimi ZO, ter skupne dolžine pridobljenih NZ	51
Preglednica 14: Dolžine intronov hmeljnih EST-RGA MO z v celoti določenim NZ in ustrezajoče dolžine intronov referenčnih genov. Podana so tudi razmerja obeh vrednosti.	52

	str.
Preglednica 15: Zraven HLVe1-1 in HLVe1-2 nadsosesk smo iz prejetih kloniranih NZ TAIL-PCR fragmentov sestavili še 7 dodatnih nadsosesk. Pet jih kaže določeno mero podobnosti s HLVe1-1 ali HLVe1-2, dve pa predstavljata NZ 5' ali 3' bočnih regij, ki so preko skupnega izvora NZ v soseskah vezane na HLVe1-1 oz HLVe1-2. V preglednici sta prikazana izvor posameznih NZ v soseskah in lastnosti poravnave nadsosesk s HLVe1-1 in HLVe1-2. Sama poravnava nadsosesk s HLVe1-1 in HLVe1-2 je prikazana na sliki 14.	62
Preglednica 16: Identiteta preostalih nadsosesk, dobljenih s TAIL-PCR, ter Ve1-podobnega EST-RGA HL6293	75
Preglednica 17: Določitev odstopanj od predvidenega razmerja genotipov s statističnim testom χ^2 . Podana so predvidena in opažena razmerja genotipov in dobljene p-vrednosti.	79
Preglednica 18: Določitev mesta končnega (stop) kodona v NZ posameznih HLVe1-1 in HLVe1-2 zaporedij posameznih hmeljnih akcesij.	84
Preglednica 19: Izračun posameznih parametrov, nanašajočih se na variabilnost zaporedij v poravnava funkcionalnih regij HLVe1-1 in HLVe1-2. Pokazatelj selekcijskega pritiska na zaporedja, π_a/π_s , ima za zaporedja v poravnavi HLVe1-1 vrednost 0,91, za zaporedja v poravnavi HLVe1-2 pa 2,02, kar pri slednjem kaže na pozitivno selekcijo v kodirajočih zaporedjih.	85

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Ponazoritev razvoja odporne interakcije med rastlinskim gostiteljem in njegovnim patogenom, kot ga razlaga cikcak model (Jones in Dangl, 2006). A) Pri s PAMP pogojeni odpornosti (PTI) membranski receptorji tipa RLP oz. RLK zaznajo ohranjene molekule PAMP, ki jih izloča patogen, in sprožijo odziv gostitelja v smeri odpornosti. B) Kot odgovor na odziv gostitelja patogen sprošča efektorje, ki onemogočijo PTI. C) Na naslednji ravni odziva gostiteljeve citoplazemske odpornostne (R) beljakovine (NLR) prepoznajo efektorje patogena in sprožijo odziv v smeri odpornosti (prirejeno po Pieterse in sod., 2009).	7
Slika 2: Značilni razredi citoplazemskih R genov tipa NLR (NBS-LRR receptorji). TIR – Toll/Interleukin-1 domena; NBS – nukleotid vezavno mesto, L – povezovalni odsek, LRR – regija z z levcinom bogatimi ponovitvami, WRKY – domena, ki vsebuje zaporedje WRKY; N – N-terminus beljakovine; C – C-terminus beljakovine (prirejeno po McHale in sod., 2006)	10
Slika 3: Shema pomembnih korakov za določitev končne interakcije gostitelja in patogena za primer okužbe z verticilijem. V kolikor so končni simptomi hudi, gre za pojav občutljivosti. Odsotnost simptomov pomeni načeloma pojav odpornosti, pojav milih simptomov pa lahko smatramo za tolerantno interakcijo, ki je v tem primeru pravzaprav nepopolna odporna interakcija (prirejeno po Fradin in Thomma, 2006).	19
Slika 4: Molekulske interakcije med paradižnikom in <i>V. dahliae</i> rasa 1. Interakcija glivnega efektorja Ave1 in RLP Ve1 sproži signalni odziv preko večih komponent signalne kaskade, ki privedejo do odpornosti na patogena.	23
Slika 5: Uspešnost pomnoževanja vseh 34 pripravljenih EST-RGA, predstavljena na agaroznem gelu. A) dva primera pomnožitev EST-RGA pri obeh starših in šestimi potomcih za EST-RGA HL3080 in HL6041. M- dolžinski standard, K- kontrola (voda), WT-'Wye Target'. Preostala imena so oznake križancev. B) in C) – shema pomnožitev vseh 34 pripravljenih EST-RGA v PCR reakcijah. Pod črto, ki predstavlja pomnožek, so pripisane ocenjene vrednosti dolžin PCR fragmentov, dobljene s programom PyElph 1.4.	50
Slika 6: Razporeditev polimorfizmov na ravni nukleotidnega zaporedja v 24 NZ EST-RGA. Polimorfizmi so označeni s kratko navpično črto, pod katerimi je pripisana oznaka, ki podaja tip polimorfizma (S-SNP, I- insercija/delecija) in položaj polimorfizma v nukleotidnem zaporedju (v bp, gledano od začetka zaporedja). Prikazane so tudi eksonske (debela vodoravna črta) in intronske regije (ozka vodoravna črta). V oklepajih so podane skupne dolžine nukleotidnih zaporedij.	53
Slika 7: Škatelni diagrami vrednosti razmerij opaženih in predvidenih dolžin intronov po EST-RGA (A) in frekvenc zaznanih polimorfizmov (FP) v eksonih, intronih ter celotnem pridobljenem NZ EST-RGA (B). V primeru vrednosti s prevelikim odklonom je pripisano ime EST-RGA in pripadajoča izmerjena vrednost (v oklepaju).	54

- str.
- Slika 8: Segregacija različnih tipov opaženih polimorfizmov na ravni NZ pri obeh starših ('Wye Target' in BL2/1) in dveh oz. treh izbranih potomcih križanja. Prikazani so predstavniki vseh skupin opaženih polimorfizmov (A-E) in ena posebnost – opažen ničelni alel (F). A) SNP tipa AB X AA; B) SNP tipa AA X AB; C) polimorfizem tipa AA X BB, ki ni primeren za kartiranje; D) insercija/delecija v enem od alelov lokusa matere; E) SNP tipa AB X AB, za katerega so značilni trije različni genotipi pri potomcih; F) odsotnost enega alela v celoti (ničti alel) pri materi (A0), ki povzroči pojav novega genotipa (B0), vidnega pri potomcu 58-214. 55
- Slika 9: Prileganje sosesk Ve1, Ve2, VeK1 in VeK2 na NZ paradižnikovega gena Ve1, na podlagi katerega smo našli izhodiščni hmeljni EST. Na sliki ni prikazana zasnova treh kasneje proizvedenih setov ZO za pridobitev manjkajočih delov kodogenih zaporedij HLVe1 in HLVe2. 56
- Slika 10: Shematičen prikaz pridobljenih fragmentov v TAIL-PCR za posamezne kombinacije specifičnih in arbitrarnih začetnih oligonukleotidov. Črte, ki predstavljajo PCR fragmente, so prikazane, kot bi bile zaznane na agaroznem gelu po ločevanju z elektroforezo. Pod črto je pripisana predvidena velikost fragmenta v bp, v oklepaju od njej pa število posameznih ponovitev pomnoževanja (od skupno 3), v katerih smo zaznali ta fragment. Zvezdica (*) označuje tiste fragmente, ki jih v nadaljevanju nismo uspeli klonirati in jim dokončno določiti NZ. Črna barva črte predstavlja fragmente, iz katerih smo kasneje uspešno določili NZ Ve1-podobnega zaporedja. Iz fragmentov, predstavljenih s sivo črto tega nismo pridobili Ve1-podobnih NZ, zato sklepamo, da gre verjetno za nespecifično pomnožitev. V kolikor smo zaporedja uspeli klonirati in klonom določiti NZ, je nad črto, ki prikazuje fragment, pripisana v nadaljevanju opisana soseska, ki ji NZ iz fragmenta pripada. 58
- Slika 11: Primer ponovljivosti pomnoževanja posameznih fragmentov v elektroforetsko ločenih produktih terciarne TAIL-PCR za 12 kombinacij specifičnih in arbitrarnih ZO. V primeru kombinacije ZO K2T2R in AD3 je v drugem primeru prišlo do izpada pomnožitve. V primeru kombinacije ZO Ve1T2F in AD5 se je v drugi reakciji pojavi dodaten fragment, v primeru kombinacije ZO Ve2T2F pa sta oba specifična fragmenta v drugi reakciji izpadla. 59
- Slika 12: Povzetek pomnoževanja bočnih regij HLVe s TAIL-PCR in nadaljnjih postopkov pridobivanja NZ iz pomnoženih fragmentov. A – porazdelitev posameznih kombinacij TAIL-PCR ZO glede na skupno število pomnoženih fragmentov; B – porazdelitev ponovljivosti pomnoženih fragmentov v treh neodvisnih TAIL-PCR; C – škatlični diagram ocenjenih dolžin s TAIL-PCR pridobljenih fragmentov; D – potek izločanja posameznih fragmentov iz postopka kloniranja z ozirom na razlog. Za 30 fragmentov smo po uspešnem kloniranju pridobili NZ. 60

	str.
Slika 13: Sestavljanje nadsosesk HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B) iz posameznih sosesk pri 95 % najnižji ravni ujemanja NZ. V oklepaju je podano mesto posamezne soseske v nadsoseski. Črtkane črte povezujejo zaporedja, pridobljena z obeh koncev dolgih klonov, ki jih zaradi prekratkih odčitkov pri določanju NZ nismo uspeli združiti v celotno zaporedje.	61
Slika 14: Poravnava preostalih Ve1-podobnih nadsosesk, ki pri 95 % ujemanja niso bile pridružene nobeni od HLVe nadsosesk, s HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B). V kolikor zaporedje oz. del zaporedja kaže poravnavo s HLVe1-1 oz. HLVe1-2, je le ta obarvan sivo. Prazen pravokotnik pomeni odsotnost poravnave.	63
Slika 15: ClustalX poravnava aminokislinskih zaporedij, prevedenih iz kodirajočih regij NZ HLVe1-1 in HLVe1-2.	64
Slika 16: Določitev kodirajočih in robnih nekodirajočih zaporedij za hmeljni Ve1-podobni zaporedji HLVe1-1 in HLVe1-2.	64
Slika 17: Izvedba PCR s temperaturnim gradientom s parom ZO za pomnoževanje A) HLVe1-1 in B) HLVe1-2. Kot matrično DNA smo v vseh reakcijah uporabili DNA hmeljnega kultivarja 'Wye Target'. Za izvajanje PCR v nadaljnjih fazah poskusa smo za obe zaporedji izbrali temperaturo 62 °C.	65
Slika 18: PCR na osnovi kolonije za 24 belih bakterijskih kolonij, pridobljenih v postopku molekulskega kloniranja za HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B). Iz pomnoženega zaporedja HLVe1-1 smo uspeli pridobiti skupno le en klon (puščica). Preostali kratki pomnoženi fragmenti so pomnoženi deli praznih vektorjev z za vektor specifičnim parom ZO. Za HLVe1-2 smo pridobili skupno 18 klonov.	66
Slika 19: V postopku pomnoževanja v PCR s <i>Taq</i> polimerazo nenamerno vnešene mutacije, prikazane za vsako od 18 kloniranih HLVe1-2 zaporedij. Za imenom klona je v oklepaju podano skupno število mutacij v določenem klonu. Mesta posameznih mutacij v nukleotidnem zaporedju klona predstavlja navpična črta. Črtkana črta prikazuje lokacijo 73 bp dolge vrzeli v poravnavi HLVe1-2T s preostalima kloniranimi HLVe1-2 zaporedjema.	67
Slika 20: Pridobivanje kloniranih Ve1-podobnih zaporedij hmelja brez s <i>Taq</i> polimerazo vnešenih mutacij. A) Prikaz priprave ZO za postopek ciljane mutageneze s klonom HLVe1-2A-1 in zasnove postopka restrikcije in ligacije pravilnega zaporedja iz dveh različnih klonov HLVe1-2T. HLVe1-B-3 ni imelo nobene s <i>Taq</i> vnešene mutacije. B) V postopku ciljane mutageneze smo s prileganjem ZO s pravimi bazami na mestu mutacij v klonu HLVe1-2A-1, uspešno popravili to klonirano zaporedje. C) Ločeni produkti digestije klonov HLVe1-2T-9 in HLVe1-2T-10 z restrikcijskima encimoma <i>NheI</i> in <i>XcmI</i> . Krajši fragment klona HLVe1-2T-10 smo ligirali v daljši fragment HLVe1-2T-9. D) Po ligaciji smo pridobili skupnemu zaporedju enako NZ HLVe1-2T.	69

	str.
Slika 21: Prikaz motivov za vezavo regulatornih beljakovin v promotorni regiji HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B). Rumeno označen motiv (W box) je vpleten v odziv rastline na glivne patogene (Yamamoto in sod., 2004). Modro označeni motivi so vpleteni v odziv rastline na stres, odzivom na svetlobo oz. odzivom na signalizacijo s salicilno kislino.	70
Slika 22: Prikaz lokacije posameznih polimorfizmov v kloniranih zaporedjih HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B). Vsaka navpična črta predstavlja en točkovni polimorfizem. Pri prikazu HLVe1-1 so prikazana stanja polimorfizma za vsakega od opaženih SNP med zaporedjima ter obe vrzeli. Pri HLVe1-2 so z navpično črto prikazana mesta, kjer se določena alelna oblika razlikuje od preostalih dveh. Pod imenom zaporedja je pripisano skupno število polimorfizmov oz. vrzeli (za katere je nad prikazom pripisan razpon v bp).	72
Slika 23: Anotacija verjetno delujočih alelnih oblik HLVe1-1A, HLVe1-2A in HLVe1-2B s poravnavo s paradižnikovim genom Ve1, za katerega je znana razporeditev posameznih beljakovinskih domen.	73
Slika 24: Prisotnost oz. odsotnost posameznih domen oz. LRR motivov, značilnih za paradižnikov Ve1, pri vseh skupno petih alelnih oblikah obeh hmeljnih Ve1 homologov. Zraven HLVe1-1A in HLVe1-2A sta pripisani aminokislinski zaporedji posameznih domen. SP – signalni peptid, LRR1-37 – posamezne LRR ponovitve, IS – otoček (prekinitev dveh LRR regij), AC – domena s kislimi aminokislinami, TM – transmembranska regija, CT – citoplazemski rep (endocitotska domena).	74
Slika 25: Zasnova začetnih oligonukleotidov za molekulska označevalca HLVe1-1M in HLVe1-2M, pripravljena na podlagi razlik med zaporedjema HLVe1-1 in HLVe1-2. (A) Prikaz položaja ZO in predvidenih SNP v amplikonih za zaporedji HLVe1-1 in HLVe1-2. (B) Prileganje ZO za HLVe1-1M na poravnavo vseh petih alelnih oblik HLVe1-1 oz. HLVe1-2.	76
Slika 26: Segregacija HLVe1-1M in HLVe1-2M. A) HLVe1-1M glede na zaznan vzorec dedovanja predstavlja podvojen gen. Med NZ kloniranih amplikonov HLVe1-2M (58-18K1, 58-18K2 in 58-18K3) so vidni trije značilni haplotipi, in sicer haplotipa SNP obeh materinih alelov in haplotip edine očetove alelne oblike. B) Pripravljen SNP v NZ HLVe1-2M kaže pričakovano Mendelsko dedovanje in predstavlja kandidatni MO za kartiranje v družini 'Wye Target' X BL2/1.	77
Slika 27: Prisotnost alela HLVe1-2A v genotipu je povezana s povišano odpornostjo potomcev križanja. A) Primerjava povprečnih vrednosti razredov odpornosti na hmeljevo uvelost pri potomcih. Vrednost 5 pomeni popolnoma občutljivo rastlino, vrednost 0 pa popolnoma odporno. B) Razporeditev števila potomcev z različnimi genotipi lokusa HLVe1-2 po razredih odpornosti.	78
Slika 28: Okvirna karta povezanosti križanja 'Wye Target' X BL2/1 po dodatku 14 molekulskih označevalcev EST-RGA ter HLVe1-2M. Vsaj en MO je bil kartiran na 7 skupin povezanosti, le dve (LG5 in LG7) sta ostali nespremenjeni.	80

	str.
Slika 29: Pomnožitev celotnih kodirajočih zaporedij HlVe1-1 pri 11 akcesijah ter HlVe1-2 pri 13 akcesijah hmelja. V dveh primerih (AH1 in 1018.001) je bila pomnožitev HlVe1-2 šibka. V treh primerih (HlVe1-1 pri 492.002 ter HlVe1-2 pri K5 in 71.002) smo pridobili fragment dolžine, različne od pričakovane. V 10 primerih za HlVe1-1 in 9 primerih za HlVe1-2 smo zaznali ustrezno jakost fragmenta ustrezne dolžine.	81
Slika 30: Opaženi polimorfizmi v zaporedjih HlVe1-1 (razen SNP) različnih akcesij hmelja. Navpične črte predstavljajo mesta krajših vzeli ali vstavitev s podanimi dolžinami, v oklepaju pa je podano njihovo mesto v zaporedju. Na 3' koncu vseh zaporedij (od bp 3100 dalje) je prisoten mikrosatelit tipa AGA _n z od 4 do 9 ponovitvami.	82
Slika 31: Vrzeli in insercije v zaporedjih HlVe1-2 različnih akcesij hmelja. Navpične črte predstavljajo mesta krajših vzeli ali insercij s podanimi dolžinami, prekinjene črte pa razpon daljših vrzeli. V oklepaju je podan razpon vrzeli v nukleotidnem zaporedju.	83
Slika 32: Filogenetsko drevo sorodstvenih razmerij med nukleotidnimi zaporedji hmeljnih Ve1-podobnih zaporedij. Kot zunanja skupina je bilo uporabljeno Ve1-podobno zaporedje konoplje (CsVe). Zaporedja HlVe1-1 in HlVe1-2 so nedvoumno ločena v dve skupini. Imena taksonov, označena krepko, označujejo Ve1-podobna zaporedja iz kultivarja 'Wye Target'. Krepko označene vrednosti ob vozliščih so vrednosti, dobljene po metodi vezanja, višje od 50 (od največ 100), ki predstavljajo dobro podporo kladu za vozliščem.	86
Slika 33: Filogenetsko drevo Ve1-podobnih zaporedij šestih rastlinskih vrst. Drevo je bilo določeno po metodi največjega verjetja (ML) ob implementaciji modela substitucij WAG s 1000 ponovitvami metode vezanja.	87
Slika 34: Prikaz domenske strukture beljakovinskih produktov v filogenetskih analizah uporabljenih Ve1-podobnih zaporedij. Vseh devet genov spada glede na v beljakovini prisotne domene v štiri podrazrede. HlVe1-2 je po domenski strukturi popolnoma enak paradižnikovemu genu Ve1.	89
Slika 35: Analiza po Southernu na sedmih vzorcih hmelja, razgrajenimi z restrikcijskima encimoma <i>EcoRI</i> oz <i>EcoRV</i> . Uporabljena radioaktivno označena sonda je bila pripravljena na podlagi dela paradižnikovega gena Ve1.	93

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Pripravljeni pari ZO za pomnoževanje 34 hmeljnih EST-RGA zaporedij. Za vsak par ZO sta prikazani skupna dolžina izvornega EST in predvidena dolžina pomnožka v PCR. Slednja ne upošteva dolžine predvidenih intronov v pomnožku. Podčrtani ZO so bili uporabljeni za pridobivanje NZ za določanje polimorfizmov iz posameznih amplikonov.
- Priloga B: Nukleotidno zaporedje hmeljnega EST-RGA HL5290 skupne dolžine 162 bp. Zaporedje je prekratko za vključitev v bazo GenBank.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AD	arbitrarni degenerirani začetni oligonukleotid (za TAIL-PCR)
AFLP	polimorfizem dolžine pomnoženih restrikcijskih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
AKO	aminokislinski ostanek
ANOVA	analiza variance (ang. ANalysis Of VAriance)
AZ	aminokislinsko zaporedje
BLAST	orodje za ocenitev podobnosti zaporedij z lokalno poravnavo (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par (bazni pari)
CC	domena z obvito vijačnico (ang. Coiled Coil)
cM	centiMorgan
CNL	CC-NBS-LRR tip R genov
CTAB	cetil trimetilamonijev bromid
DArT	molekulski označevalec, temelječ na raznolikosti v izražanju na mikromreži; ang. Diversity Arrays Technology
dNTP	dideoksinukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EST	oznaka izraženega zaporedja (ang. Expressed Sequence Tag)
EST-RGA	na podlagi EST pripravljeni RGA
ETI	z efektorji spodbujena imunost (ang. Effector Triggered Immunity)
E/I	meja med intronom in eksonom
HR	hipersenzitivni odziv (ang. Hypersensitive Response)
LB	Luria Bertani gojišče
LOD	logaritem razmerja obetov (ang. Logarithm Of Odds)
LRR	z levcinskimi ponovitvami bogata regija (ang. Leucine Rich Repeat)
kb	kilobazni par (tisoč bp)
MAS	z MO podprta selekcija (ang. Marker Assisted Selection)
MO	molekulski označevalec (ang. marker)
NBS	vezavno mesto za nukleotid (ang. Nucleotide Binding Site)
NZ	nukleotidno zaporedje
PAMP	za patogen značilen molekulski motiv (ang. Pathogen Associated Molecular Pattern)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PGD	baza podatkov za genomiko rastlin (ang. Plant Genomics Database)
PTI	s PAMP spodbujena imunost (ang. PAMP Triggered Immunity)
QTL	lokus(i) kvantitativne lastnosti (ang. Quantitative Trait Loci)
RAPD	tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA (angl. Random Amplified Polymorphic DNA)
R gen	rastlinski odpornostni gen (ang. Resistance gene)
RGA	analogi odpornostnih genov (ang. Resistance Gene Analogs)
SAR	sistemska pridobljena imunost (ang. Systemic Acquired Immunity)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (ang. Single Nucleotide Polymorphism)
SSR	ponovitev enostavnega zaporedja, mikrosatelit (ang. Simple Sequence Repeat)

SZO	specifični začetni oligonukleotid (za TAIL-PCR)
TAIL-PCR	PCR za pridobivanje obstranskih zaporedij znane DNA regije (ang. Thermal Assymetric Interlaced PCR)
TIR	Toll-Interlevkin1 receptorju podobna domena (ang. Toll-Interleukin-1 receptor domain)
TNL	TIR-NBS-LRR tip R genov
Tris	trishidroksimetilaminometan
ZO	začetni oligonukleotid

SLOVARČEK

alel	ena od dveh (ali večih) oblik gena, pripadajoča istemu kromosomskemu lokusu
efektor	beljakovina, ki jo kodira nek virulenčni gen patogena, se izloča v rastlino in interagira z R geni le-te
ekson	del gena, ki ostane prisoten v zreli mRNA po procesu spajanja
elicitor	molekule patogena, ki izzovejo obrambni odziv gostitelja
filogenetsko drevo	diagram, ki prikazuje filogenijo študiranih taksonov, t.j. njihove sorodstvene odnose, določene z analizo podobnosti v fenotipskih lastnostih oz. podobnosti nukleotidnih zaporedij
gostitelj	rastlina, ki jo patogen napada in od katere le-ta pridobiva hranilne snovi
gostiteljska odpornost	odpornost, ki je posledica specifične prepoznavne patogena s strani gostitelja
homologi	zaporedja, ki so potomci istega predniškega zaporedja
intron	del gena, ki se izreže v procesu zlepljanja mRNA
kvalitativna odpornost	odpornost, pogojena z genom z velikim vplivom
kvantitativna odpornost	odpornost, ki jo podaja večje število genov z majhnim vplivom
locus	mesto gena na kromosomu, določeno glede na relativni vrstni red z drugimi geni
molekulski označevalec	del DNK, povezan z določenim mestom v genomu
monofilum	skupina na filogenetskem drevesu, ki združuje vse potomce nekega skupnega prednika
negostiteljska odpornost	odpornost, ki je posledica nezmožnosti okuževanja določene rastlinske vrste oz. linije s strani patogena
občutljivost	nezmožnost rastline, da prepreči škodljiv vpliv patogena nase
odpornost	zmožnost rastline, da prepreči škodljivi vpliv patogena nase
patogen	organizem, zmožen povzročiti obolelosti
PAMP	evolucijsko ohranjen del neke življenjsko pomembne molekule patogena, ki ga zaznavajo receptorji, vpleteni v odziv PTI
parazit	organizem, ki živi na drugem organizmu in od tega pridobiva hranilne snovi
psevdogen	neaktivno gensko zaporedje
segregacija	razporejanje alelov v potomstvu
soseska	množica nukleotidnih zaporedij, ki medsebojno prilegajo in omogočajo določitev t.i. skupnega zaporedja
toksin	spojina, ki jo izloča mikroorganizem in ki ima škodljiv vpliv na druge organizme
toleranca	zmožnost rastline, da prestopi vpliv bolezni z nezmanjšano rastjo oz. brez bistvene izgube pridelka.

1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) se prideluje zaradi zrelih ženskih socvetij, imenovanih storžki, v katerih so žleze, ki proizvajajo smole, eterična olja in polifenole (Neve, 1991). Večina pridelanega hmelja se uporabi v proizvodnji piva, v zadnjih letih pa potekajo raziskave tudi o možnosti uporabe v medicini (Stevens in Page, 2004). Slovenija je med vodilnimi pridelovalnimi državami hmelja v svetu, in sicer na šestem mestu s 1660 ha hmeljišč, kar predstavlja 3,1 % površine 15 vodilnih pridelovalk hmelja (FAOSTAT, 2009). Kar 90 % pridelanega hmelja se izvozi na tuje trge, zato ta predstavlja izredno pomemben izvozni artikel slovenskega kmetijstva (Čerenak in sod., 2010).

Ekonomsko najpomembnejše bolezni hmelja, ki znatno ovirajo proizvodnjo, so hmeljeva peronospora (*Pseudoperonospora humuli* Miyabe in Takahashi), hmeljeva pepelovka (*Podosphaera macularis* Braun) in hmeljeva uvelost (*Verticillium albo-atrum* Reinke in Berthold); (Radišek in sod., 2003; Mahaffee in sod., 2009). Med pomembnejše škodljivce hmelja pa prištevamo hmeljevo listno uš (*Phorodon humuli* Schrank), hmeljevo listno pršico (*Tetranychus urticae* Koch) in proseno večšo (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Dolinar in sod., 2002). Večino povzročiteljev bolezni in škodljivcev hmelja se uspešno omejuje s fitosanitarnimi pripravki in ukrepi, kar pa zaradi načina okužbe in trdovratnosti glive ni možno v primeru hmeljeve uvelosti (Fradin in Thomma, 2006). Gliva *Verticillium albo-atrum*, ki le-to povzroča, predstavlja pomembnega patogena v slovenskih hmeljiščih, kjer so se prvi izbruhi letalne oblike te glive pojavili leta 1997 (Radišek in sod., 2003). Edina možnost trajnega zagotavljanja pridelka v prizadetih hmeljiščih je sajenje na to bolezen odpornih hmeljnih kultivarjev. Na hmeljevo uvelost najbolj odporen kultivar je angleški kultivar 'Wye Target'. Poleg izrazite odpornosti na hmeljevo uvelost, tudi pri okužbah z letalnimi sevi, je zanj značilna tudi odpornost na patogena, ki povzroča pepelasto plesen (Radišek in sod., 2006). Kultivar torej predstavlja dober vir odporne dednine za nadaljnje procese žlahtnjenja novih kultivarjev v smeri odpornosti na obe pomembni bolezni.

Analize nukleotidnih zaporedij (NZ) in molekulske strukture do sedaj kloniranih rastlinskih odpornostnih genov (R genov, ang. resistance (R) genes) so pokazale, da številni vsebujejo podobne molekulske motive, čeprav omogočajo odpornost na različne patogene. Večina vsebuje z levcinom bogate ponovitve (LRR; ang. leucine rich repeats) in mesta prepoznavne nukleotidov (NBS, ang. nucleotide binding sites). Zraven obeh domen navadno vsebujejo še Toll/interleukin-1 receptorju podobno domeno (TIR), domeno z obvito vijačnico (CC; ang. coiled coil domain) ali domeno, ki vsebuje zaporedje WRKY (McHale in sod., 2006).

V okviru raziskovalnega programa Kmetijske rastline – genetika in sodobne tehnologije je bila na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu s križanjem kultivarja 'Wye Target' in divjega moškega hmelja BL2/1 pridobljeno potomstvo križanja za namene kartiranja, v kateri je 144 potomcev. Pri teh potomcih je bila v kontroliranih pogojih s ponovitvami fenotipsko ovrednotena stopnja odpornosti na verticilijevo uvelost (Jakše in sod., 2013). Ta lastnost v populaciji za kartiranje segregira, vendar ne v razmerju 1:1 (Darby, 2001), kar kaže na vpletenost vsaj dveh genskih lokusov v izražanje odpornosti. Za to populacijo je bilo proizvedenih 116 mikrosatelitnih in vsaj 200 AFLP molekulskih označevalcev, na podlagi katerih je bila izdelana genetska karta tega križanja (Jakše in

sod., 2013), ki je omogočila določitev ene regije genoma oz. kvantitativnega lokusa (QTL), povezanega z odpornostjo na hmeljevo uvelost. Z namenom doseganja boljše ločljivosti karte in usmerjenega ciljanja regij, kjer se nahajajo odpornostni geni, smo obstoječo karto želeli dopolniti z molekulskimi označevalci na podlagi t. i. analogov R genov (RGA, ang. R Gene Analogs), zasnovanih na podlagi iskanja za R gene značilnih domen v dostopnih oznakah izraženih zaporedij (EST, ang. Expressed Sequence Tags) z bioinformatičnimi metodami.

Genetski viri odpornosti na verticilijevo uvelost so poznani pri večih rastlinskih vrstah, vključno z lucerno (*Medicago sativa*), bombažem (*Gossypium hirsutum*), krompirjem (*Solanum tuberosum*), sončnico (*Helianthus annuus*) in paradižnikom (*Solanum lycopersicum*) (Fradin in sod., 2009). Pri paradižniku je bil izoliran in okarakteriziran lokus, na katerem se nahajata dva gena (Ve1 in Ve2). Le ta je neposredno odgovoren za razvoj odpornosti na verticilijevo uvelost (Kawchuk in sod., 2001). Nukleotidno zaporedje podobnega gena je bilo določeno tudi pri meti (Vining in Davis, 2009) in bombažu, pri katerem je bil gen tudi kloniran, s funkcijsko karakterizacijo pa je bila naknadno raziskana njegova vloga v prepoznavanju gliv rodu *Verticillium* (Zhang in sod., 2011, 2012). Glede na opisane izvirne rastline homologov Ve1 gena lahko predvidimo, da gre za zaporedje, ohranjeno pri širokem naboru rastlinskih vrst. Na podlagi NZ teh genov bi bilo s preiskovanjem baze EST hmelja možno odkriti potencialna delna zaporedja homologov Ve1 gena, torej kandidatnih odpornostnih genov za verticilijevo uvelost. S pomočjo molekularno bioloških postopkov za pridobitev obrobni (ang. flanking) zaporedij lahko posledično pridobimo celoten gen (Liu in sod., 1995; Vining in Davis, 2009), ki ga lahko testiramo v modelnem sistemu in s tem pokažemo oz. ovržemo njegovo vlogo v proučevanem procesu.

Cilji pričujoče raziskave so bili:

- S preiskovanjem nabora dostopnih hmeljnih EST zaporedij pridobiti čim večje število hmeljnih nukleotidnih zaporedij, ki predstavljajo potencialne kandidate za odpornostne (R gene).
- Na podlagi najdenih R genskih zaporedij proizvesti molekulske označevalce in jih ovrednotiti s kartiranjem na okvirno karto povezanosti.
- S pomočjo tehnike pridobivanja neznanih bočnih zaporedij pridobiti celotna zaporedja potencialnih hmeljnih Ve1 ortologov in jih bioinformatično okarakterizirati.
- Na podlagi pridobljenih zaporedij hmeljnih Ve1 ortologov proizvesti molekulske označevalce in jih dodati na okvirno karto povezanosti.
- Klonirati celotna kodirajoča zaporedja Ve1 homologov za namene nadaljnje funkcijske karakterizacije
- Pridobiti NZ hmeljnih Ve1 ortologov iz divjih akcesij hmelja, izvesti filogenetsko analizo in s tem določiti zemljepisni izvor Ve1 ortologov v kultivarju 'Wye Target'

Glavne predpostavke so bile sledeče:

- Predpostavljamo, da so hmeljni ortologi Ve1 gena odgovorni za odpornost hmeljnega kultivarja 'Wye Target' na hmeljne izolate glive *Verticillium albo-atrum*.

- Predvidevamo, da bo segregacija MO za vsaj enega od ortologov Ve1 hmelja pokazala povezanost z dedovanjem odpornosti v potomstvu križanja odpornega kultivarja.
- Odpornost pri 'Wye Target' izvira iz predniškega hmelja z ameriško dednino. Predvidevamo, da bomo v filogenetski analizi vsaj za tisti alel hmeljnega ortologa Ve1, ki je povezan s povišano odpornostjo potomstva, opazili združevanje v klad z NZ, pridobljenimi iz ameriških divjih hmeljev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ODKRIVANJE RASTLINSKIH GENOV ZA ODPORNOST

Rastline so stalno podvržene vrsti različnih bolezni, ki jih povzročajo zelo različni povzročitelji. Med temi prednjačijo na parazitizem na rastlinskih gostiteljih prilagojeni virusi, bakterije in glive. Pojav simptomov bolezni je pogojen z interakcijo rastline, patogena in okoljskih dejavnikov, kar imenujemo tudi bolezenski trikotnik (Agrios, 2005). Interakcije med rastlinami in na njih živečimi mikrobi so na molekularni ravni zelo kompleksne in kažejo na dolgotrajno koevolucijo obeh vpletenih strani (Dangl in Jones, 2001; Chisholm in sod., 2006). Patogeni se skladno s svojim genetskim potencialom prilagajajo na obrambne strategije gostitelja (McDonald in Linde, 2002). Mikrobo in druge organizme, ki so v fizičnem kontaktu z rastlino in tej odvzemajo makromolekule, imenujemo **paraziti**. Ti so navadno prilagojeni na določene vrste gostiteljskih rastlin (Agrios, 2005). Prilagoditev se kaže v sproščanju širokega repertoarja beljakovin, imenovanih **efektorji**, ki vplivajo na metabolizem tarčne rastline in parazitu omogočijo uspešno infekcijo (Stergiopoulos in de Wit, 2009; Ellis in sod., 2009). Tipični patogeni lahko sproščajo več sto različnih efektorjev. Parazite, ki povzročajo simptome bolezni, imenujemo **patogeni** (Agrios, 2005). Pojav bolezni je lahko posledica delovanja efektorskih beljakovin, lahko pa tudi obstranska posledica strategije okužbe patogena (Thomma in sod., 2011; Talboys, 1958b). Pri gostiteljskih rastlinah se je tekom evolucije razvil kompleksen večplasten sistem razločevanja med tujimi in lastnimi biomolekulami, ki do določene mere spominja na prirojeno imunost živali (Nürnberger in sod., 2004).

2.1.1 Odziv rastlin na okužbo s patogenom

Odziv rastline na okužbo je kompleksen proces. Na okužbo z določenim sevom patogena, ki mu je rastlina gostitelj, so možni trije odzivi (Robb in sod., 2007). Lahko pride do uspešne okužbe in prevlade patogena, kar imenujemo **občutljivost** (susceptibilnost). Gre za posledico **kompatibilne interakcije** med efektorskimi beljakovinami patogena in tarčnimi (oz. t.i. občutljivostnimi) beljakovinami gostiteljske rastline (Chisholm in sod., 2006; Toyoda in sod., 2002). Patogeni ob vzpostavitvi okužbe pogosto sproščajo tudi toksine (Möbius in Hertweck, 2009). Neuspešno okužbo sicer gostiteljske rastline s strani patogena imenujemo **odpornost** (rezistenca), ki je navadno posledica specifične prepoznavne molekul patogena s strani gostitelja (Jones in Dangl, 2006). V določenih primerih pride do vmesnega odziva, pri katerem se patogen lahko namnoži v rastlini do iste mere kot v občutljivi interakciji, a ne izzove simptomov okužbe oz. kljub okužbi omogoča nezmanjšan pridelek, kar imenujemo **toleranca** (Robb, 2007). Ta oblika odziva je lahko posledica tolikšne neobčutljivosti oz. aktivne obrambe rastline na glivne toksine, da se simptomi ne izrazijo. V večini primerov naj bi šlo za nepopolno odpornost, ki jo izzovejo podobni molekularni mehanizmi kot do konca izraženo odpornost (Thomma in sod., 2011; Robb, 2007).

Glede na prisotnost oz. odsotnost specifičnih interakcij gostitelj-patogen ločimo dva tipa odpornosti (Agrios 2005). Patogeni morajo za uspešno okužbo doseči aktiven vstop in namnožitev v rastlini, ki jim je kompatibilna in jo imenujemo **gostitelj**, drugih rastlin pa ne

okužujejo. Takšno interakcijo imenujemo **negostiteljska odpornost** (Schulze-Lefert in Panstruga, 2011). Pri tej interakciji do okužbe preprosto ne pride, in sicer zato, ker rastlina ni gostitelj in nima ustreznih tarč za efektorje danega patogena. Pri **gostiteljski odpornosti** do kompatibilnih interakcij med glivnimi efektorji in tarčnimi rastlinskimi občutljivostnimi geni pride, vendar zaradi specifične prepoznavne patogena pride tudi do odziva rastline na molekularnem nivoju in s tem posledično do dokončne preprečitve okužbe (Agrios, 2005). Glede na vzročne genetske mehanizme ločimo dva tipa odpornosti. **Kvantitativna odpornost**, imenovana tudi horizontalna oz. delna odpornost, je posledica delovanja velikega števila genov z majhnim učinkom, ki skupno omogočijo zadosten odziv rastline na invazijo patogena (Poland in sod., 2009). Na molekularnem nivoju je lahko posledica različnih mehanizmov, denimo izločanja različnih s patogenezo povezanih (PR, ang. Pathogenesis Related Proteins) beljakovin in navadno sočasne tvorbe učinkovitih morfoloških struktur za preprečevanje prodora patogena (Hématy in sod., 2009). Gre za izredno učinkovito odpornost, saj zahteva izjemno kompleksno prilagoditev patogena nanjo. Žal pa je zaradi kompleksnega dedovanja vnos tega tipa odpornosti v nove kultivarje izjemno zahteven (Poland in sod., 2009).

Kvalitativna oz. vertikalna odpornost je posledica specifične prepoznavne patogena s specializiranimi odpornostnimi geni (R geni v *sensu lato*; ang. resistance genes). Ti geni imajo navadno znaten učinek v razvoju odpornosti, saj lahko v določenih primerih že prisotnost enega dominantnega alela rastlini posreduje odpornost na določenega patogena, lahko pa gre za deljeno odpornost večih genov (Hammond-Kosack in Jones, 1997). Izoliranih in vključenih v žlahtnjenje novih kultivarjev različnih kmetijskih rastlin je že mnogo genov tega tipa (Gururani in sod., 2012).

2.1.2 Molekularno ozadje pojava kvalitativne odpornosti

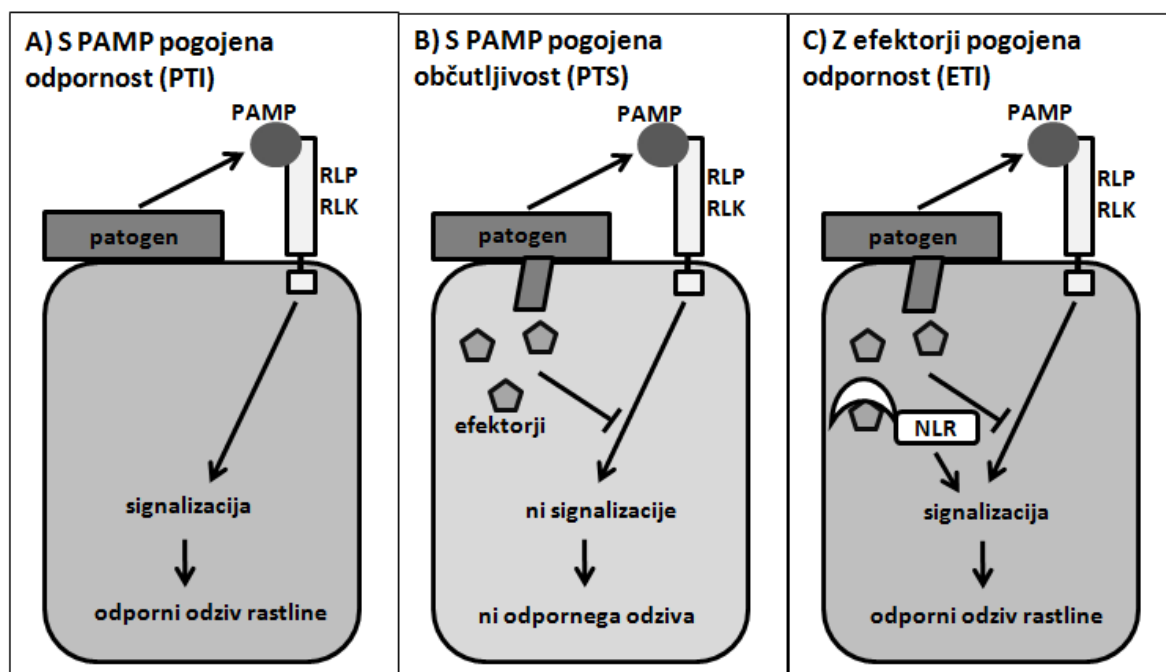
Na molekularni ravni je interakcija med rastlino-gostiteljem in patogenom prvi raziskoval Flor na lanu (Flor, 1941, cit. po Thomma in sod., 2011). Predvidel je, da pri odporni sorti lanu za prepoznavo glivnega efektorskega gena zadostuje en rastlinski R gen, in predpostavil, da pride do neposredne interakcije med obema. Nesposobnost okužbe je poimenoval **avirulenca**, gen za efektor, katerega beljakovinski produkt se veže na R gen, pa **avirulenčni gen (Avr)**. Ta pogled imenujemo **hipoteza gen za gen**. Do tovrstne interakcije prihaja pri večih poznanih parih Avr – R gen (Ackerveken in sod., 1992; De Wit in sod., 2009).

V izhodiščnih poskusih s prvimi kloniranimi pari Avr – R gen ni bila zaznana neposredna vezava njunih beljakovinskih produktov. Za pojasnitev, kaj se dejansko dogaja, je bila posledično predlagana **hipoteza stražarja** (van der Biezen in Jones, 1998). Ta hipoteza predvideva vplivanje Avr genov na strukturo določenih molekul (virulenčnih tarč) v rastlinski celici, R geni pa zaznavajo spremembo strukture tarčne molekule. Oba modela spadata pod okrilje hipoteze gen za gen, le molekularni mehanizem je različen.

Hipoteza gen za gen še vedno ne podaja pojasnila glede delovanja t.i. **elicitorjev**, t.j. molekul, ki same po sebi niso virulentne, a sprožajo imunski odziv (Bent in Mackey, 2007). Odkriti so bili tudi v membrano sidrani receptorji zanje, kot prvi FLS2, ki veže bakterijsko beljakovino flagelin (Gómez-Gómez in Boller, 2000; Zipfel in sod 2004).

Kmalu zatem so bili odkriti tudi mikrobní efektorji, ki funkcijo FLS2 onemogočajo in sprožajo občutljivost (Hauck in sod., 2003). Posledíčno je bil predlagan celovit pogled na rastlinsko imunost, imenovan **cikcak model** (ang. zigzag model; Jones in Dangl, 2006). Ta model predvideva delitev molekulskih interakcij med patogenom in gostiteljev v dve skupini glede na raven prepoznave. Na prvi ravni prihaja do prepoznave s patogeni povezanih molekulskih motivov (PAMP, ang. Pathogen Associated Molecular Patterns), ki predstavljajo pomembne, evolucijsko ohranjene motive, značilne za za preživetje nujne molekule patogena. Ta odziv imenujemo PTI (PAMP triggered immunity). Zanj skrbijo v membrano sidrani rastlinski receptorji (Monaghan in Zipfel, 2012). Za uspešno invazijo je nujno zatiranje PTI s strani patogena s sproščanjem t. i. efektorjev, ki na molekulski ravni preprečujejo signalizacijo in s tem preprečijo PTI (Jones in Dangl, 2006).

Kot odziv na sproščanje efektorjev s strani patogena se je po cikcak modelu razvil nov nivo prepoznave efektorjev, imenovan ETI (ang. Effector Triggered Immunity), ki predstavlja naslednjo raven prepoznave invazije s strani patogena. Gre za zelo specifično prepoznavo mikrobnih efektorjev, ki ponovno sproži signalizacijo v smeri obrambe proti parazitu. Ko raven prepoznave efektorjev doseže določen prag, se ponovno sproži obrambni odziv rastline in posledíčno pride do eliminacije patogena. Zatiranje ETI lahko spet poteka v nadaljnjih nivojih, z efektorji, ki preprečujejo ETI odziv (Jones in Dangl, 2006; Bent in Mackey, 2007). Efektorji navadno delujejo na znotrajcelíčne tarče, zato so v ETI vpleteni citoplazemski receptorji (DeYoung in Innes, 2006). Tipíčen patogen lahko nosi gene za širok nabor efektorjev, tudi po več 100, genomi rastlin pa lahko kodirajo številne različne receptorje za te efektorje (Chisholm in sod., 2006). Posamezni efektorji lahko napadajo več tarč, posamezni R geni pa lahko zaznajo tudi prisotnost različnih efektorjev določenih patogenov (Hogenhout in sod., 2009). PTI in ETI nista striktno ločena, obstaja določeno število primerov rastlinskih R genov, ki kažejo vmesni odziv med PTI in ETI, denimo receptorje, ki prepoznavajo efektorje, in citoplazemske efektorje, ki vežejo motive PAMP (Thomma in sod., 2011). Pogled na interakcije gostitelj-patogen, kot ga podaja cikcak model, je povzet v sliki 1.



Slika 1: Ponazoritev razvoja odporne interakcije med rastlinskim gostiteljem in njegovim patogenom, kot ga razlaga cikcak model (Jones in Dangl, 2006). A) Pri s PAMP pogojeni odpornosti (PTI) membranski receptorji tipa RLP oz. RLK zaznajo ohranjene molekule PAMP, ki jih izloča patogen, in sprožijo odziv gostitelja v smeri odpornosti. B) Kot odgovor na odziv gostitelja patogen sprošča efektorje, ki onemogočijo PTI. C) Na naslednji ravni odziva gostiteljeve citoplazemske odpornostne (R) beljakovine (NLR) prepoznajo efektorje patogena in sprožijo odziv v smeri odpornosti (prirejeno po Pieterse in sod., 2009).

Figure 1: A rendering of the development of a resistant plant host-pathogen interaction, as depicted under the zigzag model (Jones and Dangl, 2006). A) In PAMP triggered immunity, membrane spanning receptors, termed RLP and RLK, recognize conserved pathogen secreted molecules (termed PAMP) and initiate an immune response. B) To negate the immune response of the host, the pathogen secretes effectors, which inhibit host immunity. C) On the next level of host-pathogen interactions, cytoplasmatic R proteins (NLR) recognize the effectors secreted by the pathogen and initiate an immune response (adapted from Pieterse et al., 2009).

Posamezni razredi receptorjev za molekule patogenov imajo značilen način signalizacije znotraj celice, denimo preko z mitogenom povezanih beljakovinskih kinaz (MAPK), kalcijevih ionov in/ali signalizacije z inozin pirofosfatom (IPP). V posamezne signalne poti je vpletenih mnogo genov, ki tudi lahko predstavljajo tarče glivnih efektorjev (Jones in Dangl, 2006). Po zaznavi efektorja s strani R gena se navadno sproži hipersenzitiven odziv (HR; ang. hypersensitive response), t.j. propad celice, katere receptorji so zaznali tuj efektor. Po HR navadno pride do signalizacije s salicilno kislino (SA), jasmonsko kislino (JA) (Derksen in sod., 2013) in drugimi signali, denimo dušikovim oksidom (NO) (Leitner in sod., 2009). Ti signali v preostalem tkivu rastline povzročijo obrambno reakcijo, imenovano sistemska pridobljena odpornost (SAR, ang. systemic acquired resistance) (Shah in sod., 2009). Do hipersenzitivnega odziva ne pride nujno, lahko pride le do reprogramiranja izražanja genov v celici (Moore in sod., 2011).

2.1.2.1 S PAMP sproženo odpornost (PTI) omogočajo receptorji na celični membrani

V PTI so vpleteni v membrano sidrani rastlinski receptorji, za katere je v večini primerov značilna izvencelična LRR domena (eLRR) (Zipfel, 2009; Tör in sod., 2009). Zaradi ohranjenosti PAMP so lahko tudi receptorji zanje močno ohranjeni med vrstami, znani pa so primeri neodvisnega razvoja prepoznavne istega PAMP pri različnih vrstah. Delimo jih v dve skupini. Prvo predstavljajo t.i. receptorjem podobne kinaze (RLK, ang. Receptor Like Kinases), ki zraven eLRR domene na C-terminalnem, znotrajceličnem delu vsebujejo kinazno domeno, ki omogoča neposredno signalizacijo preko fosforilacije naslednjega nivoja signalnih beljakovin (De Smet in sod., 2009). Nadaljnja signalizacija poteka preko signalne verige z mitogenom aktiviranih proteinskih kinaz (MAP) (Pitzschke in sod., 2009), ki preko fosforilacije sebe in vsake naslednje ravni signalnih beljakovin signal z receptorja ojačajo in v končni fazi povežejo z izražanjem ustreznih rastlinskih genov, neposredno udeleženih v borbi proti infekciji. Nekatere RLK imajo vlogo izven prepoznavanja PAMP, denimo v prepoznavi rastlinskih hormonov (De Smet in sod., 2009). Znanih predstavnikov je relativno malo, med najboljše okarakterizirane pa spadata beljakovini repnjakovca FLS2 (Chinchilla in sod., 2006; Gómez-Gómez in Boller, 2000), ki prepoznava bakterijski flagelin (gradnik bičkov), in EFR (Zipfel in sod., 2006), ki prepoznava prokariotski dejavnik elongacije EF-Tu, ter HcrVf2 jablane (Belfanti in sod., 2004).

Drugo skupino PAMP receptorjev predstavljajo receptorjem podobne beljakovine (RLP, ang. Receptor Like Proteins) (Kruijt in sod., 2005a). Te namesto kinazne domene navadno na strani citoplazme vsebujejo podaljšano aminokislinsko zaporedje (AZ) z značilnimi endocitotskimi motivi. Podobno kot RLK so lahko tudi RLP vpleteni v fiziološke odzive izven imunosti (Tör in sod., 2009). Pri repnjakovcu je znanih denimo 57 predstavnikov te skupine (Wang in sod., 2008a). Najbolje okarakterizirani predstavniki so paradižnikovi geni Cf-2, Cf4 in Cf9 (Dixon in sod., 1996; Van der Hoorn 2000), EIX (Ron in Avni, 2004) in LepR3 (Larkan in sod., 2010). Sem spadajo tudi Ve1 homologi različnih rastlinskih vrst (Kawchuk in sod., 2001).

Za RLK in RLP je značilno, da so podobno kot PAMP, ki jih prepoznavajo, evlucijsko močno ohranjeni med vrstami, saj navadno podajajo življenjsko pomembne funkcije za rastlino. Tudi signalna kaskada je ohranjena, zato se lahko ta v določenih primerih obdrži celo po prenosu gena med kultivarji iste vrste (Belfanti in sod., 2004) in iz ene vrste v drugo (Lacombe in sod., 2010; Fradin in sod., 2011). Aleli teh PAMP receptorjev in njihova specifičnost sta v populacijah in kultiviranih linijah močno ohranjeni (Kruijt in sod., 2005b). Značilna je precejšnja variabilnost števila LRR motivov v LRR regiji (Tamura in Tachida, 2011), kar je bilo opaženo denimo za RLP Cf-2 pri divjem paradižniku (Caicedo, 2008).

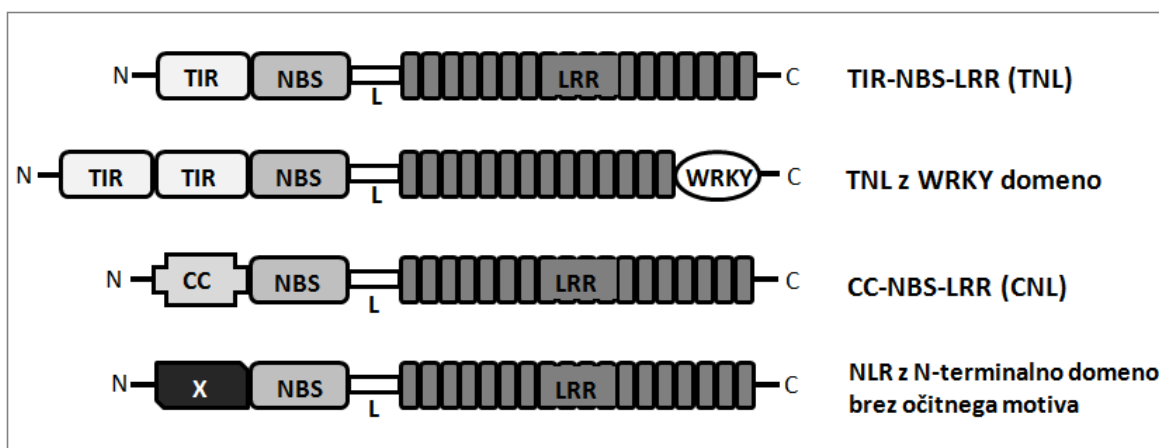
2.1.2.2 Z efektorji sproženo odpornost (ETI) omogočajo citoplazemske beljakovine

V ETI prepoznavna poteka popolnoma drugače. Zaradi visokega selekcijskega pritiska na efektorje, katerih izhodiščni geni lahko mutirajo oz. se efektorji celo prenehajo izražati, poteka hitra koevolucija z njim komplementarnimi rastlinskimi R geni. Paraziti efektorje navadno izločajo neposredno v citoplazmo gostiteljevih celic, zato jih prepoznavajo

citoplazemski receptorji. Takšni geni imajo sposobnost detekcije določenih rastlinskih patogenov, denimo virusov, gliv ali nematod (McHale in sod., 2006). Nekateri citoplazemski receptorji imajo vloge izven imunskega odziva, gre pa vedno za signalne beljakovine (Tameling in Joosten, 2007). V zadnjem času je bilo opaženo, da R geni v rastlinskih celicah niso omejeni na citoplazmo, temveč so prisotni tudi v drugih z membrano omejenih predelih celice (Qi in Innes, 2013).

V ETI udeleženi citoplazemski receptorji rastlin spadajo v obsežno skupino beljakovin, imenovano STAND (prenosu signala namenjene ATPaze s številnimi domenami; ang. Signal Transduction ATPases with Numerous Domains), ki je ohranjena med kraljestvi (Lukasik in Takken, 2009). Pri STAND živali se le signalizacijska N-terminalna domena razlikuje od tiste pri STAND rastlin (Ting in sod., 2008). Tovrstni citoplazemski receptorji imajo značilno domensko strukturo (slika 2). Večina jih ima na N-terminalnem koncu signalizacijsko domeno TIR (Toll-interlevkin-1 receptorska domena) ali pa CC (domena z obvito vijačnico; ang. Coiled Coil) (Takken in sod., 2006). V smeri proti C-terminusu beljakovine nato sledita domeni NBS (vezavno mesto nukleotida; ang. Nucleotide Binding Site), in regija z nizom LRR (z levcinom bogate ponovitve; ang. Leucine Rich Repeats). Slednja skrbi za specifično prepoznavo tujih efektorjev (Belkhadir in sod., 2004). Med domenama NBS in LRR je vmesna povezovalna domena ARC (za APAF-1, R beljakovine in CED-4 značilna domena; ang. APAF-1, R proteins, and CED-4 domain) (Lukasik in Takken, 2009). Po teh dveh domenah nosijo R geni tudi najbolj razširjeno ime, in sicer NBS-LRR receptorji (NLR). Po že omenjenih N-terminalnih domenah jih dodatno razvrščamo v dva večja razreda – TIR-NBS-LRR (TNL) in CC-NBS-LRR (CNL) beljakovine. Oba razreda imata praviloma ločeni vlogi v razvoju odpornosti in tudi ločeno pot signalizacije po zaznavi efektorja (McHale in sod., 2006). Nekateri TNL vsebujejo še WRKY domeno, značilno za dejavnike prepisovanja, in se lahko neposredno vežejo na DNA in sprožijo prepisovanje genov za odziv na patogenezo (McHale in sod., 2006). NLR receptorji lahko vežejo efektor (gen-za-gen), spremenjeno lastno beljakovino (hipoteza stražarja) ali pa kompleks obeh, kar imenujemo prepoznavna vabe in stikala (ang. bait and switch recognition), ki je značilna izključno za NBS-LRR gene (Dodds in Rathjen, 2010; Collier in Moffett, 2009).

Ob prepoznavi tarče pride do spremembe konformacije NLR, po kateri lahko ta deluje kot prepisovalni dejavnik v nadaljnjem odzivu (Caplan in sod., 2008). Za uspešno nadaljnjo signalizacijo je potrebna interakcija NLR z drugimi rastlinskimi beljakovinami. TNR razred denimo za uspešen odziv na prisotnost efektorjev potrebuje beljakovino EDS1 (Hu in sod., 2005), CNL razred pa beljakovino NDR1 (Eitas in Dangl, 2010).



Slika 2: Značilni razredi citoplazemskih R genov tipa NLR (NBS-LRR receptorji). TIR – Toll/Interleukin-1 domena; NBS – nukleotid vezavno mesto, L – povezovalni odsek, LRR – regija z z levcinom bogatimi ponovitvami, WRKY – domena, ki vsebuje zaporedje WRKY; N – N-terminus beljakovine; C – C-terminus beljakovine (prirejeno po McHale in sod., 2006)

Figure 2: Typical classes of cytoplasmic R genes of the NLR (NBS-LRR receptor) type. TIR – Toll/Interleukin-1 domain; NBS – nucleotide binding site; L – linker; LRR – leucine rich repeat containing region; WRKY – WRKY sequence containing domain; N – protein N-terminus; C – protein C-terminus (adapted from McHale et al., 2006)

NLR geni se navadno pojavljajo v gručah na posameznih genomskih odsekih, kar je posledica delnih (segmentalnih) in tandemskih duplikacij (McHale in sod., 2006). Zaradi različnih mehanizmov genetskih rekombinacij, manj pa zaradi mutacij, so lahko družine NBS-LRR genov zelo variabilne (McHale in sod., 2006). Večina NBS-LRR genov dvokaličnic pripada dvema velikima družinama, in sicer TIR-NBS-LRR in CC-NBS-LRR. Pri repnjakovcu vsaj 2/3 od približno 150 prisotnih TNL in CNL genov pripada skupno 43 gručam, preostali geni pa so v genomu razporejeni posamično (Meyers in sod., 2003). Pri topolu je NLR genov približno 400, pri čemer jih je 72 % razporejenih v 37 gruč (Kohler in sod., 2008). Pri rižu je v genomu prisotnih 480 NBS genov v 44 gručah, v tem primeru pa večina genov ne pripada TNL tipu (Zhou in sod., 2004). V gručah pogosto prihaja do rekombinacij med podobnimi geni na povezanih lokusih (Friedman in Baker, 2007). Pogosto pride do proliferacije gruč določenih sorodnih R genov in rekombinacije med pripadniki iste gruče (McDowell in Simon, 2006) s procesom tandemске duplikacije (Leister, 2004). Michelmores in Meyers (1998) sta proces nastanka raznolikosti R genov strnila v model procesa rojstva in smrti (Michelmores in Meyers, 1998). Težnja po duplikaciji funkcionalnih genov omogoča, da so po spremembi prepoznavnih mest na efektorju v populaciji še vedno prisotni aleli, ki novo obliko prepoznajo. Zraven tega lahko prihaja do selekcije ustreznih prepoznavnih mest, pretežno v LRR regiji, s kompleksnimi evolucijskimi procesi (Meyers in sod., 2005). Pri delujočih NLR genih je pogosto prisotna pozitivna selekcija, in sicer pretežno v ohranjenih domenah (Liao in sod., 2011).

Dobro proučen R gen tipa NLR je RPM1 repnjakovca, ki kodira R gen tipa CLR za odpornost proti *Pseudomonas syringae* (Stahl in sod., 1999). Citoplazemski efektorji so evolucijsko slabše ohranjeni, zato se specifičnost za iste efekte pri različnih vrstah navadno razvije večkrat neodvisno in ni posledica ohranjenih ortologov (McDowell, 2004; Jacob in sod., 2013). To velja tudi za RPM1, ki pri repnjakovcu in soji kljub isti specifičnosti in imenu predstavlja gena z različnim izvorom (Ashfield in sod., 2004). Drug gen s specifičnostjo za isti efektor kot RPM je bil najden tudi pri fižolu (Chen in sod.,

2010). Tudi specifičnost in pot signalizacije NLR gena Mla, ki je odgovoren za odpornost na pepelovko, je med ječmenom in repnjakovcem ohranjena (Maekawa in sod., 2012).

2.1.2.3 Izolacija R genov

R geni predstavljajo senzorje za patogene in so pomembni genski lokusi za žlahtnjenje rastlin za odpornost na bolezni (Hammond-Kosack in Parker, 2003). Posamezni R geni v kultivirani dednini vršijo visok selekcijski pritisk na patogene, ki jim lahko s selekcijo efektorjev hitro ubežijo (McDowell in Woffenden, 2003). Delujoče R gene lahko v neodporno dednino vnesemo z genskimi transformacijami ali z introgresijo iz odpornih kultivarjev ali divjih sorodnikov (Dangl in sod., 2013). Zaželeno je t.i. piramidenje genov, pri katerem kultivarje žlahtnimo na več delujočih R genov, kar pa zahteva zahtevne postopke odbire rastlin (Boyd in sod., 2012). Za uspešno piramidenje potrebujemo moderne pristope s **selekcijo ob pomoči molekulskih označevalcev (MAS)**; ang. Marker Assisted Selection), ki zahteva bodisi dostopnost znatnega števila molekulskih označevalcev (MO) (Collard in Mackill, 2008), ali pa zadostnega števila MO, vezanih z lokusom R gena (Valkonen in sod., 2008). Ob dostopnosti genomskih podatkov je razvoj MO enostaven (Xu in sod., 2012), razvite pa so pa bile tudi kompleksne selekcijske sheme, ki naenkrat uporabljajo veliko število MO širom genoma (Varshney in sod., 2012).

Pri manj pomembnih rastlinskih vrstah s slabše okarakteriziranimi genomi je razvoj MO zahtevnejši, saj že proizvedeni MO in celo uporabni nabori nukleotidnih zaporedij za razvoj MO navadno niso na voljo (Xu in Crouch, 2008). Pri takšnih vrstah, kamor spada tudi hmelj, je potrebno uporabiti strategijo neposredne izolacije R genov iz dostopne dednine s tehnikami, osnovanimi na verižni reakciji s polimerazo (PCR, ang. polymerase chain reaction; Leister in sod., 1996). Na ta način izolirane gene navadno imenujemo **analogi R genov (RGA)**, ang. R gene analogs). Postopek izolacije navadno temelji na pomnoževanju regij med ohranjenimi domenami R genov, kar imenujemo RGA profiliranje (Leister in sod., 1996; Fourmann in sod., 2001). V kolikor so na voljo populacije križanj in karte povezanosti, pridobljene s križanjem staršev z odporno dednino, lahko identificiramo MO, **genetsko vezane** na določen tip odpornosti (Jakše in sod., 2013). Tretja možnost pridobivanja z odpornostjo povezanih MO je preiskovanje redkih dostopnih nukleotidnih zaporedij z bioinformatскими pristopi (Dilbirligi in Gill, 2003). To imenujemo **metoda kandidatnega gena**. Slednjega določimo na podlagi podobnosti s homologi z znano funkcijo v sorodnih rastlinskih vrstah (Pflieger in sod., 2001). Pogost je postopek določanja RGA v naborih oznak izraženega zaporedja (EST) (Gupta in Rustgi, 2004; Nagaraj in sod., 2006). Dobljena zaporedja lahko poimenujemo EST-RGA (Rossi in sod., 2003; Park in sod., 2012). V kolikor se odločimo za ta pristop je nujno, da čimbolj povečamo verjetnost pomnožitve produkta v PCR. Za ta namen je, v kolikor pomnožujemo iz genske DNA, nujna predhodna določitev mesta mej med introni in eksoni v zaporedju (Feltus in sod., 2006), kar lahko drastično poveča uspeh razvoja MO s pravilno umestitvijo začetnih oligonukletodidov (ZO), hkrati pa vključevanje intronov v amplikone poveča pogostnost odkritih polimorfizmov (Li in sod., 2012; Wei in sod., 2005). Introni so navadno pod manjšim selekcijskim pritiskom in posledično vsebujejo večje število polimorfizmov kot eksoni (Wei in sod., 2005), zato so priljubljena tarča za razvoj MO (De Keyser in sod., 2009; Wang in sod., 2010a). Zraven polimorfizmov introni na ravni NZ pogosto izkazujejo dolžinske polimorfizme, kar lahko bistveno poceni razvoj MO in s

tehničnega vidika olajša njihovo detekcijo (Wei in sod., 2005). Na voljo je tudi baza anotiranih intronov z znanimi polimorfizmi, uporabna v ta namen (Yang in sod., 2007). Z določitvijo meje med introni in eksoni so bili do danes proizvedeni EST-RGA za koruzo in pšenico (Liu in sod., 2012; Shang in sod., 2010).

Pri hmelju je že bilo izvedeno RGA profiliranje, v katerem je bilo odkritih 17 skupin RGA (Kozjak in sod., 2009). Proizvedena sta bila dva MO, ki sta segregirala za družino križanja, v kateri segregira odpornost na hmeljevo uvelost. Kmalu zatem so transkriptomski projekti omogočili prost dostop do okrog 10.000 hmeljnih EST (Nagel in sod., 2008; Wang in sod., 2008b), ki predstavljajo atraktivno zbirko za izvedbo iskanja EST-RGA s pristopom kandidatnega gena, ki je bilo ena od nalog te disertacije.

2.2 HMELJ

Navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.) je avtohton izključno za zmerni pas severne zemeljske poloble. Spada v rod *Humulus*, ki skupaj s sestrskim rodом *Cannabis* tvori družino konopljev (Cannabaceae), ki spada v red šipkovcev (Rosales). Hmelj in konoplja sta si genetsko zelo podobna (Pillay in Kenny, 2006). Konoplja ima podobne žlezne trihome kot hmelj, sekundarni metaboliti pa se v teh žlezah sintetizirajo v podobnih encimatskih reakcijah (Flores-Sanchez in Verpoorte, 2008). V rod *Humulus* spadata še japonski hmelj (*H. japonicus*, sinonim *H. scandens*) in kitajski hmelj (*H. yunnanensis*). Do evolucijskega razcepa linij *H. lupulus* in *H. japonicus* naj bi prišlo pred 1,1 milijona let (Chen in sod., 2012). Vse tri vrste hmelja so prisotne na Kitajskem, ki velja za center izvora rodu (Neve, 1991).

Vrsto *H. lupulus* delimo na pet podvrst, in sicer evropsko, japonsko in tri ameriške (Small, 1978; cit. po Neve, 1991). Evropski hmelj *H. lupulus* var. *lupulus* je avtohton v Evraziji in predstavlja vir dednine večine danes gojenih kultivarjev. Na Ameriškem kontinentu obstajajo tri značilne ločene populacije oz. podvrste divjega hmelja. Na zahodu ZDA prevladuje *H. lupulus* var. *neomexicanus*, na srednjem zahodu najdemo *H. lupulus* var. *pubescens*, v vzhodnem delu ZDA pa *H. lupulus* var. *lupuloides*. Japonsko podvrsto *H. lupulus* var. *japonicus* najdemo na Japonskem in Kitajskem. Slednja je potencialno zanimiva za žlahtnjenje, saj določene akcesije nosijo vir odpornosti na škodljivca hmeljevo listno uš. Filogenetsko gre za tri ločene skupine (Murakami, 2001), ameriške ter japonska podvrsta pa naj bi si bili bolj sorodni, kot vsaka od obeh z evropsko podvrsto.

Hmelj je zelnata trajnica. Iz podzemnega stebila izraščajo korenine, ki dosežejo do 1,5 m v globino in do 3 m v bočni smeri (Neve, 1991). Spomladi iz podzemnega dela rastline odžene veliko število poganjkov, ki jih je ob kultivaciji potrebno redčiti. Razmnoževanje kultivarjev hmelja je klonsko, tradicionalno pa poteka preko potaknjencev, pridobljenih iz zakopanih poganjkov. Poganjki se vzpenjajo ob opori z ovijanjem stebila (imenovanega tudi trta oz. rozga) s pomočjo stebelnih izrastkov. Trta lahko ob opori zraste 7-9 m v višino (Mahaffee in sod., 2009). Oporo v hmeljiščih predstavljajo hmeljne žičnice, v divjini pa debla in veje listopadnih dreves (Reeves in Richards, 2011).

Hmelj je dvodomna tujeprašna vetrocvetka. Rastline obeh spolov ločimo le po cvetovih. Redko lahko v nasadih najdemo tudi dvospolne triploidne rastline (Škof in sod., 2012).

Tržno pomembna so le ženska socvetja, ki predvsem na braktih in braktejah tvorijo številne žlezne trihome, imenovane lupulinske žleze. Osemenitev ženskih cvetov zmanjšuje število in produktivnost teh žlez, zato pridelovalci moške rastline navadno sproti odstranijo iz bližine hmeljišč (Neve, 1991). V lupulinskih žlezah tekom zorenja nastaja smola, imenovana lupulin. V lupulinu je preko 1.000 različnih sekundarnih metabolitov, zaradi katerih so hmeljni storžki uporabni v pivovarstvu, določeno vrednost pa imajo tudi za farmacevtsko industrijo (Goese in sod., 1999). Za pivovarstvo so najpomembnejše hmeljne smole in eterična olja.

Hmeljne smole tradicionalno delimo na mehke (topne v heksanu) in trde. Od mehkih smol imajo največjo pivovarsko vrednost alfa-kisline (humulon in analogi) (Moir, 2000). Med varjenjem piva se izomerizirajo v izo- alfa-kisline, ki dajejo pivu grenčico. Manjšega pomena so beta-kisline, ki delujejo protimikrobno (Srinivasan in sod., 2004).

Eterična olja sestavljajo spojine, ki nastanejo v terpenoidni metabolni poti in povečini pripadajo monoterpenom in seskviterpenom (Neve, 1991). Te spojine dajejo pivu aromo. Celokupna vsebnost in razmerje posameznih komponent eteričnih olj in s tem aroma sta značilni za posamezne kultivarje hmelja in odvisni od pogojev med zorenjem in časa obiranja. Trije terpenoidi – mircen, humulen in alfa-kariofilen - so večinoma prisotni v visokem deležu (Moir, 2000).

Glavnino pivovarske vrednosti dajejo posamezne komponente humulena ter njihovi oksigenirani produkti. Oksigenirani produkti beta-kislin imajo denimo določeno manjšo vrednost za zaznavanje grenčice. Hmeljne kultivarje glede na količino alfa-kislin delimo na aromatične (do 7 %), grenčične (od 7 % do 13 %) in visoko grenčične kultivarje (nad 13 %; Neve, 1991). T.i. aromatični kultivarji vsebujejo največ eteričnih olj, pa tudi beta kislin glede na količino alfa kislin. Obstajajo tudi t.i. dvojnonamenski (ang. dual purpose) kultivarji, ki imajo mnogo grenčic in značilno, močno aromo (Darby, 2007).

V lupulinu je tudi majhen delež (nekaj %) trdih smol, katerih najpomembnejše sestavine so halkanoidi in flavonoidi. Mednje spadajo nekatere farmakološko aktivne spojine s potencialom za farmacevtsko industrijo (Stevens in Page, 2004; Chadwick in sod., 2006). Hmelj vsebuje več prenilflavonoidnih fitoestrogenov (Milligan in sod., 2000). Najpomembnejši med temi je 8-prenilnaringenin. Ta je najmočnejši znani fitoestrogen, katerega uporabnost se preizkuša tudi v zdravstvene namene (Milligan in sod., 2002).

Ksantohumol deluje protitumorsko (Gerhäuser in sod., 2002), pa tudi protimikrobno (Gerhäuser, 2005). Študije na miših so pokazale, da vnos v organizem najverjetneje ne predstavlja tveganja (Dorn in sod., 2010), torej gre za možno tržno pomembno farmacevtsko učinkovino. Vsebnost ksantohumola predstavlja celo pomemben žlahtniteljski cilj (Darby in sod., 2003).

Genetika in encimatika hmeljnih učinkovin sta dobro raziskani. Za ključni gen v sintezi mehkih smol je bila določena valerofenonska sintaza (VPS), ki je bila uspešno klonirana (Castro in sod., 2008). V genomu hmelja je VPS prisotna v številnih kopijah (Novák in sod., 2003). Halkonske sintaze, ki so ključne za sintezo farmakološko aktivnih prenilflavonoidov, predstavljajo pri hmelju nasploh izredno razširjeno družino genov

(Novák in sod., 2006). Več halkonskih sintaz je že bilo kloniranih in okarakteriziranih (Okada in sod., 2004).

Gojeni hmelj se za potrebe pivovarstva vzgaja že od 9. stoletja (Behre, 1999). V letu 2010 je bilo v svetu okrog 50.000 hektarjev zasajenih s hmeljem, skupna proizvodnja hmeljnih storžkov pa je bila okrog 100.000 ton (IHGC, 2011). V Sloveniji in svetu skupna površina hmeljišč upada, predvsem zaradi uvajanja visoko produktivnih visoko grenčičnih kultivarjev, nekoliko pa tudi zaradi okuženosti zemljišč z gospodarsko pomembnimi patogeni. Za posamezne svetovne pridelovalne regije so značilni lokalno vzgojeni kultivarji, ki so plod žlahtniteljskih programov z raziskovalnimi centri v samih pridelovalnih regijah, saj sta pridelek hmelja in aroma hmelja odvisna od rastišča. V Sloveniji gojimo povečini lokalno požlahtnjene kultivarje (npr. 'Aurora', 'Celeia') in prilagojeni angleški kultivar ('Savinjski Golding'). V zadnjem času je v Sloveniji prisotno v manjši meri tudi gojenje grenčičnega kultivarja 'Hallertauer Magnum', ki je tudi vključen v žlahtniteljski program (Čerenak in sod., 2010).

V večjih pridelovalnih regijah hmelja širom sveta so locirani nacionalni hmeljarski inštituti z lastnimi žlahtniteljskimi cilji, prilagojeni lokalnemu okolju (Čerenak in sod., 2004). Pomembnejši tovrstni inštituti so denimo locirani v kraju Hüll v Bavarskem pridelovalnem območju Hallertau, v kraju Žatec v istoimenskem pridelovalnem območju (Žatečko) na Češkem, in v Žalcu v Spodnji Savinjski dolini. Klasični aromatični kultivarji hmelja so nastali z odbiro divjih akcesij hmelja pred in v 19. stoletju, že v začetku 20. stoletja pa so bili uvedeni žlahtniteljski programi za ciljno žlahtnjenje s križanjem (Neve, 1991). Žlahtnjenje je bilo izhodiščno usmerjeno v izboljševanje arome hmelja, nato v povečevanje odpornosti na bolezni in škodljivce, še kasneje pa v povečevanje vsebnosti grenčic. V zadnjem času med cilje spada tudi nižanje višine hmelja in vzgoja kultivarjev z raznolikimi aromami ter vsebnostjo določenih spojin s farmakološko vrednostjo (Darby in sod., 2003). Žlahtnjenje hmelja je zahtevno in dolgotrajno, zaradi počasnega pridobivanja podatkov o lastnostih na novo vzgojenih kultivarjev lahko traja desetletje ali več in poteka v ciklih odbire sejančkov (Čerenak in sod., 2010).

Žlahtniteljske sheme predvidevajo malo križanj in več natančne izbire staršev. Za mater se navadno vzame kultivar, katerega lastnosti so zaželeno v novih kultivarjih. Oče je navadno divja akcesija hmelja ali žlahtniteljska linija, za katero so znane dobre lastnosti potomcev, zaznane v uspešnih poskusih križanja. Nekateri kultivarji so bili vzgojeni tudi z odprto oprašitvijo z okoliškimi divjimi hmelji. V zadnjem času uvedba biotehnološki metod, med katerimi prednjači razvoj molekulskih označevalcev (MO), omogoča hitrejše in bolj ciljano žlahtnjenje (Čerenak in sod., 2004). V ta namen so bila na IHPS v Žalcu za namen vzgoje izboljšanih kultivarjev hmelja izvedena številna križanja kultivarjev z zaželeno vsebnostjo alfa-kislin (kultivar 'Hallertauer Magnum'), ter z odpornostmi na pomembne bolezni (kultivar 'Wye Target') in škodljivce (hmeljno uš - kultivar 'Cascade') (Čerenak in sod., 2001). Žlahtnjenje hmeljnih kultivarjev je zamuden in dolgotrajen proces, ki ga lahko pospeši že opisana strategija MAS, ki zahteva dostopnost velikih koločin genetskih molekulskih označevalcev (MO), ali pa MO, vezanih na željeno lastnost (Collard in MacKill, 2008). V zadnjem času so v Sloveniji glavni žlahtniteljski cilji povišanje vsebnosti alfa-kislin, ohranjanje arome in izboljšanje odpornosti na bolezni, predvsem hmeljevo uvelost (Čerenak in sod., 2010).

2.2.1 Genetske raziskave hmelja

Diploidni genom hmelja vsebuje okrog 6 pg DNA v diploidnem stanju (Grabowska-Joachimciak in sod., 2006), kar predstavlja velikost genoma 3×10^9 bp v haploidnem stanju in je primerljivo z velikostjo človeškega ali koruznega genoma. Ima skupno 10 kromosomov, od tega par spolnih (Jacobsen, 1957). Spolni kromosomi se zlahka ločijo po citološkem barvanju (Karlov in sod., 2003; Divashuk in sod., 2011). Novi kultivarji se vzgajajo predvsem s klasičnim žlahtnjenjem, razviti pa so bili tudi biotehnološki pristopi pomnoževanja poganjkov v tkivni kulturi (Roy in sod., 2001) ter metode vnosa transgenov v hmelj za preučevanje izražanja izbranih genov (Horlemann in sod., 2003; Gatica-Arias in sod., 2012; Gatica-Arias in sod., 2013).

Genetske študije hmelja so usmerjene skoraj izključno v raziskovanje metabolnih poti sekundarnih metabolitov ter določevanje genetskih mehanizmov, ki vplivajo na agronomske parametre pridelka ter razvoj odpornosti na bolezni in škodljivce. Za hmelj je na voljo že večje število raznovrstnih MO. Prvotno so bili proizvedeni MO tipov RAPD (Pillay in Kenny, 1996; Šuštar-Vozlič in Javornik, 1999; Patzak, 2001), AFLP (Hartl in Seefelder, 1998; Seefelder in sod., 2000a; Jakše in sod., 2001) ter mikrosatelitni MO, izolirani s selektivno hibridizacijo (Jakše in Javornik, 2001; Štajner in sod., 2005). Proizvedeni so bili tudi MO za označena zaporedja (STS; ang. Sequence Tagged Sites), dobljeni na podlagi zaporedij izoliranih genov (Patzak in sod., 2007), ter ISSR MO, ki predstavljajo pomnožene regije med mikrosateliti (Danilova in Karlov, 2006). Z RGA profiliranjem pa so bili proizvedeni tudi že omenjeni RGA MO (Kozjak in sod., 2009).

Prva dva večja transkriptomski projekta (Nagel in sod., 2008; Wang in sod., 2008b) sta v javno dostopne baze prispevala preko 25.000 posameznih EST zaporedij, ki so bila združena v 9.789 sosesk. EST predstavljajo koristno orodje za odkrivanje kandidatnih genov s pomočjo funkcijske ali primerjalne genomike in razvoj MO z namenom genskega kartiranja (Nagaraj in sod., 2006). Nedaven transkriptomski projekt z namenom analize encimov, ki sodelujejo v sintezi mehkih smol, je doprinesel dodatne dostopne EST, ki pa so bili proizvedeni s tehnologijo pridobivanja NZ naslednje generacije (Clark in sod., 2013).

Po objavi transkriptomskih podatkov so bili na osnovi zaporedij EST proizvedeni številni novi mikrosateliti (Jakše in sod., 2008a; Jakše in sod., 2011; Koelling in sod., 2012). Najmodernejšo tehnologijo MO za hmelj predstavljajo MO tipa DArT (ang. Diversity Arrays Technology), ki so bili pripravljeni z obogatitveno knjižnico in analizirani z na osnovi polimorfizmov pripravljeno mikromrežo (Howard in sod., 2011).

MO se uporabljajo za genotipizacijo in študije genetske strukture kultivarjev, filogenetske analize divjih akcesij in genetsko kartiranje. Pomembno panogo genetskih raziskav predstavljajo analize genetske strukture kultivarjev hmelja, saj slednja predstavlja nedvoumen ključ za razločevanje med genotipi (Jakše in sod., 2004; Štajner in sod., 2008). Mnogo študij se ukvarja z razlikovanjem strukture ameriške in evropske dednine v hmeljnih kultivarjih, povečini z analizo mikrosatelitnih lokusov (Bassil in sod., 2008; Peredo in sod., 2010) ter z MO tipa DArT (Howard in sod., 2011). Študije raznolikosti

divjih akcesij hmelja se tudi izvajajo z izvrednotenem mikrosatelitnih lokusov (Murakami in sod., 2006; Patzak in sod., 2010a; Patzak in sod., 2010b).

Za posamezne družine križanja hmelja je bilo pripravljenih že več genetskih kart. Prvo so pripravili Seefelder in sod. (2000b) na podlagi AFLP, RAPD in mikrosatelitov. Genetske karte hmelja so že bile uspešno uporabljene za kartiranje kvantitativnih lastnosti (QTL, angleško Quantitative Trait Loci). Prednjačijo raziskave hektarskega donosa in vsebnosti kemijskih komponent. Koie in sod. (2005) so na genetski karti križanja kultivarja Chinook in moškega divjega hmelja SaM določili 12 lokusov QTL za vsebnosti različnih kemijskih komponent v hmeljnih storžkih. Čerenak in sod. (2006) so na genetski karti družine 'Hallertauer Magnum' x BL2/1, sestoječi iz 96 MO na 12 skupinah povezanosti skupne dolžine 662 cM, identificirali štiri lokuse kvantitativnih lastnosti za vsebnost alfa-kislin, kasneje pa isto karto razširili na skupno 199 MO in uspešno kartirali 9 QTL za agronomske lastnosti hmelja (Čerenak in sod., 2009). McAdam in sod. (2013) so za dve križanji pripravili genetski karti z analizo vezave MO tipa DArT, na kateri so uspešno kartirali QTL za spol in vsebnost različnih komponent arome in okusa.

Kljub velikemu številu dostopnih MO se MAS izvaja v zelo omejenem obsegu. Z MO se rutinsko določa le spol rastline z namenom izločanja moških sejancov, kar omogoča dostopnost večih na spol vezanih MO (Polley in sod., 1997; Jakše in sod., 2008b; McAdam in sod., 2013). Obeta se uporaba MAS tudi za žlahtnjenje v smeri izboljšanja okusa in agronomskih lastnosti, v zadnjem času pa tudi za odpornost na bolezni. Na podlagi karte, sestoječe iz MO tipa DArT, je bil določen QTL za občutljivost na pepelasto plesen (Henning in sod., 2011). Za genetsko karto potomstva na hmeljevo uvelost odpornega kultivarja 'Wye Target' pa je bil odkrit QTL, ki pojasni približno 40 % variabilnosti pri potomcih. Na ta QTL vezani MO predstavljajo dobre kandidatne MO za določanje odpornosti na obe bolezni pri sejancih (Jakše in sod., 2013).

2.2.2 Bolezni hmelja

Kultiviran hmelj je zelo občutljiv na ekološke razmere. Pridelek je denimo zelo odvisen od vremena v vegetacijskem obdobju, ki nenazadnje vpliva na obseg določenih glivnih obolenj v hmeljiščih. Posamezni kultivarji so tudi zelo prilagojeni na določene regije (podnebje, prst, dolžina dneva) in ob prenosu na drugo območje uspevajo bistveno drugače kot v regiji izvora (Neve, 1991). Hmelj napadajo številni škodljivci in paraziti, ki povzročajo različne bolezni. V svetovnem merilu in tudi v Sloveniji je gospodarsko najpomembnejši škodljivec hmeljeva listna uš, pomembna škodljivca pa sta tudi hmeljeva listna pršica ter prosena vešča. Znanih je tudi nekaj za hmelj patogenih virusov in viroidov (Pethybridge in sod., 2008). Slednji povzročajo večjo škodo, zato je smotrna vzgoja brezviroidnih rastlin z biotehnološkimi pristopi. Najpomembnejše bolezni so glivne ter oomicetne bolezni, med katerimi prednjačijo pepelasta plesen, hmeljeva peronospora in hmeljeva uvelost (Mahaffee in sod., 2009; Dolinar in sod., 2002).

Hmeljeva listna uš (*Phorodon humuli* Schrank) je resen škodljivec, zmožen popolnega uničenja pridelka v ustreznih pogojih in ob neustreznih ukrepih. Škodljivec poškoduje hmeljne storžke in jim zmanjša tržno vrednost, je pa tudi prenašalec virusnih bolezni. Prezimi na drevesih rodu *Prunus*, med vegetacijsko dobo pa preleti na hmelj, kjer lahko tvori goste populacije (Mahaffee in sod., 2009). Nadzor hmeljne uši se izvaja s

fitofarmaceutskimi sredstvi, številčnost populacij tega škodljivca pa uspešno zmanjšujejo tudi naravni plenilci (Lorenzana in sod., 2010). Znana je akcesija japonskega hmelja, ki nosi vir predvidoma kvantitativne odpornosti in je vključena v žlahtnjenje (Darby, 2001), za lastnost pa je bilo zaznanih tudi 7 diferencialnih AFLP fragmentov, vezanih na dedovanje odpornosti (Čerenak in sod., 2001). Odpornost je bila odkrita pri japonski akcesiji INT1 in je pogojena z enim ali morebiti dvema dominantnima genom (Darby, 2009).

Hmeljeva listna pršica (*Tetranychus urticae* Koch) povzroča poškodbe na listih in storžkih. Ličinke in odrasle pršice se lahko pojavljajo v izredno velikem številu, prehranjujejo pa se s sesanjem ratlinskih sokov. Močnejše poškodovani listi in storžki se posušijo, kar ima za posledico pridelek slabše kakovosti. Škodljivca lahko uspešno zatiramo z insekticidi (Dolinar in sod., 2002; Mahaffee in sod., 2009).

Pomembno škodo lahko v hmeljiščih povzroči tudi prosena večča (*Ostrinia nubilalis* Hübner), ki je sicer bolj znana kot škodljivec koruze. Ličinka prosene večče se zavrti v trto in napravi rov, s čimer poškoduje prevodno tkivo in onemogoča transport vode v rastlini. Predvsem v sezonah, ko nastopi suša, lahko pojav prosene večče v hmeljiščih povzroči preveč obsežno sušenje rastlin. Proseno veččo se v hmeljiščih uspešno zatira s herbicidi, dodaten ukrep pa predstavlja uničevanje ostankov koruznice in hmeljevine pred sezono rasti hmelja (Dolinar in sod., 2002).

Hmeljeva peronospora je prisotna v večini nasadov in naj bi bila avtohtona za vse svetovne pridelovalne regije severne poloble. Povzroča jo oomiceta *Pseudoperonospora humuli* (Mahaffee in sod., 2009). Resne oblike bolezni so bile opažene v začetku 20. stoletja. L. 1926 je denimo na Bavarskem opustošila 60 % hmeljišč (Neve, 1991). Genetika odpornosti proti tej bolezni je slabo poznana, saj je za odpornost v tem primeru značilno poligensko dedovanje. Žlahtnjenje zato poteka z neposrednim določanjem odpornosti sejančkov (Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

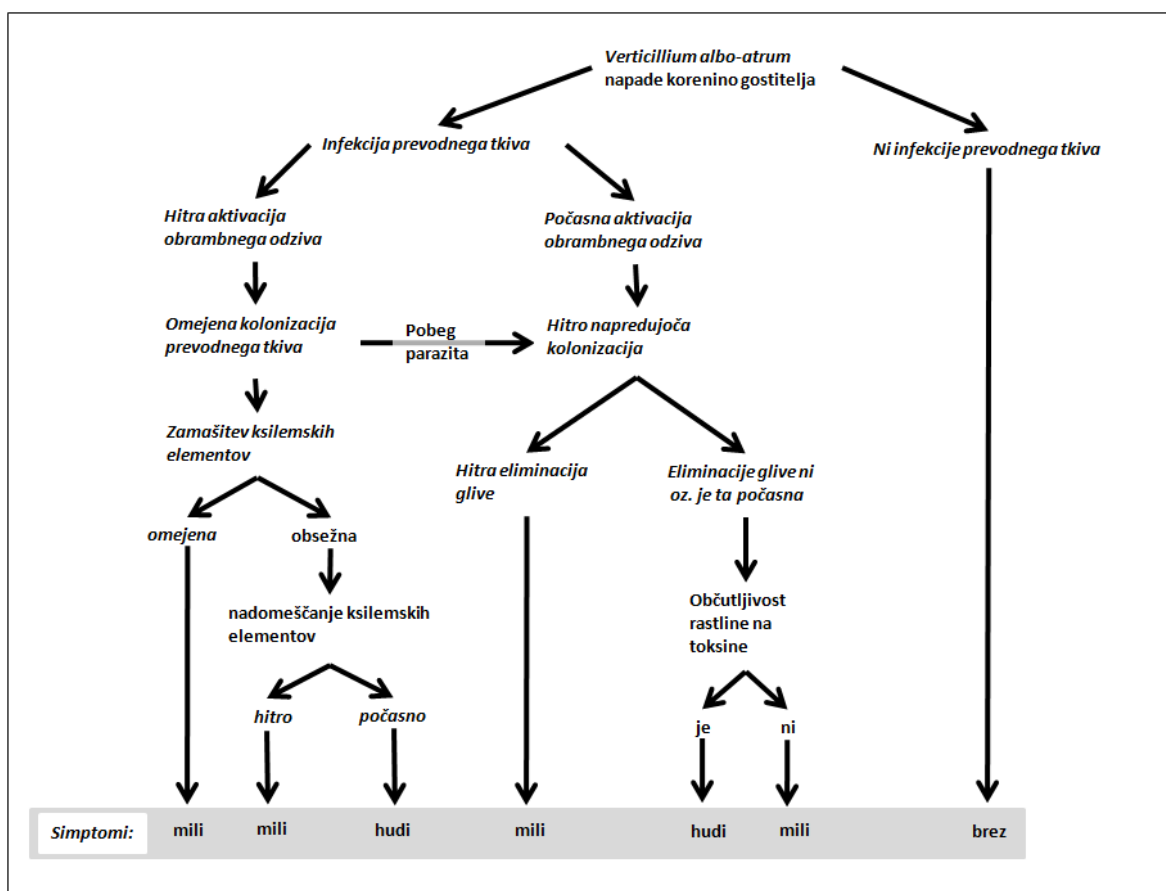
Pepelasto plesen povzroča gliva *Podosphaera macularis*. Okužba se odraža v različnih simptomih, in sicer pojavu gnilobe korenin, upočasnjene rasti poganjkov in površinskih poškodb listov in storžkov (Mahaffee in sod., 2009). Okužba in pojav simptomov sta odvisna od vremenskih okoliščin v vegetacijski dobi (Gent in sod., 2006). Obstaja več ločenih patotipov glive. Pri hmelju je za posamezne seve *P. macularis* poznanih sedem virov odpornosti, ki podajajo kvantitativno odpornost. Pripadajoči odpornostni geni so bili poimenovani R_B ter R_1 - R_6 (Oberhollenzer in sod., 2011). Za te R gene obstajajo vezani MO (Seefelder in Seigner, 2003). Gen R_2 je bil tudi uspešno kartiran (Seefelder in sod., 2005). Odkrit je bil tudi dominanten občutljivostni gen za pepelasto plesen, ki onemogoča razvoj z R_2 genom pogojene odpornosti (Henning in sod., 2011, Darby, 2013).

2.2.2.1 Hmeljeva uvelost

V zadnjem času je v Sloveniji na pomembnosti pridobila hmeljeva uvelost. Gre za žilno (vaskularno) obolenje hmeljne trte, ki ga povzročajo določeni gostiteljsko prilagojeni sevi gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Obolenje je bilo prvotno značilno za angleška hmeljarska področja, kjer je v mili obliki prisotno najdlje. Prvi opisan pojav bolezni je bil l. 1924 pri kraju Tonbridge (Harris, 1927, cit. po Radišek in sod., 2006), leta 1942 pa je bila v pokrajini Kent že zaznana resnejša, t.i. napredujoča oz. letalna oblika bolezni (Keyworth 1942, cit. po Talboys, 1958b).

Izbruh letalne oblike te bolezni leta 1997 v Sloveniji je prvi pojav letalne oblike izven Velike Britanije (Dolinar in Simončič, 1999; Radišek in sod., 2004a). Do leta 2005 je bilo bolezni podvrženih že 180 ha hmeljišč (Radišek in sod., 2006). Patogenost izolatov je bila prvotno testirana s pomočjo neposrednih testov patogenosti na različno odpornih kultivarjih hmelja (Pegg in Street, 1984). Po tej klasifikaciji seve razvrščamo v skupine patogenosti M (mila) in PV1, PV2 in PV3. Na podlagi diferencialnih AFLP fragmentov (Radišek in sod., 2003) je bil razvit MO tipa SCAR, ki omogoča nedvoumno ločevanje obeh skupin patogenosti (Radišek in sod., 2004b). Letalna oblika naj bi se iz blage oblike razvila večkrat neodvisno, izoliranih pa je bilo mnogo različno virulentnih sevov iz različnih evropskih pridelovalnih regij (Radišek in sod., 2006). Leta 2005 se je letalna oblika pojavila še v Nemčiji v pridelovalni regiji Hüll (Seefelder in sod., 2009), kjer je mila oblika bolezni sicer prisotna vsaj od leta 1952 (Neve, 1991). Patotipi s povišano virulenco so se pojavili tudi na zahodu ZDA, a v tem primeru naj ne bi šlo za napredujočo obliko bolezni (Gent, 2012).

Bolezen obeh oblik povzroča gliva *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold. Hmelj okužuje tudi *V. dahliae* Klebahn, a povzroča le milo obliko bolezni (Dolinar in Simončič, 1999). Do mile oblike bolezni pride ob okužbi občutljivih kultivarjev hmelja s PG1 ali odpornih kultivarjev s PG2 (Radišek in sod., 2006). Simptomi so kloroza in odpadanje listov ter debeljenje korenine nad nivojem prsti. Rastlina si od bolezni navadno opomore. Ob pojavu napredujoče oblike bolezni ob interakciji letalnih (PG2) sevov *V. albo-atrum* in občutljivih hmeljnih rastlin pride do hitrega odmrtja vseh poganjkov rastline. Debelitve trte ni, do začetka naslednje sezone pa navadno odmre tudi korenika (Dolinar in Simončič, 1999). Razvoj interakcij gostitelj-patogen za okužbo tipičnega gostitelja s fitopatogenimi glivami *Verticillium sp.* podaja slika 3.



Slika 3: Shema pomembnih korakov za določitev končne interakcije gostitelja in patogena za primer okužbe z verticilijem. V kolikor so končni simptomi hudi, gre za pojav občutljivosti. Odsotnost simptomov pomeni načeloma pojav odpornosti, pojav milih simptomov pa lahko smatramo za tolerantno interakcijo, ki je v tem primeru pravzaprav nepopolna odporna interakcija (prirejeno po Fradin in Thomma, 2006).

Figure 3: A flowchart depicting crucial determinants of the predominant host-pathogen interactions for *Verticillium sp.* infection. In the case of mild symptom development, the interaction is regarded as susceptible. Lack of symptoms denotes a resistant interaction, while the development of mild symptoms heralds a tolerant interaction, which is in this case equivalent to partial resistance (adapted from Fradin and Thomma, 2006).

Na morfološkem nivoju je interakcije različno virulentnih hmeljnih izolatov *V. albo-atrum* in različno odpornih hmeljev študiral Talboys. Odziv hmelja je razdelil na dve fazi (Talboys, 1958b). V prvi (determinantni) fazi pride do invazije korenine, kjer se v posameznih plasteh sprožijo določeni obrambni odzivi, vendar glavno bariero za vstop glive predstavlja endoderm. Prodor v ksilem rastline poteka pri letalnih patotipih hitreje in tudi v odpornih kultivarjih invazija uspe (Talboys, 1958b). V ksilemski fazi se za preprečitev napredovanja glive po rastlini tvorijo bariere – tiloze in ligninski gomoljčki (Talboys, 1958a). V obeh primerih naj bi šlo za nespecifične obrambne reakcije, značilne tako za občutljive kot za tolerantne rastline, le da so v slednjih močnejše in hitrejše (Talboys, 1972). Študije proteomov PG1 in PG2 sevov hmeljnih izolatov *V. albo-atrum* so pokazale povišan metabolni nivo PG2 izolatov (Mandelc in sod., 2009). Proteomske študije ksilema odpornega in neodpornega hmeljnega kultivarja pa so pokazale na povišano izražanje določenih s patogenezo povezanih beljakovin (Mandelc in sod., 2013).

Učinkovitih fitofarmaceutskih postopkov za upravljanje izbruhov hmeljeve uvelosti ni na voljo. Talna fumigacija je preveč okoljsko škodljiva, solarizacija pa je praktična le v zelo sončnih podnebjih, a je tudi v ustreznih pogojih le delno uspešna (Fradin in Thomma, 2006). Na kratek rok se širjenje bolezni lahko omeji s strogimi fitosanitarnimi ukrepi. Na prizadetih področjih se odredi premena hmeljišča z enokaličnicami, ki mora trajati vsaj 4 leta, da se infekcijski potencial glive zniža (Dolinar in Simončič, 1999). Okužena hmeljišča se lahko še naprej uporabljajo za pridelovanje hmelja, če se nanje zasadijo na glivo odporni kultivarji. Med pomembne žlahtniteljske cilje IHPS spada vzgoja slovenskih kultivarjev s povišano odpornostjo na hmeljevo uvelost (Čerenak in sod., 2010).

Eden izmed na hmeljevo uvelost najbolj odpornih hmeljnih kultivarjev je angleški kultivar 'Wye Target', medtem ko je kultivar 'Wye Challenger' zmerno odporen (Darby, 2001; Radišek in sod., 2006). Obstaja še nekaj zmerno odpornih kultivarjev, npr. 'Yeoman' in 'Eroica', večina preostalih pa je za bolezen občutljivih (Radišek in sod., 2006). Vsi odporni kultivarji so bili pridobljeni z introgresijo dednine dveh različnih ameriških žlahtniteljskih linij, in sicer Y 90 in AA 7. Pri prvi je dedovanje poligensko, pri drugi pa z geni z velikim vplivom (Darby, 2001). 'Wye Target' je bil pridobljen s križanjem ameriške ženske rastline hmelja AA 7, odporne na hmeljevo uvelost, z neodpornimi kultivarji hmelja. Vsebuje pretežen delež ameriške dednine v primerjavi z evropsko (Štajner in sod., 2008; Howard in sod., 2011). Darby (2001) predvideva, da je visoko stopnjo odpornosti tudi na letalne patotipe hmeljevih izolatov *Verticillium albo-atrum* tega kultivarja mogoče pojasniti z modelom dveh komplementarnih dominantnih lokusov; eden od lokusov naj bi izšel iz ameriškega, drugi pa iz evropskega prednika (Darby, 2001). Pripravljena je bila F₁ družina križanja 'Wye Target' x BL2/1, katere potomci so bili ovrednoteni glede ravni odpornosti na *Verticillium albo-atrum* PG2 (Jakše in sod., 2013).

Na voljo je tudi integralna genetska karta križanja za to družino, določena na podlagi 116 mikrosatelitnih ter dveh na podlagi nukleotidnih zaporedij pripravljenih MO (Jakše in sod., 2011). Integralna genetska karta družine obsega skupno 224 cM genetske razdalje v devetih skupinah povezanosti. Kozjak in sod. (2009) so opravili analizo analogov R genov hmelja s PCR z degeneriranimi ZO. Klonirali so delna zaporedja 17 analogov R genov pri hmelju in proizvedli dva MO tipa SNP, ki sta segregirala v družini 'Wye Target' x BL2/1. Zaradi načina okužbe testov odpornosti na hmeljevo uvelost ne moremo izvajati na sejančkih in moramo predstavnike novih kultivarjev vzgojiti do odraslega stadija (Darby, 2005). Za odpornost na hmeljevo uvelost je iz tega razloga lahko bistvenega pomena razvoj metod za MAS, za kar potrebujemo zadostno število kakovostnih na odpornost vezanih MO.

2.3 ODPORNOST RASTLIN NA VERTICILIJ

Glive rodu *Verticillium* so talni patogeni, ki lahko okužijo preko 200 gostiteljskih rastlin, med katerimi je mnogo ekonomsko pomembnih poljščin (Barbara in Clewes., 2003; Klosterman in sod., 2009). Povzročajo žilne (vaskularne) infekcije rastlin, ki vodijo v uvelost (Fradin in Thomma, 2006). Najpomembnejši sta glivi *V. dahliae* in *V. albo-atrum*. Za posamezne izolate prve je značilen širok spekter gostiteljev, druga pa je bolj specializirana na določene gostitelje (Bhat in Subbarao, 1999). Gre za visoko specializirana parazita, sposobna preživetja v s hranili revnih pogojih v ksilemu (Yadeta in

sod., 2013). Za obe vrsti sta bili določeni zaporedji celotnih genomov, ki kažeta prilagoditev na gostitelja (Klosterman in sod., 2011). Genom *V. dahliae* je zelo dinamičen, v njem npr. pogosto prihaja do rekombinacij med kromosomi, kar naj bi do neke mere nadomeščalo odstotnost spolnega cikla pri tej glivi (de Jonge in sod., 2013).

Glive rodu *Verticillium* sp. tvorijo v okuženi zemlji odporne mirovne strukture, kar onemogoča njihovo odstranitev z okuženih polj. *V. dahliae* tvori mikrosklerocije, ki so obstojnejši od melaniziranega micelija *V. albo-atrum* (Hawke in Lazarovits, 1995). Prvi bolje uspeva pri višjih, drugi pa pri nižjih temperaturah v bolj severnih predelih. V najbolj severnih področjih pa najhujšo škodo povzroča hibridna vrsta *Verticillium longisporum*, ki okužuje pretežno križnice (Klosterman in sod., 2009). Gre za hibrid, nastal z rekombinacijo različnih starševskih sevov *V. dahliae* (Inderbitzin in sod., 2011).

Pri praktično vseh za *Verticillium* sp. gostiteljskih rastlinskih vrstah obstajajo genetski viri tolerance oz. odpornosti, denimo pri bombažu (*Gossypium hirsutum*; npr. Bolek in sod., 2005), oljki (*Olea europea*; Cirulli in sod. 2008), oljni repici (*Brassica napus*; Rygulla in sod. 2008), navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*; Häffner in sod., 2010), lucerni (Huan in sod., 1991), jagodah (Zebrowska in sod., 2006), sončnicah (Sackston, 1981), paradižniku (Fradin in sod., 2009), krompirju (Simko in sod., 2004b) in solati (Hayes in sod., 2011a).

Pri določenih rastlinskih vrstah so bili kartirani QTL za odpornost na verticilij. Pri repnjakovcu so Veronese in sod. (2003) v asociacijski študiji različnih ekotipov na toleranco na *Verticillium dahliae* identificirali dominanten lokus VET1, ki je odgovoren za povišano toleranco in je povezan s časom cvetenja rastline. Häffner in sod. (2010) so na genetski karti F₂ generacije križanja med linijama repnjakovca, ki se razlikujeta v odzivu na verticilij, identificirali večje število QTL za posamezne parametre okužbe z verticilijem (čas razvoja okužbe, indukcija aksilarnega razraščanja, raven kolonizacije žil), ki so bili prisotni na štirih od petih kromosomov te rastline. Rygulla in sod. (2008) so na genetski karti oljne ogrščice (*Brassica napus*) iz 19 skupin povezanosti skupne dolžine 1739 cM, sestavljeni na podlagi 163 podvojenih haploidnih linij z metodo kompozitnega genetskega kartiranja, v dveh skupinah povezanosti identificirali po en QTL, ki oba pomembno vplivata na razvoj tolerance na *Verticillium longisporum* v različnih pogojih rasti rastline.

2.3.1 Gen Ve1 podaja odpornost na verticilij pri paradižniku

Najbolje je do danes raziskana odpornost na verticilij pri paradižniku, saj gre za ekonomsko pomembno rastlino, gliva pa zanjo predstavlja pomembnega škodljivca. Gostiteljski odziv pri tej rastlini poteka podobno kot pri hmelju (Gold in Robb, 1995). Že v 50. letih 20. stoletja je bila v moderne kultivarje uspešno vnesena odpornost na verticilij iz divje akcesije paradižnika (Schaible in sod., 1951, cit. po Fradin in sod., 2009). Glede na ta lokus so paradižnikovi sevi *V. dahliae* razvrščeni na dve t.i. rasi. V raso 1 spadajo sevi, ki jih uspešno prepozna rastlina s funkcionalnim Ve1. Preostali sevi pripadajo rasi 2.

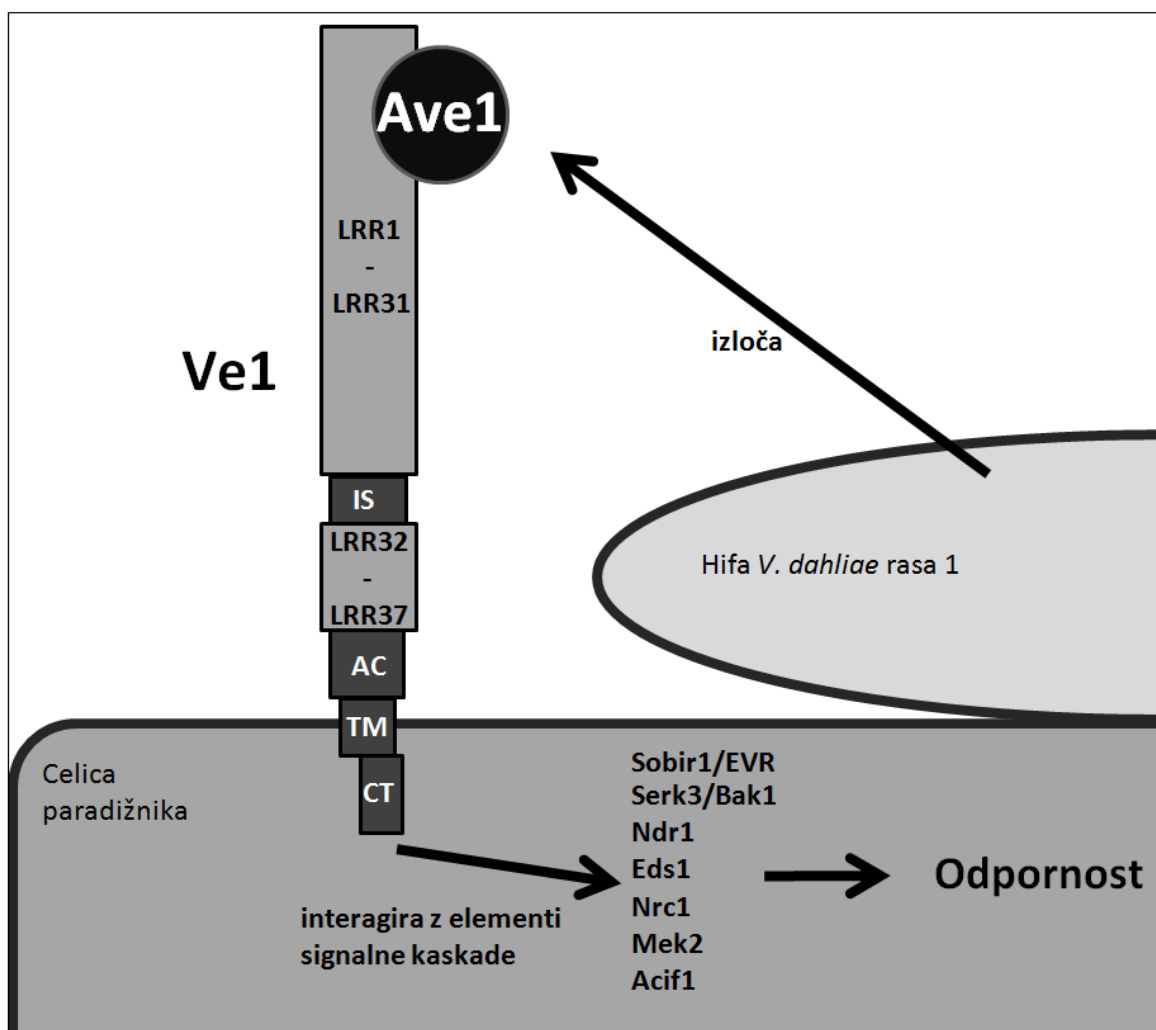
Kawchuk in sod. (1998) so izdelali MO tipa SCAR, vezan na odpornost na verticilij pri paradižniku. Zatem so Diwan in sod. (1999) s pomočjo genetskih kart, temelječih na polimorfizmi dolžine restrikcijskih fragmentov, pokazali, da je za pojav tolerance na

Verticillium dahliae pri tolerantnih kultivarjih paradižnika odgovoren en sam lokus, lociran na kromosomu 9. S pomočjo genetske karte, določene na podlagi MO tipa RAPD, je bil ta lokus izoliran iz genomske knjižnice paradižnika (Kawchuk in sod., 2001). Lokus vsebuje dva sosednja, obratno orientirana gena, in sicer funkcionalen gen Ve1 in okrnjen gen Ve2. Le Ve1 posreduje toleranco (Fradin in sod., 2009), Ve2 pa nima vloge v razvoju odpornosti. Na podlagi tega lokusa so bili pripravljeni MO za izvajanje selekcije s pomočjo MO za introgresijo odpornosti na verticilij v sicer neodporne kultivarje paradižnika (Arens in sod., 2010; Acciarri in sod., 2007).

Produkt Ve1 gena po primarni beljakovinski strukturi spada med R proteine tipa RLP (Kawchuk in sod., 2001). Na N-terminalnem koncu ima dolgo LRR domeno, ki pokriva večino gena, blizu C-terminalnega konca pa ima t.i. peptidni rep, na katerem je motiv za sprožitev endocitoze (slika 4). LRR domena vsebuje 37 LRR ponovitev, predeljenih v dve skupini s povezovalnim motivom (Zhang, 2013). Poskusi z izmenjavo delov domen med Ve1 in Ve2 so pokazali, da je v prepoznavo patogena vpletena le LRR regija med in vključno s ponovitvami LRR22 in LRR35 (Fradin, 2011).

Znanih je mnogo komponent signalne kaskade, ki so v določeni meji skupne signalizaciji z modelnim genom Cf-2, ki prepozna paradižnikov listni patogen *Cladosporium fulvum* (Fradin in sod., 2009), vendar gre za dve ločeni signalni poti (van Esse in sod., 2009). V začetni fazi signalizacije pride do interakcije med Ve1 in receptorsko kinazo BAK1, ki je sicer vpletena tudi v signalizacijo z brasinosteroidi (Li in sod., 2002). V signalizacijo je vpleten tudi gen EDS1, ki je sicer potreben za z NLR pogojeno imunost (Hu in sod., 2005). Pomembno vlogo imata tudi dve receptorski kinazi tipa SERK (Schmidt in sod., 1997). Neposredno interakcijo z Ve1 kaže RLK, imenovan Sobir1/EVR, ki vpliva na stabilnost delovanja Ve1 (Liebrand, 2013b). Pomembno vlogo pri tvorbi aktivnega Ve1 na celični membrani imajo tudi šaperoni endoplazemskega retikula (Liebrand, 2013a).

Na podlagi RNA-seq in analize diferencialno izraženih genov *V. dahliae* ras 1 ter 2 je bil določen gen za efektor, imenovan Ave1, ki ga Ve1 prepozna. Prisoten je v vseh sevih rase 1 in odsoten v vseh iz rase 2, interakcija z Ve1 pa je bila prikazana s prehodno koekspresijo Ve1 in Ave1 v tobaku (de Jonge in sod., 2012). Efektor Ave1 je majhen natriuretični peptid, ki je bil verjetno pridobljen s horizontalnim prenosom genov iz genoma gostiteljske rastline in imitira neznano fiziološko funkcijo. Za prepoznavo s strani Ve1 zadostuje že 9 C-terminalnih aminokislinskih ostankov (AKO) beljakovine Ave1 (Zhang, 2013). Zraven tega, da interagira z RLP, je zaporedje Ave1 dobro ohranjeno pri različnih glivnih patogenih, torej Ave1 predstavlja molekulo s PAMP (Thomma in sod., 2011).



Slika 4: Molekulske interakcije med paradižnikom in *V. dahliae* rasa 1. Interakcija glivnega efektorja Ave1 in RLP Ve1 sproži signalni odziv preko večih komponent signalne kaskade, ki privedejo do odpornosti na patogena.

Figure 4: Molecular interaction of tomato and *V. dahliae* race 1. Upon interaction of the fungal effector Ave1 with the plant RLP Ve1, a signal cascade featuring many molecular components is induced, ultimately leading to a resistant response.

Kot podpora študijam Ve1 gena so bili proizvedeni številni pristopi z uporabo modelnih rastlin, denimo transformacija repnjakovca v povezavi s postopkom utišanja genov s pomočjo virusov (VIGS; ang. Virus Induced Gene Silencing) (Fradin in sod., 2011) ter prehodna genetska transformacija tobaka za študije interakcij med Ve1 geni in potencialnimi efektorji (Zhang in sod., 2013a). Uspešen prenos gena Ve1 v repnjakovec kaže na izjemno medvrstno evolucijsko ohranjenost komponent signalne kaskade sprožene z Ve1, kljub dejstvu, da v genomu repnjakovca homologa Ve1 ni (Fradin in sod., 2011). Pri repnjakovcu s postopkom transformacije vnešen gen Ve1 ne sproži hipersenzitivnega odziva (Zhang in sod., 2013b). Pri isti rastlini je odpornost na verticilij verjetno poligenetska (Veronese in sod., 2003). Z razvojem odpornosti na verticilij pri repnjakovcu sta bila doslej eksperimentalno povezana dva gena, izmed katerih eden kodira DNA vezavno beljakovino AHL19 (Yadeta in sod., 2011), drugi pa izločano ksilemsko beljakovino EVR3 (Yadeta in sod., 2013). Pomembno vlogo v razvoju odpornosti pri repnjakovcu pa ima tudi izražanje

majhnih RNA molekul (Ellendorff in sod., 2009). Odpornost na verticilij pri tej rastlini je torej kvantitativne narave.

2.3.2 Ve1 homologi drugih rastlinskih vrst

Homologi Ve1 gena so bili izolirani tudi iz drugih rastlinskih vrst. Simko in sod. (2004b) so z asociacijskim kartiranjem pri različnih tetraploidnih kultivarjih krompirja identificirali in kartirali homologe Ve1, ki so jih poimenovali StVe1. S pomočjo PCR so identificirali 11 homologov StVe1. Izvedli so tudi asociacijsko kartiranje QTL za odpornost krompirja na verticilij. Ugotovili so, da je STS, izdelan na podlagi zaporedja Ve1 homologa krompirja, vezan s QTL odpornosti na verticilijevo uvelost. V ločeni asociacijski študiji (Simko in sod., 2004a) so določili haplotipe genov v *Ve* lokusu pri različnih kultivarjih krompirja. Niso uspeli pojasniti, če je za pojav tolerance odgovoren eden ali dva močno vezana gena. Toleranca na verticilij je bila kartirana na krompirjev kromosom 9, sinteničen paradižnikovemu kromosomu 9, kjer je lociran *Ve* lokus. Wang in sod. (2010b) so s cDNA-AFLP analizo diferencialno izraženih fragmentov pri različnih akcesijah divjega sorodnika krompirja *Solanum torvum* pokazali, da je pri tej rastlini obramba proti verticilijevo uvelosti kompleksen proces, uravnan z več geni (Wang in sod., 2010b). Tudi v primeru krompirja Ve1 lokus ne podaja neposredne, kvantitativne odpornosti.

Pri meti je bil ortolog Ve1 gena odkrit z RGA profiliranjem (Vining in sod., 2007). Vining in Davis (2009) sta iz treh vrst mete (*Mentha sp.*) s pomočjo metode TAIL-PCR izolirala več alelov metinega homologa Ve1 (mVe1), ki izkazuje visoko podobnost s paradižnikovim genom, vendar nista uspela pokazati, ali je gen dejansko vključen v pojav odpornosti (Vining in Davis, 2009). Po analizi mVe1 z orodjem BLAST sta opazila, da je možen homolog Ve1 prisoten tudi pri vinski trti (*V. vinifera*), torej je lokus zelo ohranjen tudi čez znatne evlucijske razdalje.

Pri solati so Hayes in sod. (2011b) z na odpornost na verticilij odporno družino solate pridobili karto križanja z 9 skupinami povezanosti. Na skupini povezanosti LG9 so zaznali en QTL z velikim vplivom na odpornost. Z orodjem BLAST so odkrili tudi EST solate, ki kaže 50 % podobnosti v aminokislinskem zaporedju z Ve1 genom. Iz tega EST so razvili MO, ki so ga uspeli kartirati na pridobljeno karto povezanosti in ugotovili, da je ozko vezan z omenjenim QTL, torej Ve1 homolog mete verjetno podaja kvantitativno odpornost.

Genetske študije odpornosti na verticilij pri bombažu (*Gossypium hirsutum*) so pokazale različne vzorce dedovanja te lastnosti pri različnih kultivarjih (Bolek in sod., 2005). Opravljenih je bilo že več študij kartiranja QTL za to odpornost. Yang in sod. (2008) so pri populaciji križanja divje, na verticilij odporne vrste bombaža *Gossypium barbadense*, in kultivarja XLZ1 odkrili kar 9 QTL, ki so posamič pojasnili med 11 in 29 % fenotipske variabilnosti za pojav odpornosti v potomstvu križanja. Jiang in sod. (2009) so na karti na podlagi križanja odpornega in občutljivega kultivarja bombaža odkrili večje število QTL, ki so jih uspeli kartirati na dva kromosoma. Pri tej rastlini tudi obstajata mila in napredujoča oblika uvelosti, ki ju povzroča *V. dahliae*. Na bolezen je odpornejši t. i. otoški bombaž, ki pa v svetovnem merilu predstavlja le 5 % proizvedenega bombaža. Preostalih 95 % pridelka se pridobi iz višavskega bombaža, ki je na uvelost občutljiv. Dva različna

ortologa Ve1, GbVe in Gbve1, sta bila pri bombažu tudi klonirana in okarakterizirana (Zhang in sod., 2011, 2012). Po prenosu homologov v repnjakovec je ta kazal povišano odpornost na bombažne seve *V. dahliae*, oba gena pa kažeta zelo visoko raven podobnosti z Ve1 paradižnika.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 UPORABLJEN RASTLINSKI MATERIAL

3.1.1 Seznam uporabljenih vzorcev

Iskanje polimorfizmov in preliminarno vrednotenje segregacije pripadajočih lokusov smo izvedli s PCR na DNK vzorcih kultivarja 'Wye Target', moške linije BL2/1 in šestih potomcev njunega križanja. Končno izrednotenje vseh v tej raziskavi pridobljenih polimorfizmov genetskih markerjev pa smo izvedli na preostanku skupno 144 potomcev križanja 'Wye Target' in moške linije BL2/1, pridobljenih iz kolekcije Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu (Jakše in sod., 2013)

Hmeljne homologe Ve1 gena paradižnika (Fradin in sod., 2009) smo pridobili s PCR iz genomske DNA kultivarja 'Wye Target'. V filogenetski analizi kodogenih regij hmeljnih Ve1-podobnih nukleotidnih zaporedij (NZ) smo uporabili DNA izbranih kultivarjev in divjih akcesij hmelja, podanih v preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam vseh v raziskavi uporabljenih vzorcev dednine hmelja, ki obsega kultivarje, žlahtniteljske linije in akcesije divjega hmelja

Table 1: List of hop germplasm samples used in this study, encompassing hop cultivars, breeding lines and wild accessions

Ime kultivarja oz. akcesije	Podvrsta	Opis
Cluster	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	ameriški kultivar
Comet	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	ameriški kultivar
Northern Brewer	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	angleški kultivar
OB21*	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	angleška moška žlahtniteljska linija
AH1	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	divji hmelj, Altaj
A12	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	divji hmelj, Altaj
K5	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	divji hmelj, Kavkaz
71.002	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	divji hmelj, Balkan
BL2/1	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	slovenska moška žlahtniteljska linija
1001.001	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupuloides</i>	divji hmelj, ZDA
1018.001	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupuloides</i>	divji hmelj, ZDA
492.002	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupuloides</i>	divji hmelj, Nebraska, ZDA
755.002	<i>H. lupulus</i> var. <i>lupuloides</i>	divji hmelj, Missouri, ZDA
1355.001	<i>H. lupulus</i> var. <i>neomexicanus</i>	divji hmelj, ZDA
1367.001	<i>H. lupulus</i> var. <i>neomexicanus</i>	divji hmelj, ZDA
1401.001	<i>H. lupulus</i> var. <i>neomexicanus</i>	divji hmelj, ZDA
91.002		divji hmelj, Wyoming, ZDA
1019.009	<i>H. lupulus</i> var. <i>pubescens</i>	
1019.041	<i>H. lupulus</i> var. <i>pubescens</i>	divji hmelj, Missouri, ZDA

* Potomec križanja kultivarja 'Brewer's Gold' in ameriške akcesije OY1

3.1.2 Izolacija rastlinske DNA

Rastlinsko DNA smo z optimiziranim CTAB protokolom izolirali iz mladih listov hmelja (Kump in Javornik, 1996). Del mladega lista (približno 2 cm² rastlinskega tkiva) smo v terilnici prelili s tekočim dušikom in zdrobili. Dodali smo 2 ml predhodno na 68 °C segrete ekstrakcijske raztopine CTAB [2% (w/v) CTAB (Sigma), 1,4 M NaCl (Merck), 20 mM EDTA (Alkaloid), 100 mM Tris-HCl (Sigma) pH 8,0, 0,2% (v/v) β-merkaptotanol (Fluka AG)]. Po 1 ml suspenzije smo razdelili v 1,5 ml mikrocentrifugirke in jih z občasnim pomešanjem 90 min inkubirali pri 68 °C. Po inkubaciji smo vanje dodali 600 µl zmesi kloroforma in izoamilalkohola v razmerju 24:1 in jih dobro premešali s stresanjem. Nato smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 4 °C in relativni centrifugalni sili 14.000 g (centrifuga Eppendorf 5810R; Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Supernatant smo z 1 ml pipeto prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in dodali za 1/10 volumna 3 M natrijevega acetata (Duchefa) pri pH 5,2 in 1 volumen ledeno hladnega izopropanola (Merck) (do uporabe hranjen pri -20 °C). Vzorce smo močno premešali in inkubirali čez noč pri -20 °C. Nato smo jih centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 14.000 g. Supernatant smo previdno odstranili, preostali pelet pa sprali v 70% etanolu (Merck) pri sobni temperaturi. Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 14.000 g in s pipeto previdno odstranili ves supernatant. Preostali pelet smo posušili pri sobni temperaturi in ga raztopili v 50 µl raztopine TdE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, Integrated DNA Technologies). Dobljene vzorce smo shranili pri -20 °C.

Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili z DNA fluorometrom DyNA QuantTM 200 (Amersham Biosciences, Združeno Kraljestvo) v skladu z navodili proizvajalca. Za merjenje smo uporabljali t.i. testno raztopino, t.j. TNE pufer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4], ki smo mu tik pred izvajanjem meritev dodali barvilo Hoechst 33258 do končne koncentracije 0,1 µg/ml. Aparaturo smo predhodno kalibrirali s standardno raztopino DNA telečjega timusa (100 ng/ml DNA). Pred vsako meritvijo smo aparaturi nastavili ničlo z 2 ml sveže pripravljene testne raztopine. Nato smo raztopini dodali 2 µl vzorca, močno prepipetirali z 1 ml mikropipeto in izmerili koncentracijo vzorca. Vse vzorce hmeljne DNA, uporabljene v tej raziskavi, smo z dodatkom bidestilirane vode razredčili na delovno koncentracijo 4 ng/µl in shranili pri -20 °C.

3.2 ZASNOVA Z ODPORNOSTNIMI GENI POVEZANIH MO

Združene soseske hmeljevih oznak izraženega zaporedja (EST) so bile pridobljene iz verzije 168a spletne baze Plant Genome Database (PGD) (Duvick in sod., 2008). Baza je prosto dostopna na <http://www.plantgdb.org/>. Ta nabor nukleotidnih zaporedij obsega 9.789 izraženih zaporedij hmelja, združenih iz približno 25.000 posameznih odčitkov iz dveh večjih projektov določanja NZ hmeljnih EST (Nagel in sod. 2008, Wang in sod. 2008b).

Pridobljeni EST so bili prevedeni v vseh šest možnih bralnih okvirjev s programom *translate* (del programskega paketa EMBOSS), vse nadaljnje analize pa so bile izvedene s skriptami programskega paketa HMMER (Zhang in Wood, 2003). Z izvajanjem skript *hmmbuild* in *hmmcalibrate* na podlagi poravnave iz baze pfam (Finn in sod., 2010) smo pripravili bazo motivov značilnih za rastlinske odpornostne gene. Uporabljeni pfam motivi

so bili PF00560.25 (LRR1), PF07725.4(LRR_3), PF00931.14 (NBS), PF01582.12 (TIR) in PF03106.7 (WRKY). Podobnosti z domenami CC nismo zmogli določiti, saj zanesljive pfam poravnave za ta tip zaporedij niso na voljo. Seznam EST, katerih NZ izkazujejo podobnost z domenami rastlinskih R genov, smo pridobili z izvajanjem skripte *hmmpfam* s primerjavo baze motivov R genov z bazo hmeljnih EST ob mejni e-vrednosti 0,001. V nadaljnjih analizah smo kot imena posameznih PCR amplikonov in tudi kot končna imena EST-RGA MO ohranili izhodiščna imena ustrežajočih zaporedij iz PGD.

3.2.1 Določitev identitete oznak izraženega zaporedja z orodjem BLAST

Z algoritmom BLASTx spletnega orodja BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), ki omogoča poravnavo nukleotidnih zaporedij z bazo aminokislinskih zaporedij, smo v prejšnjem koraku pridobljene kandidatne EST-RGA primerjali z neredundantno (nr) bazo aminokislinskih zaporedij strežnika NCBI pri prednastavljenih pogojih (Camacho in sod., 2009). Izmed najdenih aminokislinskih zaporedij beljakovin smo kot referenčni gen za nadaljnje analize hmeljevih ESTjev izbrali najbolje ocenjeno zaporedje z znanim NCBI Gene profilom. Za ta referenčni gen smo z algoritmom BLASTp določili predvideno funkcijo in jo zabeležili kot predvideno funkcijo hmeljnega EST-RGA. Ne glede na predvideno funkcijo smo v nadaljnji analizi obdržali vse kandidatne EST.

Za vsa referenčna zaporedja smo iz pripadajočega NCBI Gene profila pridobili nukleotidna zaporedja celotnega gena.

3.2.2 Predvidevanje meje med eksoni in introni

Za vse pare kandidatnih prevedenih EST-RGA in referenčnih genov smo določili poravnavo s spletnim orodjem Wise2 iz paketa spletnih orodij EBI Tools (Goujon in sod., 2010), v katerem je implementiran optimiziran algoritem za primerjanje aminokislinskih zaporedij z nukleotidnimi zaporedji. S tem programom smo lahko na podlagi odsotnosti poravnave z aminokislinskim zaporedjem natančno določili mesto in dolžino intronov v referenčnem genu (Birney in Durbin, 1997). Iz te poravnave smo zabeležili število in lokacijo predvidenih intronov v prevedenih hmeljnih EST-RGA ter izračunali natančno dolžino posameznih intronov v referenčnih genih.

3.2.3 Zasnova začetnih oligonukleotidov

Vse pare začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje potencialnih hmeljnih EST-RGA MO smo določili s spletnim orodjem Primer3 (Rozen in Skaletsky, 2000) z uporabo prednastavljenih vrednosti posameznih parametrov. Pare začetnih oligonukleotidov smo zasnovali tako, da smo v predviden amplikon vključili čim daljše nukleotidno zaporedje potencialnega hmeljnega EST-RGA in čim večje število predvidenih intronov, obenem pa pazili, da noben od začetnih oligonukleotidov ni bil pripravljen na meji med dvema eksonoma. Vse začetne oligonukleotide v tej nalogi smo naročili pri podjetju Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgija). Seznam začetnih oligonukleotidov je podan v prilogi 1.

3.2.4 Pomnoževanje v PCR

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli z aparaturo Biometra Tgradient Thermocycler v reakcijskem volumnu 20 μ l. Za pomnoževanje smo uporabljali DNA polimerazo Utaq (Fermentas) skladno z navodili proizvajalca. Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 1X Utaq pufer (iz 10X založne raztopine; Fermentas), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M vsakega od štirih nukleotidov, 500 nM vsakega od obeh začetnih oligonukleotidov in 0,5 U encima Utaq.

Pomnoževanje v PCR smo izvedli z naslednjim programom:

- Začetna denaturacija: 5 min pri 94 °C,
- 5 ciklov: denaturacija 30 s pri 94 °C, 45 s trajajoč korak začet pri 62 °C z znižanjem temperature za 1 °C vsak naslednji cikel, in 2 min podaljševanja pri 72 °C,
- 30 ciklov: 30 s pri 94 °C, 45 s pri 57 °C in 2 min pri 72 °C,
- končna ekstenzija 8 minut pri 72 °C,
- ohlajanje do 10 °C

Pomnoževanje smo izhodiščno testirali na obeh starših segregirajoče populacije in šestih potomcih z oznakami 58-18, 58-27, 58-43, 58-77, 58-104, 58-214. Po izvedbi PCR smo 5 μ l produkta shranili za določanje NZ, preostanek pa analizirali z gelsko elektroforezo.

3.2.5 Ločevanje in ogledovanje produktov PCR z gelsko elektroforezo

Uspešnost pomnožitve fragmentov v PCR reakcijah smo analizirali s horizontalno gelsko elektroforezo (aparatura BioRad Sub-Cell, model 192) v 0,5X TBE pufru [44,5 mM Tris, 44,5 mM borna kislina in 1 mM EDTA, pH 8,0; pripravljen iz 5X založne raztopine]. Za ločevanje fragmentov smo uporabili 1,2% agarozni gel [1,2% (w/v) SeaKem LE agaroz (Lonza), 0,5X TBE pufer; po prevretju suspenzije agaroze v mikrovalovni pečici smo gel ohladili pod 50 °C in dodali etidijev bromid (iz založne raztopine 10 mg/ml) do koncentracije 0,5 μ g/ml]. Vsakemu preostanku produkta PCR reakcije smo dodali 5 μ l nanašalnega barvila [12,5% (w/v) Ficoll 400, 0,2% (w/v) bromfenol modro, 6,7% (v/v) 10X TBE], premešali s prepipetiranjem in vzorce nanesli na agarozni gel. Za velikostni standard smo uporabili GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas). Elektroforezo smo izvedli pri napetosti do 130 V do zadostne ločitve vzorcev (tipično do 8 cm poti nanašalnega barvila. Po končani ločitvi fragmentov smo gele pregledali na transiluminatorju TMF-30 (UVP Inc., Združeno kraljestvo) in jih fotografirali s fotoaparatom Nikon Coolpix 8400 (Nikon Corporation, Tokyo, Japonska), pritrjenim na ohišje reflektorne luči. Velikost (v bp) posameznih pomnoženih fragmentov smo ocenili s programom PyElph 1.4 (Pavel in Vasile, 2012)

3.2.6 Čiščenje PCR produkta

K 5 µl produktov PCR reakcije, ki so po elektroforezi izkazali ustrezno pomnožitev fragmenta pričakovane dolžine, smo dodali 0,1 µl encima *ExoI* (Fermentas, 20 U/ml), 0,5 µl encima FastAPTM (Fermentas, 1 U/ml) in 1,4 µl 1X PCR pufru [GeneAmp® 10X PCR Gold Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), redčenega v bidestilirani vodi]. FastAPTM je alkalna fosfataza, katere vloga je sproščanje fosfatnih skupin iz prebitka preostalih nukleotidov po PCR reakciji, prisotnih v PCR produktu. *ExoI* ima eksonukleazno aktivnost, v raztopini pa popolnoma razgradi enoverižne DNA molekule in s tem omogoči popolno odstranitev presežka začetnih oligonukleotidov. Ta način predstavlja hitro in cenovno ugodno rešitev čiščenja PCR produktov v primerjavi s kolonsko kromatografijo. Po premešanju z vrtinčenjem in kratkem centrifugiranjem smo izvedli inkubacijo za 45 minut pri 37 °C, ki ji je sledila inaktivacija encimov za 15 minut na 80 °C. Tako tretiran vzorec je bil pripravljen za neposredno sekvenčno reakcijo.

3.2.7 Določanje NZ po Sangerju

Produkt po čiščenju v predhodnem koraku smo razdelili na dva dela po 3,5 µl. Na vsakem od obeh vzorcev smo izvedli sekvenčno reakcijo po Sangerju s kemikalijo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Napravili smo ločeni sekvenčni reakciji z vsakim od začetnih oligonukleotidov, uporabljenih v PCR reakciji.

Reakcijske mešanice sekvenčne reakcije volumna 10 µl so vsebovale 1X BigDye Buffer (iz 5X založne raztopine, Applied Biosystems), 5% v/v BigDye® Terminator v3.1 in 200 nM koncentracijo začetnega nukleotida za določanje NZ.

Sekvenčno reakcijo smo izvedli v cikličnem termostatu po naslednjem programu:

- Predgretje 3 minute pri 96 °C,
- 99 ciklov: 10 s pri 96 °C, 10 s pri 55 °C in 4 minute pri 72 °C,
- 7 minut pri 72 °C,
- hlajenje na 10 °C

Produkte sekvenčne reakcije smo prenesli na 96 mestno mikrotitersko ploščo. Vsakemu produktu smo dodali 2,5 µl 0,125 M EDTA pH 8,0 in kratko centrifugirali, nato pa dodali še 30 µl 96% etanola. Ploščo smo prelepili s samolepljivo folijo in vzorce premešali z rotacijskimi gibi mikrotiterske plošče. Ploščo smo centrifugirali v centrifugi Eppendorf 5810R, in sicer 55 minut pri 3.700 obratih na minuto pri 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, ploščo položili navzdol na papirnato brisačo in centrifugirali 2 min pri relativni centrifugalni sili 190 g. Po centrifugiranju smo ploščo za 10 min pustili na pultu, da so odhlapeli morebitni sledovi etanola. Vsakemu vzorcu smo dodali 12 µl formamida, premešali s stresanjem in kratko centrifugirali. Tako pripravljene vzorce smo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja s kapilarno elektroforezo na napravi ABI3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Oddelek za zootehniko. AB1 kromatograme smo prejeli po elektronski pošti.

3.2.8 Analiza kromatogramov

Kromatograme posameznih zaporedij smo uvozili v program CodonCode Aligner 3.7.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Istovetnost pridobljenih zaporedij smo preverili s poravnavo z izhodiščnimi hmeljnimi EST z algoritmom BLASTn, ki so nam omogočila preliminarno odkrivanje intronov v nukleotidnih zaporedjih. Na podlagi te poravnave smo meje med introni in eksoni določili v programu CodonCode Aligner z natančno določitvijo začetkov (GT) in koncev (AG) intronov.

Vse pridobljene kromatograme staršev in šestih križancev smo natančno pregledali in določili mesta očitnih polimorfizmov na ravni zaporedja. Kot polimorfizem smo določili mesto v NZ kjer sta starševski NZ izkazovali polimorfizem posameznih nukleotidov (SNP; dvojni vrhovi v posameznem NZ v primeru heterozigotnosti ali različna nukleotida pri vsakem od staršev) ali insercijo/delecijo enega ali več nukleotidov (očitno podrtje nukleotidnega zaporedja pri enem ali obeh starših ali manjkajoč nukleotid pri enem od staršev), obenem pa so kromatogrami šestih potomcev križanja izkazovali tudi očitno segregacijo takšnega polimorfizma.

Lokacije intronov in polimorfizmov na ravni NZ smo grafično prikazali s spletnim programom FancyGene v1.4 (Rambaldi in Ciccarelli, 2009).

3.2.9 Izvrednotenje EST-RGA

Za vsa EST-RGA NZ, ki so vsebovala segregirajoče polimorfizme, smo pridobili NZ in določili status polimorfizma še na preostanku segregirajoče populacije križanja. NZ smo v tem primeru določili le z enim od začetnih oligonukleotidov, in sicer tistim, ki je omogočal boljše ovrednotenje polimorfizma v kromatogramu.

3.3 IZOLACIJA VE1 HOMOLOGOV HMELJA

Izhodišče za izvedbo izolacije kodirajočih regij hmeljevih homologov paradižnikovega Ve1 gena je bilo zaporedje, dolgo 1344 bp, pridobljeno s PCR z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi, pripravljenimi na podlagi ClustalX 2.0 (Larkin in sod., 2007) poravnave paradižnikovega gena Ve1 (GenBank akcesija AAK58682.1) ter homologov tega gena pri meti (akcesija ACB99689.1) in vinski trti (akcesije CAO63881.1, CAN76702.1 in CAO63885.1). To zaporedje sovпада z zaporedjem Ve1 paradižnika od aminokisline 142 naprej in predstavlja 448 aminokislin hmeljevega homologa Ve1 gena.

Za določitev NZ preostanka kodogene regije tega homologa smo uporabili pristop TAIL-PCR (ang. Thermal Asymmetric Interlaced PCR; Liu in sod., 1995). Ta omogoča pridobivanje neznanih NZ, ki mejijo na že določena NZ, z uporabo arbitrarnih degeneriranih začetnih oligonukleotidov (AD). Odločili smo se za uporabo šestih AD začetnih oligonukleotidov (preglednica 2).

Preglednica 2: Degenerirani začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje bočnih regij Ve1 homologov hmelja s TAIL-PCR

Table 2: Degenerate primers for TAIL-PCR amplification of flanking regions of putative hop Ve1 homologs

Ime	Nukl. zap.	degeneriranost	referenca
AD1	NTCGASTWTSWGT	64-krat	Liu in sod. (1995)
AD2	NGTCGASWGANAWGAA	128-krat	Liu in sod. (1995)
AD3	WGTGNAGWANCANAGA	256-krat	Liu in sod. (1995)
AD4	STTGNTASTNCTNTGC	256-krat	Qiu in sod. (2010) (AD8)
AD5	WCAGNTGWTNGTNCTG	256-krat	Qiu in sod. (2010) (AD9)
AD6	TTGIAGNACIANAGG*	16-krat	Qiu in sod. (2010) (AD11)

*I-inozin

3.3.1 Zasnova začetnih oligonukleotidov

Po pridobitvi dodatnih bočnih nukleotidnih zaporedij smo na koncih, ki so mejili na del gena s še neznanim NZ, s programom Primer3 pripravili sete treh specifičnih ZO (SZO) za pridobitev preostanka nukleotidnih zaporedij (preglednica 3). TAIL-PCR smo za vsak set SZO izvedli z vsemi šestimi naštetimi AD. Potek posameznih korakov poskusa je opisan v poglavju 4.2.1.1.

Preglednica 3: Specifični začetni oligonukleotidi, uporabljeni v postopku izolacije hmeljnih homologov Ve gena s TAIL-PCR. Začetni oligonukleotidi so razporejeni po stopnjah izvedbe TAIL-PCR (1° – primarna, 2° – sekundarna, 3° – terciarna).

Table 3: Specific primers, used in the TAIL-PCR based isolation of hop Ve1 homologues. Primers are listed according to the TAIL-PCR step (1° – primary, 2° – secondary, 3° – tertiary) in which each was utilized.

1° TAIL-PCR		2° TAIL PCR		3° TAIL PCR	
ime	nukl. zap. (5'→3')	ime	nukl. zap. (5'→3')	ime	nukl. zap. (5'→3')
VeT1F1	TTTGGGAACCTTGGCA ATGGGAATCTTATC	VeT1F2	GATGAGCCTGCAGGA ACCATATTCTC	VeT1F3	GCCTGCAGGAACCAT ATTCTCCTC
VeT1R1	GTTTTGAACCAGCAT CCCCAAATCC	VeT1R2	ATCCCCAAATCCGGG TTCTCAAGTTTC	VeT1R3	GTGGAGATATCAAGA GTGACCAAGTTTGTC
Ve1T2F1	CACATGGAGCTCAAA TTCAGATTG	Ve1T2F2	AGTTTAGATGGCGAG GGACGT	Ve1T2F3	GCTTGAGCAGTGAGT GGATCTCT
Ve2T2F1	TCACATGGAGTCAAA ATTCAGATTG	Ve2T2F2	TAACCTTGGATGGTG AGGGACG	Ve2T2F3	TTGAGCAATGAGCGG ATCTCT
K1T2F1	ATTCCCGATGCCTTT CCG	K1T2F2	TTGGGAACAATGATA TGAGTGGTG	K1T2F3	TGGTGATTTTCCATG CTTGTTG
K1T2R1	AGCACTTGAAGATAG GGTGCAATTA	K1T2R2	TTACATATGGATTTT GGCACAATACC	K1T2R3	GTCTGCGGGAATTGA GGAAGT
K2T2F1	GCTCAATTCATGATG CCTTTCC	K2T2F2	CTTGGGAACAATCAT ATGAGTGGTAC	K2T2F3	GTGGTACTTTTCTT GCTTGTTGA
K2T2R1	TCAAGCACTTGAAGG TAGGTTGC	K2T2R2	CATATGGATTTTGGC ATAGTTCCATATA	K2T2R3	ATGTCTGTGGGAATT GAGCAAGA
Ve1T3F1	CAACTTCATGGGGAA ATACCTTATTG	Ve1T3F2	CCATCTAAATCTTTC CCACAATCAT	Ve1T3F3	CTAACCAGCTCCAAG GGAAGATT
Ve1T4F1	TCACAGGCAGAATCC CATCAT	Ve1T4F2	ACACCTGGAGTCCTT AGACCTCTC	Ve1T4F3	AATCCCATCAACCCT TGCAA
Ve2PR1	CTGCAATCTGAATTT TGACTCCAT	Ve2PR2	TGTCCTTCAGTTGAA GCAACAAAG	Ve2PR3	GTAAGGCATTGACCA GAGACGA

3.3.2 Ciljana pomnožitev obrobni regij s TAIL-PCR

Vse korake pomnoževanja bočnih NZ s TAIL-PCR smo izvedli v aparaturi »Biometra Tgradient Thermocycler« (Biometra, ZDA) po postopku, podanem v Liu in sod. (1995), le da smo uporabili *Taq* polimerazo *DreamTaq* (Thermo Scientific, ZDA). Za vsako kombinacijo SZO-AD smo izvedli tri neodvisne TAIL-PCR poskuse.

Za primarno TAIL-PCR so reakcijske mešanice s skupnim volumnom 20 µl vsebovale 1X *DreamTaq* Buffer (Fermentas, iz 10X založne raztopine), 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 0,8 U encima *DreamTaq* in 200 µM koncentracijo specifičnega SZO za primarno TAIL-PCR. V posamezne reakcijske mešanice smo v primarni TAIL-PCR dodali 2 µM koncentracijo AD1 ali AD6, 3 µM AD2, ali pa 4 µM AD3, AD4 oz. AD5.

V reakcijsko mešanico sekundarne TAIL-PCR smo namesto rastlinske DNA dodali 1000-krat razredčen produkt prvega pomnoževanja (1 µl PCR produkta, predhodno v razmerju 1:50 zredčenega v bidestilirani vodi). V to mešanico smo dodali 0,6 U *DreamTaq* ter SZO sekundarne TAIL-PCR. Za vsak vzorec smo uporabili enak AD kot v primarni TAIL-PCR, le da tokrat v koncentraciji 1,5 µM za AD1 in AD6 ter 2 µM za AD2, AD3, AD4 oz. AD5. Reakcijska mešanica terciarne TAIL-PCR je bila identična tisti iz sekundarne TAIL-PCR, le da smo tokrat kot matrico dodali 1000X razredčen produkt sekundarne TAIL-PCR in uporabili specifični začetni oligonukleotid terciarne TAIL-PCR.

Pogoji pomnoževanja po posameznih fazah TAIL-PCR so podani v preglednici 4.

Preglednica 4: Pogoji pomnoževanja za izvedbo TAIL-PCR (Liu in sod., 1995)
Table 4: Conditions used for TAIL-PCR amplification (Liu et. al, 1995)

Stopnja izvedbe TAIL	Št ciklov	Program pomnoževanja v ciklu
1°	1	1 min na 93 °C, 1 min na 95 °C
	5	1 min na 94 °C, 1 min na 62 °C, 2,5 min na 72 °C
	1	1 min na 94 °C, 2 min postopnega ohlajanja do 72 °C, 2,5 min na 72 °C
	15	30 s na 94 °C, 1 min na 68 °C, 2,5 min na 72 °C
		30 s na 94 °C, 1 min na 68 °C, 2,5 min na 72 °C
		30 s na 94 °C, 1 min na 44 °C, 2,5 min na 72 °C
	1	5 min na 72 °C
2°	12	30 s na 94 °C, 1 min na 68 °C, 2,5 min na 72 °C
		30 s na 94 °C, 1 min na 68 °C, 2,5 min na 72 °C
		30 s na 94 °C, 1 min na 44 °C, 2,5 min na 72 °C
	1	5 min na 72 °C
3°	20	1 min na 94 °C, 1 min na 44 °C, 2,5 min na 72 °C
	1	5 min na 72 °C

3.3.3 Izrezovanje in čiščenje fragmentov iz agaroznega gela

Produkte terciarne TAIL-PCR reakcije smo ločili na 1,2% agaroznem gelu po postopku, opisanem v poglavju 1.2.5. Posamezne izrazite fragmente, pomnožene v TAIL-PCR, smo skrbno izrezali s pomočjo skalpela. Izrezane fragmente smo očistili preostale agaroze s

kitom Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Izrezan košček gela smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko in stehali. Nato smo za vsakih 100 mg gela dodali 450 μ l pufru za vezavo (Binding Buffer) in 50 μ l pufru za pretvorbo TBE (TBE Conversion Buffer, proizvajalec sestave ne podaja). Slednji nevtralizira inhibitorni učinek TBE pufru na vezavo DNA na glinene delce. Mešanico smo z občasnim pomešanjem inkubirali v vodni kopeli pri 55 °C 5 minut oz. do popolne raztopitve koščka gela. Nato smo dodali 8 μ l predhodno z vrtinčenjem resuspendirane glinene suspenzije (ang. silica suspension), dobro premešali s stresanjem in inkubirali 5 minut pri 55 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 10 s na 10.000 g in odlili supernatant. Pelet smo resuspendirali v 500 μ l ledeno hladnega pufru za spiranje (Washing Buffer) z močnim drgnjenjem mikrocentrifugirke ob stojalo za mikrocentrifugirke, nakar smo centrifugirali 10 s pri 10.000 g. Postopek spiranja smo ponovili še dvakrat in preostali pelet posušili na zraku. Pelet smo resuspendirali v 20 μ l TdE pufru (IDT) in suspenzijo inkubirali 5 minut pri 55 °C. Suspenzijo smo nato spet centrifugirali 10 s pri 10.000 g. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in ga shranili na -20 °C.

V kolikor smo opazili uspešno pomnožitev, smo PCR produktom neposredno določili NZ po Sangerju po metodi 3.2.7. Prejeta NZ smo uredili in jih z orodjem BLASTx primerjali z bazo nr. V kolikor smo prejeli zadetek z Ve1-podobnimi zaporedji, smo določili NZ posameznih fragmentov z gela. V nasprotnem primeru smo produkt PCR reakcije izločili iz nadaljnjih postopkov.

3.3.4 Določitev NZ izrezanih fragmentov

Pridobljenim PCR fragmentom smo neposredno določili NZ enako kot za očiščene PCR produkte po protokolu, podanem v točki 1.2.7. Sekvenčno reakcijo smo izvedli z ustreznim specifičnim začetnim oligonukleotidom, uporabljenim v terciarni TAIL-PCR, iz katere je izviral fragment. Pridobljena NZ smo uredili v programu CodonCode Aligner 3.7.1 z uporabo avtomatskega odstranjevanja NZ prenizke kakovosti. Preverili smo istovetnost urejenih NZ, t.j. podobnost z Ve1-podobnimi zaporedji v BLASTx analizi z bazo nr na strežniku NCBI.

3.3.5 Molekulska kloniranje izčiščenih fragmentov

V kolikor smo po neposrednem določanju NZ iz fragmentov prejeli zaporedja, podobna paradižnikovemu Ve1, smo izvedli kloniranje eluirane DNA iz izvornih fragmentov.

3.3.5.1 Ligacija

Posamezne izbrane fragmente smo ligirali v plazmid pGEM® T-Easy s kitom pGem T-Easy Vector System (Promega, Madison, WI, ZDA). Gre za lineariziran vektor s timidinskima mononukleotidnima štrlečima koncema na obeh straneh molekule, kar onemogoča ponovno cirkularizacijo plazmida ob ligaciji. Ta lastnost obenem omogoča kloniranje PCR produktov DNA polimeraz brez 3'- 5' eksonukleazne aktivnosti. Takšni produkti imajo komplementarne adeninske štrleče konce. Slednji imajo afiniteto do

timidinskih štrlečih koncev vektorja, kar omogoča visoko uspešnost ligacije. Vektor omogoča modro-belo selekcijo in selekcijo s pomočjo ampicilinskih antibiotikov.

Ligacijske mešanice skupnega volumna 6 μ l smo pripravili na ledu. K 2 μ l vsakega očiščenega fragmenta smo dodali 3 μ l pufra 2X Rapid Ligation Buffer, 0,5 μ l raztopine plazmida pGEM® T-Easy in 0,5 μ l T4 DNA ligaze. Vse dodane komponente so sestavni deli komercialnega kita. Ligacijske mešanice smo premešali s stresanjem in kratko centrifugirali, nato pa inkubirali čez noč pri -4 °C.

3.3.5.2 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5- α

Kemokompetentne celice *E. coli* seva DH5- α smo pripravili po SEM metodi (Inoue in sod., 1990). Metoda temelji na počasnem gojenju bakterij pri 18 °C z dodatkom prebitka aminokisline glicina v gojišče, kar skupaj poveča permeabilnost celične membrane in s tem višjo raven uspešnosti transformacije celic. Zaradi postopne izgube kompetence pri shranjenih celicah je potrebno zalogo le-teh letno osvežiti.

10 μ l zamrznjene kulture kemokompetentnega seva DH5- α , hranjene pri -80 °C, smo razmazali po trdnem LB (Luria-Bertani) gojišču [1% NaCl, 1% tripton (Sigma), 0,5 % kvasni ekstrakt (Sigma), 2 % Difco® agar (Becton Dickinson)]. Nacepljeno gojišče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Po pet kolonij smo s cepilno zanko prenesli v 100 ml SOB gojišča (2 % tripton, 0,5 % kvasni ekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, končni pH 6,8-7,0) z dodatkom 1 % glicina. Inokulirano gojišče smo gojili pri 18 °C in občasno izmerili gostoto celic pri 600 nm s spektrofotometrom (Eppendorf Bio Photometer RS 232C). Ko je gostota celic dosegla vrednost 0,6 smo kulturo prelili v 250 ml centrifugirko in jo 10 min hladili na ledu, nato pa 10 min centrifugirali pri 5000 rpm in 4 °C (centrifuga Beckman J2-HS, rotor JA-6) Supernatant smo odlili, pelet pa z rahlim stresanjem resuspendirali v 32 ml ledeno hladnega TB pufra [10 mM pipes, 55 mM MnCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7, filtrsko sterilizirano]. Suspenzijo smo inkubirali 10 min na ledu, nato pa centrifugirali 10 min pri 3000 rpm in 4 °C. Supernatant smo skrbno odlili in pelet resuspendirali v 8 ml TB pufra in dodali DMSO do končne koncentracije 7 %, nastalo suspenzijo rahlo premešali in 10 min inkubirali na ledu. Suspenzijo smo razdelili na 450 μ l alikvotov v predhodno ohlajene 1,5 ml mikrocentrifugirke, ki smo jih nemudoma zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri -80 °C do uporabe.

Potrebno število alikvotov celic DH5- α smo odtalili na ledu. Odtaljeno suspenzijo smo rahlo premešali in razdelili po 100 μ l v predhodno na ledu ohlajene 1,5 ml mikrocentrifugirke. V suspenzijo smo dodali 2 μ l ligacijske mešanice iz koraka 1.3.4.1, mikrocentrifugirko rahlo pretresli in jo 30 min inkubirali na ledu. Nato smo mikrocentrifugirke postavili v vodno kopel na 42 °C za natanko 45 s. Celice smo za 5 min ohladili na ledu in jim dodali 900 μ l tekočega LB gojišča [10 g/l triptona (Sigma-Aldrich), 5 g/l kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich), 10 g/l NaCl; po avtoklaviranju alikvotirano v 2 ml mikrocentrifugirke in shranjeno pri -20 °C do uporabe] in jih inkubirali 1 uro pri 37 °C z rahlim stresanjem. 100 μ l bakterijske kulture smo nanесли na trdno LB selekcijsko gojišče [10 g/l triptona (Sigma-Aldrich), 5 g/l kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich), 10 g/l NaCl, 25 g/l agarja (Sigma); po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 55 °C in dodali 0,2 mM

IPTG, 40 mg/l X-Gal in 100 mg/l karbenicilina] in jo razmazali z ukrivljeno stekleno pasteurjevo pipeto do vpitja v gojišče. Ploščo smo inkubirali čez noč pri 37 °C.

3.3.5.3 Pomnožitev kloniranih insertov s PCR na osnovi kolonije

Po inkubaciji smo s plošče izbrali po 8 diskretnih belih kolonij. Z 10 µl konico pipete smo zbadli v kolonijo in konico prepipetirali v 50 µl TdE. Dobljeno suspenzijo smo vorteksirali in kratko centrifugirali. Za sprostitve celotne DNA iz suspendiranih celic smo suspenzijo s pomočjo cikličnega termostata 10 minut segrevali pri 98 °C in jo zatem ohladili na 12 °C. Suspenzijo smo vorteksirali in kratko centrifugirali.

Po 5 µl toplotno obdelane suspenzije smo uporabili kot matrico za izvedbo PCR reakcije. Za pomnožitev insertov, ligiranih v plazmid pGEM® T-Easy v posameznih bakterijskih klonih, smo uporabili začetna oligonukleotida SP6 (5'-ATTAGGTGACACTATAG-3') in T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'), ki prilegata na bočne regije plazmida v smeri inserta. Reakcijske mešanice so vsebovale 1X Utaq pufer (iz 10X založne raztopine; Fermentas), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 500 nM začetnih nukleotidov SP6 in T7 in 0,5 U encima Utaq.

Pomnoževanje v PCR smo izvedli z naslednjim programom:

- Začetna denaturacija: 5 min pri 94 °C.
- 30 ciklov: 30 s pri 94 °C, 45 s pri 57 °C in 2 min pri 72 °C.
- Končna ekstenzija 8 minut pri 72 °C.
- Ohlajevanje do 10 °C.

Ločevanje fragmentov z elektroforezo in nadaljnje postopke določanja NZ in analize pridobljenih NZ smo izvedli s postopki, opisanimi v poglavjih 3.2.5, 3.2.6 in 3.2.7.

3.3.6 Analiza pridobljenih NZ in sestavljanje NZ v soseske in nadsoseske

Pridobljena NZ smo analizirali v programu CodonCode Aligner 3.7.1. Na začetku analize smo s pomočjo v tem programu implementiranega avtomatskega algoritma odstranili dele nukleotidnih zaporedij s koncev vektorja, prisotnih na začetku pridobljenih nukleotidnih zaporedij. Identiteto zaporedij smo preverili s spletnim programom BLASTx na strežniku NCBI.

Na podlagi izvornih fragmentov TAIL-PCR smo v programu CodonCode Aligner 3.7.1 NZ kloniranih fragmentov združili v soseske pri 95 % najmanjši podobnosti zaporedij in prednastavljenimi preostalimi parametri poravnave ter združevanja v soseske. Pri enakih nastavitvah smo soseske nato združili v nadsoseske. Skupna zaporedja (ang. consensus sequences) nadsosesk smo primerjali med seboj pri 80 % najmanjši podobnosti zaporedij, da smo odkrili morebitne delne poravnave med posameznimi nadsoseskami.

3.4 IZOLACIJA IN KLONIRANJE VE1-PODOBNIH NZ HMELJA

S postopki, opisanimi v poglavju 3.3, smo uspeli pridobiti nukleotidni zaporedji popolnih kodirajočih regij dveh hmeljnih homologov Ve1 gena (GenBank akcesija AF272366.2, Kawchuk in sod., 2001) s pripadajočimi bočnimi nekodirajočimi regijami. Na podlagi teh NZ smo zasnovali dva para ZO, ki sta omogočila ločeno pomnožitev obeh genov v PCR in v končni fazi njuno kloniranje za potrebe nadaljnjih molekularskih in funkcijskih analiz.

3.4.1 Pomnožitev s PCR

Pomnoževanje v PCR smo izvedli s polimerazo Phusion® (New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Ta encim omogoča pomnožitev v PCR z do 50-krat manj napak pri prepisovanju kot običajna *Taq* DNA polimeraza. Uporabljeni začetni oligonukleotidi so podani v preglednici 5.

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje celotnih kodirajočih zaporedij hmeljnih Ve1 homologov

Table 5: Primers for complete coding region amplicification of both isolated hop Ve1 homologues

Pomnoževano NZ	Ime ZO	Nukleotidno zaporedje ZO
HLVe1-1	HLVe1F	GCTTTAGCAAACCTGAGTAAT
	HLVe1R	TTGGTTTGTCTAACTTCATCTA
HLVe1-2	HLVe2F	TCGTTTGCCCATTTTGTTC
	HLVe2R	CATGAAGGCCTTCTTGGTCT

Kot matrico smo uporabili DNA kultivarja 'Wye Target'. Reakcijske mešanice so vsebovale 1X Phusion® HF Buffer (založna koncentracija 5X), 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 500 nM začetnih nukleotidov in 0,5 U encima Phusion®.

Optimalne pogoje pomnoževanja smo za oba para ZO določili s PCR s temperaturnim gradientom. PCR smo za 10 vzorcev izvedli v sicer identičnih pogojih, a za posamezne vzorce pri različnih temperaturah prileganja v razponu med 48 °C in 62 °C. Posamezne nastavljene temperature prileganja so podane na sliki 16. Po ločitvi produktov PCR na agaroznem gelu smo kot optimalno temperaturo določili tisto, pri kateri smo v obeh primerih pridobili najbolj izrazit pomnožen fragment. Ta je bila v obeh primerih 62 °C (glej poglavje 4.3).

Pomnoževanje v PCR smo izvedli z naslednjim programom:

- Začetna denaturacija: 3 min pri 98 °C,
- 33 ciklov: 10 s pri 98 °C, 30 s pri 62 °C in 3 min pri 72 °C,
- končna ekstenzija 8 minut pri 72 °C,
- ohlajanje do 10 °C.

3.4.2 Kloniranje

Pomnožene fragmente smo izolirali iz gela skladno s postopkom 3.3.3, le da smo za elektroforetsko ločevanje fragmentov uporabili 0,8 % gel.

DNA polimeraza Phusion® ima eksonukleazno aktivnost, zato produkti pomnoževanja nimajo pripetih monoadeninskih prostih koncev. Ker so takšni konci potrebni za uspešno ligacijo v plazmid pGEM T-Easy, smo izvedli postopek dodajanja A koncev na pomnožene fragmente. Najprej smo pripravili redčitve očiščenih produktov PCR reakcij v razmerju 1:100 v bidestilirani vodi. Po 2 µl redčenih produktov smo dodali v 20 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 1X DreamTaq Buffer (Fermentas, iz 10X založne raztopine), 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 0,8 U encima DreamTaq (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, ZDA) in 500 nM začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za izhodiščno pomnožitev z encimom Phusion®.

Pomnoževanje smo izvedli z naslednjim programom za izvedbo PCR:

- 5 minut pri 95 °C,
- 10 ciklov: 30 s pri 95 °C, 45 s pri 60 °C in 4 min pri 72 °C,
- 8 minut pri 72.5 °C,
- ohladitev na 10 °C.

S tako modificiranim PCR fragmentom smo izvedli ligacijo v pGem T-Easy® po postopku 3.3.5.1. Transformacijo kompetentnih celic DH5-α smo izvedli po postopku 3.3.5.2. Istovetnost kloniranih DNA fragmentov smo preverili s ColonyPCR po postopku 3.3.5.3.

3.4.3 Čiščenje produktov reakcij PCR in določevanje NZ

PCR na ravni kolonij celic, vsebujočih klonirana zaporedja HLVe1-1 in HLVe1-2, smo izvedli po postopkih 3.2.6 in 3.2.7. Za vsak produkt smo pripravili 8 posameznih sekvenčnih reakcij za HLVe1-1 oz. 7 za HLVe1-2, in sicer z začetnima oligonukleotidoma SP6 in T7 ter z dodatnimi za NZ HLVe1-1 oz. HLVe1-2 specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, podanimi v preglednici 6.

Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za pridobivanje nukleotidnih zaporedij HLVe1-1 oz. HLVe1-2

Table 6: Sequencing primers used for sequencing HLVe1-1 and HLVe1-2

Tarčno zaporedje:			
HLVe1-1		HLVe1-2	
Ime	Nukl. zap.	Ime	Nukl. zap. 5'-3'
HLVe1-S01	TTGGTCACTCTTGATATCTCCA	HLVe2-S01	AGGTATCTCCTCGTGAAGTTG
HLVe1-S02	TCATAGGAGCCCTTCCACAT	HLVe2-S02	TTGGTCACTCTTGATATCTCCA
HLVe1-S03	CCATCTAAATCTTCCCACAAT	HLVe2-S03	CTTCACTAGACCTTTCTTACAA
HLVe1-S04	TTTGTTTCCACGATGATAATTC	HLVe2-S04	CACTCATATCATTGTTCCCAA
HLVe1-S05	TCACAGGCAGAATCCCATCAT	HLVe2-S05	CTTTACTTCCTCAATTCCCGCA
HLVe1-S06	CTTTACTTCCTCAATTCCCGCA		

Pridobljene kromatograme smo pregledali in uredili v programu CodonCode Aligner 3.7.1. Z avtomatskim postopkom, ki ga nudi program, smo iz prejetih kromatogramov odstranili NZ plazmida in dele zaporedij nezadostne kvalitete. Zaporedja, izvirajoča iz posameznih klonov, smo združili v soseske. Te smo poravnali pri 95% ujemanja in 95% najnižjega deleža poravnave. V celotni populaciji zaporedij smo določili polimorfizme na ravni NZ.

3.4.4 Izolacija plazmidov

Na ploščah s selekcijskim gojiščem smo poiskali kolonije bakterij, iz katerih smo uspešno pomnožili vstavljena zaporedja HLVe1-1 ali HLVe1-2. Kolonije smo v aseptičnih pogojih zbadli s sterilnim zobotrebcem in tega odvrkli v epruveto s 5 ml gojišča LB z dodatkom 120 µg/ml karbenicilina. Epruvete smo preko noči inkubirali pri 37 °C s stresanjem pri 120 obratih na minuto.

Za izolacijo plazmida smo uporabili komercialni kit GenCatch™ Plasmid Miniprep Kit (Epoch Life Science Inc., Sugar Land, TX, ZDA). Prekonočno kulturo celic smo prelili v 1,5 ml mikrocentrifugirko in le-to 30 s centrifugirali pri 14.000 obratih na minuto (centrifuga Eppendorf 5810R). Postopek smo ponovili še dvakrat, da smo pridobili bakterije celotne prekonočne kulture v eni mikrocentrifugirki. Pelet smo z drgnjenjem ob stojalo za mikrocentrifugirke resuspendirali v 200 µl raztopine MX1 z dodano RNAzo. Nato smo dodali 250 µl raztopine MX2, previdno premešali s prevračanjem mikrocentrifugirk in pustili stati 5 minut. Zatam smo dodali 350 µl raztopine MX3, mikrocentrifugirke rahlo premešali in jih centrifugirali 10 minut pri 14.000 obratih na minuto. Supernatant smo prenesli na GenCatch™ plus kolono in centrifugirali 1 min pri 5.000 obratih na minuto. Postopek smo ponovili za preostanek supernatanta. Kolono smo najprej spirali s 500 µl raztopine WN pri 7.000 obr/min za 1 min, zatam pa še s 700 µl raztopine WS pri 9.000 obr/min za 1 min. Kolono smo posušili s končnim centrifugiranjem pri 13.000 obr/min za 2 min. Posušeno kolono smo prestavili v svežo 1,5 ml mikrocentrifugirko, nanjo kanili 50 µl elucijske raztopine EB in jo inkubirali 2 minuti na sobni temperaturi. Nato smo mikrocentrifugirko s kolono centrifugirali 30 s pri 13.000 obr/min. Koncentracijo plazmidne DNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija).

3.4.5 Popravljanje mutacij v kloniranih Ve1-podobnih zaporedjih hmelja

Namen kloniranja celotnih kodirajočih regij HLVe1-2 je bil med drugim pridobitev plazmidov s pravilnimi zaporedji alelov tega gena za potrebe funkcijskih analiz. Za dva od treh alelov (HLVe1-2A in HLVe1-2T) nismo uspeli klonirati za nadaljnje postopke uporabnega zaporedja, saj so vsi kloni vsebovali med procesom PCR vnešene mutacije. Za HLVe1-2B smo uspeli klonirati ustrezno NZ. Za vsakega od alelov smo izbrali klon, ki je vseboval čim manj mutacij in je omogočal njihovo čimbolj enostavno odstranitev.

3.4.5.1 Ciljana mutageneza

Za ciljano mutagenezo smo uporabili QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, CA, ZDA). Ciljana mutageneza s tem kitom poteka v dveh

korakih. V prvem koraku izvedemo sintezo plazmida s tarčno mutacijo, v drugem koraku pa razgradimo izhodiščni, matrični plazmid. Kot matrico smo uporabili klon HLVe1-2A-1. Na podlagi razlik med klonom in skupnim zaporedjem HLVe1-2A smo pripravili dva para komplementarnih začetnih oligonukleotidov (preglednica 7).

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za popravljanje klona Ve2A-1 s ciljno mutagenezo
Table 7: Site-directed mutagenesis primers for cloned Ve2A-1 sequence mending

Ime zač. olig.	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida
A1cmF1	CGCAATGGTTTACGGATTTCTCAAATTTGACCTCCTTGGC
A1cmR1	GCCAAGGAGGTCAAATTTGAGAAATCCGTAAACCATTGCG
A1cmF2	TGGTTTACGGATTTCTCAAATTTGACCTCCTTGGCTCTT
A1cmR2	AAGAGCCAAGGAGGTCAAATTTGAGAAATCCGTAAACCA

Reakcijske mešanice volumna 50 μ l smo pripravili z naslednjimi koncentracijami reagentov: 1X reakcijska raztopina (iz 10X založne raztopine), 100 ng plazmida, 125 ng vsakega od obeh začetnih oligonukleotidov, 1 μ l priložene raztopine štirih dNTP in 1 μ l reagenta QuikSolution (proizvajalec ne navaja sestave teh reagentov).

Reakcijo smo v cikličnem termostatu izvedli z naslednjim programom:

- 2 minuti pri 95 °C,
- 18 ciklov: 20 sekund pri 95 °C, 10 sekund pri 60 °C, 2 minuti pri 68 °C,
- 5 minut pri 68 °C.

V drugem delu postopka smo v produkt pravkar izvedene reakcije dodali 2 μ l restriksijskega encima *DpnI* (komponenta kita), nežno premešali s stresanjem in inkubirali 5 minut pri 37 °C. Za namnožitev tarčno mutiranega plazmida smo z 2 μ l reakcijske mešanice transformirali kompetentne celice DH5- α po postopku 3.3.4.2.

3.4.5.2 Digestija z restriksijskimi encimi in ligacija

S klonoma HLVe1-2T-9 in HLVe1-2T-10 smo izvedli popolno digestijo z restriksijskima encimoma XcmI in NheI. Razrez smo izvedli v skupnem volumnu 20 μ l z naslednjimi komponentami: 1X pufer NEB2 (Iz 10X založne koncentracije; New England Biolabs), 5 U XcmI (založna raztopina 5 U/ μ l; New England Biolabs), 5 U μ l NheI (založna raztopina 10 U/ μ l; New England Biolabs) in 2 μ l plazmida. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 30 minut pri 37°C, da smo dosegli popolno digestijo plazmida.

Daljši fragment HLVe1-2T-9 in krajši fragment HLVe1-2T-10 smo izrezali iz gela in posamič očistili po postopku 3.3.3. Ligacijo obeh izrezanih fragmentov smo izvedli po postopku 3.3.5.1, le da smo namesto 2 μ l očiščenega fragmenta iz PCR reakcije in 0,5 μ l vektorja pGem® T-Easy dodali po 1,25 μ l vsakega od fragmentov.

3.5 KARAKTERIZACIJA PRIDOBLENIH HMELJNIH VE1-PODOBNIH NZ

Za določitev lastnosti HLVe1-1 in HLVe1-2 smo izvedli več analiz NZ. Kodogene regije obeh genov smo določili s poravnavo NZ kloniranih zaporedij z BLASTx in nr baze AZ. Na podlagi poravnave smo lahko določili položaj START in STOP kodonov, ki smo jih nato poiskali v NZ v ustreznem bralnem okvirju in jih označili.

Za določitev podobnosti HLVe1-1 in HLVe1-2 na ravni AZ smo pripravili poravnavo s paradižnikovim Ve1 in bombaževim Gbve1. Poravnavo smo pripravili v spletnem programu MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Goujon in sod, 2010) in jo prikazali s spletnim programom Boxshade 3.2, ki omogoča barvno označevanje podobnosti v poravnavi (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) (Hofmann in Baron, 1996).

Število LRR regij v posameznih alelih smo določili na podlagi poravnave z Ve1 genom paradižnika, za katerega je na voljo natančna anotacija domen (Kawchuk in sod., 2001). Na podlagi poravnave smo določili tudi položaj dveh drugih domen, in sicer s kislimi AKO bogato domeno (AC) in citoplazmatski rep (CT). Mesta transmembranskih domen v zaporedjih smo določili s programom TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh in sod., 2001), signalne peptide pa s programom SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen in sod., 2011).

V postopku TAIL-PCR pridobljeni NZ končnih delov promotorjev obeh genov smo analizirali s spletnim programom PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot in sod., 2002) in tako določili prisotnost in položaj za rastlinske promotorje značilnih vezavnih motivov.

3.6 ANALIZA SEGREGACIJE VE1-PODOBNIH NZ HMELJA

Analizo segregacije smo izvedli po postopku, opisanem za na podlagi EST pripravljenem naboru mikrosatelitnih označevalcev, ki je podan v Jakše in sod. (2011). Po dodajanju v pričujoči študiji proizvedenih MO na okvirno karto povezanosti in primerjavi z opisanimi skupinami povezanosti (Jakše in sod., 2011) smo lahko ocenili doprinos novih MO h kakovosti okvirne karte povezanosti križanja 'Wye Target' x BL2/1.

3.6.1 Priprava molekulskih označevalcev iz zaporedij HLVe1-1 in HLVe1-2

Na podlagi poravnave med posameznimi aleli HLVe1-1 oz. HLVe1-2 smo pripravili pare začetnih oligonukleotidov za ločeno pomnožitev odsekov obeh genov (preglednica 8). ZO smo pripravili z ozirom na poravnavo NZ obeh genov in v območju NZ, kjer je smo zaznali največ predvidenih polimorfizmov na ravni NZ. Na ta način pripravljena molekulska označevalca (MO) smo poimenovali HLVe1-1M in HLVe1-2M.

Preglednica 8: Para začetnih oligonukleotidov za pomnožitev MO HLVe1-1M in HLVe1-2M
Table 8: Primer pairs used for amplification of sequence-based markers HLVe1-1M and HLVe1-2M

Izvor amplikona	Ime zač. oligonukl.	Nukl. zap. zač. oligonukl.
HLVe1-1	HLVe1M-FOR	GTGGAGCCTAATGTCGCTTT
	HLVe1M-REV	CCAATCTCATCTGGGATCGTA
HLVe1-2	HLVe2M-FOR	TAACTGGCGAAATTCCATCC
	HLVe2M-REV	TGAGGAAGTAAAGTTATTGCT

Pomnoževanje v PCR, vizualizacijo PCR produktov z elektroforezo, in določitev NZ za oba MO smo izvedli enako kot v postopkih, opisanih v poglavjih 1.2.5, 1.2.6 in 1.2.7 in 1.2.9. Samo MO HLVe1-2M, ki je kazal očitno segregacijo, smo izvrednotili na celotnem potomstvu križanja.

3.6.2 Analiza segregacije HLVe1-1

Pri MO HLVe1-1M nismo zaznali segregacije pri potomcih navkljub očitnim polimorfizmom v nukleotidnih zaporedjih staršev. Izvedli smo dodatne analize, s katerimi smo želeli testirati hipotezo, da gre v primeru 'Wye Target' na tem predvidenem lokusu za par podvojenih genov. V tem primeru bi pri potomcih križanja zaznali prisotnost polimorfizmov obeh oblik HLVe1-1 iz 'Wye Target'.

Status polimorfizmov nukleotidnih NZ MO HLVe1-1M smo zato določili še za dodatnih 8 potomcev križanja. Fragmente, dobljene ob pomnožitvi HLVe1-1M iz DNA obeh staršev in potomca 58-18 smo klonirali in določili NZ po 16 klonov iz vsakega ligacijskega poskusa.

Za oba starša in šest potomcev smo pridobili celotno NZ gena HLVe1-1. Pomnoževanje smo izvedli po postopku 3.4.1 z začetnimi oligonukleotidi HLVe1F in HLVe1R. Produkta PCR smo vizualizirali na gelu po postopku 3.2.5, jih očistili po postopku 3.2.6 in jim določili NZ po postopku 3.2.7 z ZO, podanimi v prvem stolpcu preglednice 6. Pridobljena NZ smo analizirali po postopku 3.2.8

3.7 KARTIRANJE EST-RGA IN HLVE1-2M

Vseh 15 EST-RGA MO ter HLVe1-2M smo uredili v ustrezen format za analizo s programom JoinMap 3.0. Dodali smo jih k vhodni datoteki s 118 mikrosatelitnimi MO, za katere je že bila predhodno pripravljena in opisana karta povezanosti (Jakše in sod., 2011).

V programu MS Excel 2007 smo za določitev statistično pomembnega odstopanja od predvidenega razmerja določenih genotipov ob predpostavki neodvisne segregacije izračunali p-vrednost za hi-kvadrat razporeditev (χ^2) s formulo CHITEST.

V pričujoči študiji proizvedene MO smo dodali na okvirno karto križanja 'Wye Target' x BL2/1. V kartiranju smo uporabili vse MO ne glede na dobljene χ^2 vrednosti. Kartiranje smo izvedli v programu JoinMap 3.0 (Van Ooijen in Voorrips, 2001) z nastavitvami parametrov kartiranja, predlaganimi za analizo psevd testnih križanj (Grattapaglia in Sederoff, 1994). Skupine povezanosti smo prikazali s programom MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

3.8 FILOGENETSKE ANALIZE VE1-PODOBNIH ZAPOREDIJ

Raznolikost HLVe1-1 in HLVe1-2 smo ocenili z izvedbo filogenetske analize obeh lokusov na ravni NZ za izbrane divje akcesije hmelja iz različnih delov sveta. Značilna hmeljeva Ve1-podobna zaporedja smo na ravni AZ umestili v filogenijo Ve1-podobnih zaporedij ostalih rastlinskih vrst.

3.8.1 Filogenetske analize HLVe1-1 in HLVe1-2 lokusov hmelja

Za določitev stopnje raznolikosti HLVe1-1 in HLVe1-2 genov v različnih dostopnih hmeljnih akcesijah smo za izbrane akcesije hmelja določili NZ celotnih kodirajočih regij. Akcesije smo izbrali na podlagi obsežnih analiz variabilnosti obeh lokusov, ki so obsegale pomnoževanje celotnih zaporedij obeh lokusov in določevanje NZ variabilnih regij za skupno 144 akcesij hmelja (Mojca Grošelj, diplomsko delo v teku). Izbrali smo akcesije, s katerimi smo zaobjeli zaznano alelno pestrost. Ker nismo uspeli zagotoviti ponovljivega postopka kloniranja in ker je bila empirično določena uspešnost tega zelo nizka, smo analizo omejili na akcesije brez prisotnih polimorfizmov v heterozigotnem stanju na analiziranih odsekih NZ. Uporabljene akcesije so podane v preglednici 1.

Pomnoževanje smo izvedli po postopku 3.4.1. Nukleotidna zaporedja smo določili s po 8 ZO za vsakega od pomnoženih fragmentov, in sicer z obema ZO za pomnoževanje ter z ZO, podanimi v preglednici 9. Posamezna NZ iz istih akcesij smo združili v celotno NZ HLVe1-1 oz. HLVe1-2 s programom CodonCode aligner 3.7.1.

Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi za pridobivanje nukleotidnih zaporedij HLVe1-1 oz. HLVe1-2 iz hmeljnih akcesij

Table 9: Sequencing primers for HLVe1-1 and HLVe1-2 amplicons retrieved from hop accessions

Tarčno zaporedje:			
HLVe1-1		HLVe1-2	
Ime	Nukl. zap. (5' proti 3')	Ime	Nukl. zap. (5' proti 3')
HLVe1-F01	CAACTCTACGATCCCAGATGA GAT	HLVe2-F01	TTCAACTCTACGATCCCAGATGA
HLVe1-F02	ATTTTCCAGGTACCAACACTA CGA	HLVe2-F02	TTGTCAGTGATTGCGCTGAAT
HLVe1-F03	CCTGAGTTTCCAATTCCTAGT TCC	HLVe2-F03	CTTTGGAACCTGTCCATGTTAGACT
HLVe1-F04	GACCTACATTCTAACCAGCTC CAA	HLVe2-F04	CAGCAATAATCTAGAAGGGCAACT
HLVe1-F05	CCATGCTTGTTGAAGAACATA TCC	HLVe2-F05	CAGGAACCTTATACTCCTCCTACTA GTCT
HLVe1-F06	CCTGGAGTCCTTAGACCTCTC AA	HLVe2-F06	GGAATTCGATAGAAGGGCAGAT

Za znotrajvrstno filogenetsko analizo obeh odkritih hmeljnih homologov Ve1 smo uporabili celoten nabor NZ vseh HLVe1-1 in HLVe1-2 alelov, pridobljenih ob postopku kloniranja iz kultivarja 'Wye Target' in vseh pridobljenih NZ iz analiziranih hmeljnih akcesij. Na podlagi BLASTn primerjave z NZ HLVe1-1A na spletni strani baze transkriptomskih zaporedij medicinskih rastlin (<http://medicinalplantgenomics.msu.edu>) smo pridobili NZ konopljinega Ve1-podobnega zaporedja, imenovano

»csa_locus_3180_iso_1_len_3563_ver_2«, ki smo jo v poravnavo vključili kot zunanjo skupino (ang. outgroup). Poravnavo smo pripravili z algoritmom MUSCLE, implementiranim v programu CodonCode Aligner 3.7.1. Iz poravnave smo pred nadaljnjo analizo za zaporedja HLVe1-1 odstranili končni mikrosatelit in v enem primeru intron.

Dobljeno poravnavo smo uvozili v program DnaSP5 (Librado in Rozas, 2009). Poravnave smo preliminarно iz vrednotili z izračunom variabilnih mest ter mest, ki so informativna za metodo varčnosti. Za obe poravnavi zaporedij posebej smo izračunali število mutacij med pari (π) ter povprečno število sinonimnih oz. nesinonimnih mutacij čez celotno zaporedje poravnave. Izračunali smo tudi njuno razmerje π_a/π_s . Vrednosti slednjega predstavlja oceno, v kolikšni meri je prisotna pozitivna oz. negativna selekcija na analiziranem lokusu v izbrani populaciji. Vrednost $\pi_a/\pi_s > 1$ kaže na pozitivno selekcijo, vrednost $\pi_a/\pi_s < 1$ pa na stabilizirajočo (ohranjajočo) selekcijo. Vrednost π_a/π_s okrog 1 pomeni, da je za lokus značilna nevtralna selekcija.

3.8.2 Vključitev HLVe1-1 v filogenijo Ve1-podobnih zaporedij

Za izvedbo medvrstnih filogenetskih analiz Ve1-podobnih zaporedij smo uporabili AZ zaporedja alelov HLVe1-1A in HLVe1-2A in konopljinega zaporedja CsVe1, katerega AK zaporedje smo pridobili s programom Translate, ki je del programskega paketa EMBOSS. Pridobili smo AK zaporedja Ve1 in Ve2 paradižnika, dveh genov bombaža – GbVe (EU855795.1, prevedeno s programom Translate strežnika ExPaSy) in Gbve1 (Zhang in sod., 2012) –, Ve1-podobno zaporedje iz mete (mVe1; ACB99689.1), in Ve1-podobno zaporedje iz vinske trte (CAO63881.1). Poravnavo na ravni AZ smo opravili v spletnem programu MUSCLE (EBI Tools, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Izvedli smo le poravnavo LRR regij beljakovin, pri čemer smo zaporedja preostalih domen predhodno odstranili iz posameznih zaporedij po MUSCLE poravnavi z zaporedjem Ve1 iz paradižnika, ki smo mu predhodno anotirali lokacije posameznih domen, navedenih v literaturi (Kawchuk in sod., 2001) po postopku, opisanem v točki 3.5.

3.8.3 Določitev filogenetskih dreves

Obe filogenetski drevesi smo določili po enakem postopku. S programom Modelgenerator 0.851, namenjenim določanju modela evolucije na podlagi razlik v hitrosti spreminjanja posameznih mest v zaporedju, smo določili najustreznejši model evolucije za izračun filogenetskih dreves. Model smo določili pri šestih kategorijah gama funkcije, kot kriterij izbire pa uporabili AIC2 (ang. Akaike information criterion 2).

S programom MEGA5 smo izrisali filogenetsko drevo po metodi največjega verjetja (ML, ang. Maximum Likelihood) ob implementaciji najustreznejšega modela evolucije (ta sta za obe analizi – NZ in AZ - navedeni v poglavju 4.7.1 oz. 4.7.2). Podporo določenih vozlišč smo v obeh primerih izračunali z metodo vezanja (ang. bootstrap) s 1000 ponovitvami.

3.9 PREDLOŽITEV NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ V GENBANK

Vsa nukleotidna zaporedja, ki smo jih pridobili v pričujoči raziskavi, smo predložili v javno podatkovno bazo NZ GenBank (Benson in sod., 2005). Potrebno pripravo NZ v ustreznem formatu smo izvedli s programom Sequin in tako pripravljeno zaporedje poslali v GenBank, kjer so jim bile dodeljene pristopne (akcesijske) številke (Preglednica 10).

Preglednica 10: Dodeljene pristopne številke zaporedij za bazo GenBank, ki smo jih pridobili v sklopu naloge

Table 10: Assigned GenBank accession numbers for sequences, retrieved within the scope of the present dissertation

EST-RGA zaporedja			Hmeljni homologi Ve1 gena		
Ime NZ	Izvor	GB akcesija	Ime NZ	Izvor	GB akcesija
HL54	BL2/1	KJ647401	HLVe1-1A	Wye Target	KJ647424
HL191	Wye Target	KJ647402	HLVe1-1B	Wye Target	KJ647425
HL428	Wye Target	KJ647403	HLVe1-1T	Wye Target	KJ647426
HL931	Wye Target	KJ647404	HLVe1-2A	Wye Target	KJ647427
HL1273	Wye Target	KJ647405	HLVe1-2B	Wye Target	KJ647428
HL1641	Wye Target	KJ647406	HLVe1-1.1	1019.041	KJ647429
HL2861	Wye Target	KJ647407	HLVe1-1.2	1401.001	KJ647430
HL3061	Wye Target	KJ647408	HLVe1-1.3	BL2/1	KJ647431
HL3080	Wye Target	KJ647409	HLVe1-1.4	492.002	KJ647432
HL5290*	Wye Target		HLVe1-1.5	755.002	KJ647433
HL5408	Wye Target	KJ647410	HLVe1-1.6	91.002	KJ647434
HL5623	Wye Target	KJ647411	HLVe1-1.7	A12	KJ647435
HL5637	Wye Target	KJ647412	HLVe1-1.8	AH1	KJ647436
HL5894	Wye Target	KJ647413	HLVe1-1.9	K5	KJ647437
HL5980	BL2/1	KJ647414	HLVe1-2.1	1001.001	KJ647438
HL6041	Wye Target	KJ647415	HLVe1-2.2	1019.001	KJ647439
HL6293	Wye Target	KJ647416	HLVe1-2.3	1367.001	KJ647440
HL7050	Wye Target	KJ647417	HLVe1-2.4	1401.001	KJ647441
HL7319	BL2/1	KJ647418	HLVe1-2.5	71.001	KJ647442
HL7418	BL2/1	KJ647419	HLVe1-2.6	Cluster	KJ647443
HL8570	Wye Target	KJ647420	HLVe1-2.7	Comet	KJ647444
HL8710	BL2/1	KJ647421	HLVe1-2.8	K5	KJ647445
HL9399	BL2/1	KJ647422	HLVe1-2.9	OB21	KJ647446
HL9550	BL2/1	KJ647423			

* NZ HL5290 je dolgo 162 bp. GenBank ne dopušča vnosa zaporedij pod 200 bp dolžine, zato zanj nismo prejeli akcesijske številke. Zaporedje HL5290 v FASTA formatu je podano v prilogi B.

4 REZULTATI

4.1 NA PODLAGI EST PRIPRAVLJENI R GENSKI MO HMELJA

4.1.1 Analiza potencialnih RGA-EST z orodjem BLAST

V preliminarni analizi s programom HMMER je bilo izmed 9789 preiskanih sosesk hmeljnih EST najdenih 35 predvidenih EST-RGA zaporedij, kar predstavlja 0,4 % celotne baze EST. 24 od teh predstavljajo zadetki na podlagi motiva LLR domene, 8 zadetki z WRKY domeno, 2 zadetka s TIR domeno in 1 zadetek z NBS-Arc domeno. Nobeno od zaporedij ni dalo zadetka z dvema ali več različnimi domenami. S preiskovanjem neredundantne baze aminokislinskih zaporedij 'nr' s programom BLASTx smo pridobili informacijo o predvideni funkciji vseh predvidenih EST-RGA razen enega (HL6022; preglednica 10). Izmed preostalih 34 EST-RGA smo za 17 (50 %) potrdili predvideno vlogo v razvoju odpornosti na bolezen, bodisi kot R genov ali s temi povezanih v signalizacijo vpletenih beljakovin. Za preostalih 17 EST-RGA smo predvideli s pojavom odpornosti nepovezano vlogo. Sočasno z analizo funkcije smo v tem koraku pridobili nabor referenčnih genov, ki smo jih v nadaljevanju uporabili za predvidevanje mej med eksoni v ustrežajočih hmeljnih EST-RGA.

Izbrani referenčni geni so v vseh primerih izvirali iz rastlin z dobro zastopanostjo virov javno dostopnih genomskih podatkov. 23 referenčnih genov je izviralo iz belega topola (*Populus trichocarpa*), 9 iz vinske trte (*Vitis vinifera*), in po 1 iz navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) in riža (*Oryza sativa*) (preglednica 11).

Oba EST-RGA, pridobljena na podlagi pfam motiva za TIR domeno, sta se izkazala za odsek R genov razreda TIR-NBS-LRR. Izmed 23 zaporedij, v katerih smo zaznali LRR regijo, se je le 12 (52%) izkazalo za možne R gene. Edini EST-RGA z domeno NB-ARC se je izkazal za del ATPaze. Vseh 8 EST-RGA z domeno WRKY predvidoma predstavlja del prepisovalnih dejavnikov tipa WRKY, torej noben od njih ni vpleten v razvoj odpornosti rastlin na bolezen kot citoplazmatski R gen z WRKY domeno (preglednica 11).

Preglednica 11: Določitev predvidene funkcije posameznih EST-RGA na podlagi najdenih referenčnih genov. Referenčni geni so bili najdeni na podlagi BLASTx poravnave med EST-RGA zaporedji in bazo aminokislinskih zaporedij nr na strežniku NCBI. Predvidena funkcija EST-RGA je bila nato določena na podlagi opisa najboljših rezultatov BLASTx. Dolžina izhodiščnih EST-RGA je podana v prilogi A.

Table 11: Prediction of function of EST-RGAs based on found reference genes. Reference genes were mined by utilizing BLASTp alignments of EST-RGAs and the nr database of protein sequences at the NCBI website. The predicted function assigned to individual EST-RGAs is equal to the predicted function of BLASTx hits with the highest e-value. The length of EST-RGA is given in appendix A.

EST-RGA	Vsebovani <i>pfam</i> motiv	Izvorni organizem referenčnega gena	NCBI akcesijska št. beljakovine, ki je produkt ref. gena	BLASTx e-vrednost	Predvidena funkcija referenčnega gena
HL54	LRR	<i>A. thaliana</i>	NP_563980.2	8e-54	Beljakovina z LRR ponovitvami, ki vsebuje domeno F-box
HL191	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002298766.1	4e-37	SERK (s somatsko embriogenezo povezana kinaza) ^b
HL250	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002300205.1	6e-52	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami ^b
HL428	WRKY	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002317397.1	4e-48	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL643	WRKY	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002332076.1	1e-101	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL931	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002301057.1	5e-110	Beljakovine vezavna beljakovina
HL1273	WRKY	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002298189.1	4e-53	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL1599	WRKY	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002299321.1	5e-54	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL1641	WRKY	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002303610.1	1e-25	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL2479	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002310881.1	2e-79	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami ^b
HL2861	LRR	<i>V. vinifera</i>	XP_002279192.1	4e-85	Ekstenzinu podobna beljakovina z LRR regijami
HL3061	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002332347.1	2e-97	Regulatorna podenota beljakovinske fosfataze 1
HL3080	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002311473.1	1e-81	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami ^b
HL4443	LRR	<i>V. vinifera</i>	XP_002263257.1	2e-103	SERK (s somatsko embriogenezo povezana kinaza) ^b
HL5290	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002299953.1	2e-21	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami ^b
HL5408	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002314247.1	8e-41	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami ^b

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 11

EST-RGA	Vsebovani <i>pfam</i> motiv	Izvorni organizem referenčnega gena	NCBI akcesijska št. beljakovine, ki je produkt ref. gena	BLASTx e-vrednost	Predvidena funkcija referenčnega gena
HL5623	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002303879.1	4e-97	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami
HL5637	WRKY	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002326326.1	1e-70	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL5894	LRR	<i>O. sativa</i>	NP_001065462.1	1e-26	Beljakovina z LRR regijo
HL5980	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002313864.1	2e-49	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami ^b
HL6022 ^a	LRR	/	/	/	/
HL6041	LRR	<i>V. vinifera</i>	XP_002262698.1	1e-59	SERK (s somatsko embriogenezo povezana kinaza) ^b
HL6293	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002323001.1	2e-58	Beljakovina za odpornost na verticilijevo uvelost ^c
HL6298	NB-ARC	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002305796.1	1e-120	ATPaza, ki sodeluje v spajanju veziklov
HL6437	WRKY	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002323839.1	2e-31	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL7050	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002316909.1	2e-93	Z elicitorji spodbujena receptorju podobna beljakovina EIR ^b
HL7319	TIR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002321494.1	2e-44	Odpornostna beljakovina tipa TIR-NBS-LRR ^d
HL7418	LRR	<i>V. vinifera</i>	XP_002265215.1	2e-108	Beljakovina z LRR ponovitvami, ki vsebuje domeno F-box
HL8570	LRR	<i>V. vinifera</i>	XP_002282985.1	3e-89	Beljakovinska fosfataza 2C
HL8710	LRR	<i>V. vinifera</i>	XP_002281668.1	2e-100	Receptorju podobna beljakovinska kinaza z LRR regijami ^b
HL9060	WRKY	<i>V. vinifera</i>	XP_002266188.1	2e-38	Dejavnik prepisa tipa WRKY
HL9140	TIR	<i>V. vinifera</i>	XP_002272034.1	4e-27	Odpornostna beljakovina tipa TIR-NBS-LRR ^d
HL9399	LRR	<i>V. vinifera</i>	AAK14075.1	1e-50	Beljakovini N za odpornost na TMV podobna beljakovina ^d
HL9550	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002321633.1	2e-96	Družini Ras sorodna beljakovina, ki vsebuje LRR 9 ponovitve
HL9840	LRR	<i>P. trichocarpa</i>	XP_002298520.1	2e-96	Z BRI1-povezana beljakovinska kinaza ^b

^aZaradi premajhne dolžine vhodnega EST z orodjem BLASTp ni bil pridobljen noben referenčni gen

^bReceptorju podobne proteinske kinaze (RLK)

^cReceptorju podobne beljakovine (RLP)

^dOdpornostne beljakovine tipa TNL

4.1.2 Predvidevanje mej med eksoni in introni

Hmeljnim EST-RGA podobni referenčni geni so v celotni dolžini predvidenega kodirajočega področja vsebovali do največ 21 intronov (preglednica 12). V osmih primerih niso vsebovali nobenega introna. Največje število predvidenih intronov v predvidenem PCR pomnožku je bilo 6. V 12 predvidenih pomnožkov nismo uspeli vključiti nobenega introna, saj referenčni gen v poravnanim območju ni nobenega vseboval.

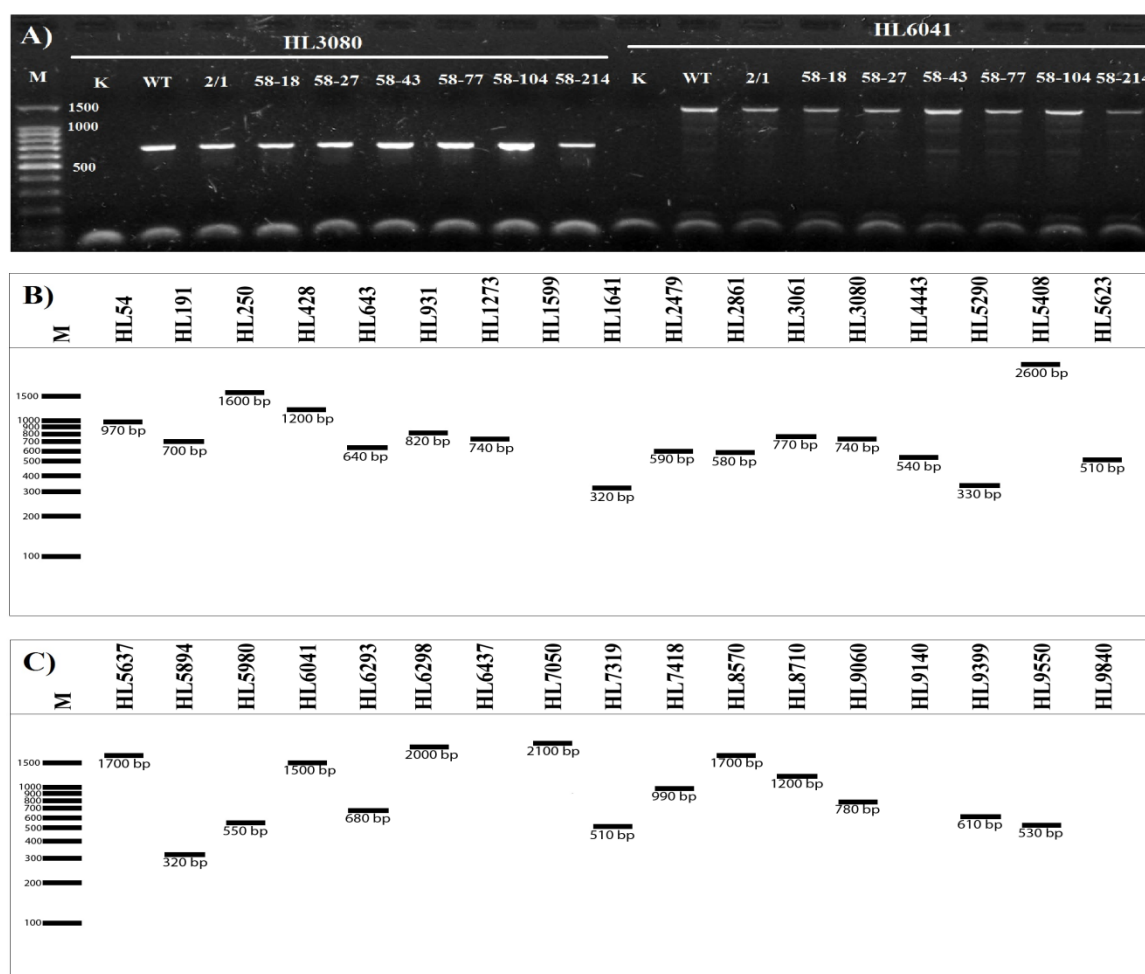
Preglednica 12: Celokupno število intronov v referenčnih genih in ustrežajočih amplikonih EST-RGA zaporedij s podatkom o tem, kateri intron referenčnega gena je predvidoma prisoten v EST-RGA pomnožku
Table 12: Total number of introns in reference genes and corresponding EST-RGA sequences, and identity of those reference gene introns putatively present in predicted amplified EST-RGA sequences

EST-RGA	Št. intronov v ustrežajočem referenčnem genu	Št. predvidenih intronov v EST-RGA zaporedju	Introni referenčnih genov, prisotni v EST-RGA amplikonu
HL54	14	1	Intron 12
HL191	6	2	Introna 2 in 3
HL250	21	6	Introni 2-7
HL428	2	2	Introna 1 in 2
HL643	3	2	Introna 2 in 3
HL931	2	2	Introna 1 in 2
HL1273	4	2	Introna 3 in 4
HL1599	1	1	Intron 1
HL1641	2	0	/
HL2479	0	0	/
HL2861	0	0	/
HL3061	5	2	Introna 1 in 2
HL3080	1	0	/
HL4443	6	1	Intron 4
HL5290	0	0	/
HL5408	5	3	Introni 3-5
HL5623	0	0	/
HL5637	4	2	Introna 2 in 3
HL5894	2	1	Intron 2
HL5980	0	0	/
HL6022	/	/	/
HL6041	11	3	Introni 1-3
HL6293	0	0	/
HL6298	20	5	Introni 14-18
HL6437	3	1	Intron 3
HL7050	19	3	Intron 3
HL7319	1	0	/
HL7418	7	3	Introni 4-6
HL8570	6	2	Introna 1 in 2
HL8710	8	1	Intron 2
HL9060	2	1	Intron 1
HL9140	6	0	/
HL9399	0	0	/
HL9550	2	1	Intron 1
HL9840	0	0	/

Z v AZ prevedenimi NZ EST-RGA in ustreznimi nukleotidnimi zaporedji v prejšnjem koraku pridobljenih referenčnih genov smo s programom Wise2 ustvarili poravnavo, na podlagi katere smo v 22 od skupno 34 analiziranih EST-RGA zaporedij zaznali vsaj en intron (preglednica 12). Največje število predvidenih intronov znotraj posameznega EST-RGA je bilo 5, in sicer v primeru HL6298. Na podlagi kriterijev, podanih v točki 3.2 smo pripravili začetne oligonukleotide za pomnožitev vsakega od 34 EST-RGA (priloga A).

4.1.3 Pomnoževanje hmeljevih EST-RGA v PCR in pridobivanje NZ produktov

Uspešno pomnožitev v PCR smo dosegli za 30 od izhodiščno 34 EST-RGA (88 %). V vseh 30-ih primerih smo na agaroznem gelu zaznali en pomnožen fragment (slika 5, B in C). Pri amplikonih EST-RGA HL1599, HL6437, HL9140 in HL9840 nismo zaznali pomnožitve.



Slika 5: Uspešnost pomnoževanja vseh 34 pripravljenih EST-RGA, predstavljena na agaroznem gelu. A) dva primera pomnožitev EST-RGA pri obeh starših in šestimi potomci za EST-RGA HL3080 in HL6041. M- dolžinski standard, K- kontrola (voda), WT-'Wye Target'. Preostala imena so oznake križancev. B) in C) – shema pomnožitev vseh 34 pripravljenih EST-RGA v PCR reakcijah. Pod črto, ki predstavlja pomnožek, so pripisane ocenjene vrednosti dolžin PCR fragmentov, dobljene s programom PyElph 1.4.

Figure 5: Amplification efficiency for all 34 EST-RGAs as detected on agarose gels. A) two examples of preliminary amplification in both parents and 6 progeny, for EST-RGAs HL3080 and HL6041. M – size marker, K – negative control (water), WT – 'Wye Target'. The rest of the names represent progeny samples. B) and C) depiction of amplification of all 34 EST-RGAs tested for PCR amplification. Horizontal bars represent amplicons on the gel. PCR fragment length estimates as by PyElph 1.4 are added beneath the bars.

Največja s programom PyElph 1.4 določena velikost pomnožka je bila 2600 bp za HL5408, najnižja pa 320 bp za HL1641 in HL5894. Povprečna predvidena dolžina pomnoženih fragmentov je bila 960 bp. Na sliki 5A so prikazani pomnoženi fragmenti DNA na elektroforetskem gelu za primer dveh EST-RGA pri starših 'Wye Target' in BL2/1 in šestih potomcih njunega križanja.

Za 24 izmed 30 pomnoženih EST-RGA smo uspeli pridobiti NZ (t.j. za 80 % uspešno pomnoženih oz. 69 % vseh), izmed katerih je bilo 13 pridobljenih z obeh koncev amplikona, 11 pa le z enim od ZO (preglednica 13). Dolžina posameznih pridobljenih NZ je bila med 162 bp in 799 bp, povprečna dolžina pa 578 bp.

Preglednica 13: Dolžine NZ za posamezne EST-RGA, pridobljene s posameznimi ZO, ter skupne dolžine pridobljenih NZ

Table 13: Sequence lengths for EST-RGAs as retrieved with single sequencing primers, and corresponding total sequence lengths.

EST-RGA	Dolžina NZ, dobljena s FOR ZO	Dolžina NZ, dobljena z REV ZO	Prekrivanje	Skupna dolžina pridobljenega NZ
HL54	675	682	558	799
HL191	612	611	566	657
HL250	/	/	/	/
HL428	597	/	/	597
HL643	/	/	/	/
HL931	639	/	/	639
HL1273	663	/	/	663
HL1641	332	/	/	332
HL2479	/	/	/	/
HL2861	592	595	553	634
HL3061	683	717	683	717
HL3080	580	593	538	635
HL4443	/	/	/	/
HL5290	162	/	/	162
HL5408	/	663	/	663
HL5623	474	484	435	523
HL5637	621	/	/	621
HL5894	315	302	233	384
HL5980	373	359	306	426
HL6041	440	/	/	440
HL6293	663	610	610	663
HL6298	/	/	/	/
HL7050	/	675	/	675
HL7319	526	534	484	576
HL7418	592	621	557	656
HL8570	/	661	/	661
HL8710	/	601	/	601
HL9060	/	/	/	/
HL9399	556	519	504	571
HL9550	393	395	191	597

4.1.4 Analiza pridobljenih nukleotidnih zaporedij

4.1.4.1 Določitev mej med eksoni in introni in statistika dolžin intronov

Po določitvi NZ in določitvi mest intronov v pridobljenih nukleotidnih zaporedjih smo za vse predvidene introne potrdili, da so dejansko prisotni v NZ ampikonov. Predvidene meje E/I, določene s poravnavo posameznih parov, sestojčih iz AZ EST-RGA hmelja in NZ ustreznega referenčnega gena, so popolnoma ustrezale dejanskim (t.j. opaženim v pridobljenih NZ) za vse EST-RGA. Eden ali več intronov je bilo prisotnih v 15 EST-RGA. Od skupno 30 zaznanih intronov smo za 16 (iz 13 RGA-EST) pridobili celotno zaporedje in jim lahko določili dolžino. Dolžine intronov so bile med 64 bp in 518 bp. Položaj posameznih intronov v pomnoženih EST-RGA je prikazan na sliki 6.

Preglednica 14 prikazuje lastnosti intronov, zaznanih v NZ posameznih EST-RGA hmelja. Mediana razmerij dolžin hmeljnih intronov in intronov ustrežajočih referenčnih genov je bila 0,81 ob kvartilnem razmiku 0,33 (slika 7, A). 1 meritev (HL54) je imela statistično značilne previsoke odklone in smo jo obravnavali kot osamelec.

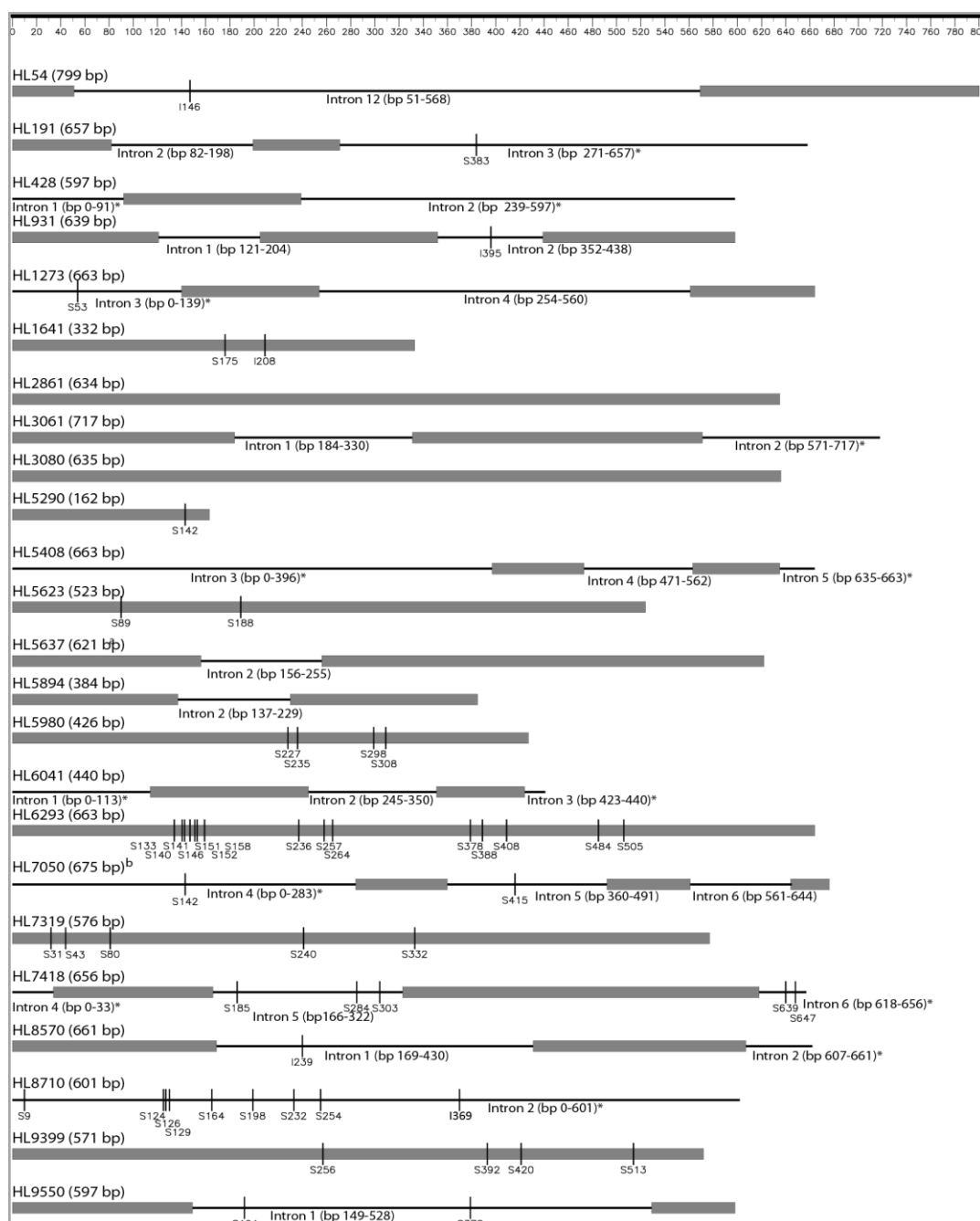
Preglednica 14: Dolžine intronov hmeljnih EST-RGA MO z v celoti določenim NZ in ustrežajoče dolžine intronov referenčnih genov. Podana so tudi razmerja obeh vrednosti.

Table 14: Lengths of completely sequenced introns present in hop EST-RGA amplicons and corresponding reference gene intron lengths. Additionally, ratios of both are shown.

EST-RGA	Dolžina pridobljenega NZ za EST-RGA (bp)	Št. intronov z v celoti pridobljenim NZ	Dolžina introna v EST-RGA (bp)	Dolžina pripadajočega introna referenčnega gena (bp)	Razmerje dolžine introna v EST-RGA in pripadajočega introna referenčnega gena
HL54	799	1	518	77	6,72
HL191	657	1	117	145	0,81
HL931	639	2	84	87	0,96
			87	125	0,70
HL1273	663	1	307	132	2,33
HL3061	717	2	147	194	0,76
HL5408	718	1	90	579	0,16
HL5637	384	1	100	108	0,93
HL5894	384	1	93	88	1,06
HL6041	440	1	106	138	0,77
HL7050	675	2	132	138	0,96
			84	101	0,83
HL7418	656	1	157	615	0,26
HL8570	661	1	262	467	0,56
HL9550	597	1	380	1136	0,33

4.1.4.2 Validacija polimorfizmov na ravni nukleotidnega zaporedja

V vseh 24 EST-RGA zaporedij, ki smo jim določili NZ, smo s poravnavo zaporedij staršev in 6-ih potomcev ter s skrbnim pregledom pripadajočih kromatogramov določili polimorfizme na ravni zaporedja. Skupno smo zaznali 56 polimorfizmov, od tega 33 v eksonih in 23 v intronih. Razporeditev eksonov, intronov in polimorfizmov v nukleotidnih zaporedjih EST-RGA je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Razporeditev polimorfizmov na ravni nukleotidnega zaporedja v 24 NZ EST-RGA. Polimorfizmi so označeni s kratko navpično črto, pod katerimi je pripisana oznaka, ki podaja tip polimorfizma (S-SNP, I-insercija/delecija) in položaj polimorfizma v nukleotidnem zaporedju (v bp, gledano od začetka zaporedja). Prikazane so tudi eksonske (debela vodoravna črta) in intronske regije (ozka vodoravna črta). V oklepajih so podane skupne dolžine nukleotidnih zaporedij.

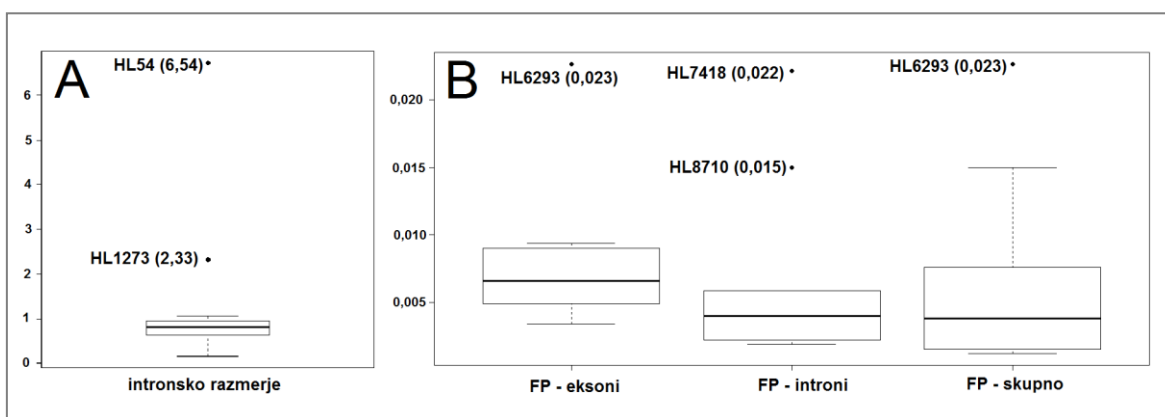
*meja E/I je izven pridobljenega EST-RGA nukleotidnega zaporedja

Figure 6: Twenty-four sequenced EST-RGA amplicons annotated with intron positions (horizontal connecting line), exon positions (box) and sequence polymorphism location (vertical dash). Total sequence lengths are given in parentheses. Below the lines denoting introns are given the intron position number by consecutive order in the reference gene used in intron prediction and the exact intron location in EST-RGA sequence (in parentheses). Polymorphism names below vertical dashes denote polymorphism type (S – SNP, I – indel) and location in sequence (bp position from start of sequence).

*The E/I boundary is located outside the retrieved EST-RGA sequence

Zaznali smo skupno 5 insercij oz. delecij, in sicer 4 v intronih in 1 v eksonu (pri HL1641), in skupno 51 SNP, od tega 14 tranzicij (9 v eksonih in 5 v intronih) in 37 transverzij (23 v eksonih in 14 v intronih). Razmerje tranzicij in transverzij je bilo 0,38 (0,39 v eksonih in 0,36 v intronih), kar kaže na izrazito pristranskost (ang. bias) v smeri transverzij. V vseh primerih, ko smo v NZ EST-RGA zaznali enega ali več intronov, so bili vsi zaznani polimorfizmi prisotni v le-teh. V 7 primerih (HL1641, HL5290, HL5623, HL5980, HL6293, HL7319, HL9399) v NZ nismo zaznali intronov, a smo polimorfizme zaznali v eksonih (slika 6).

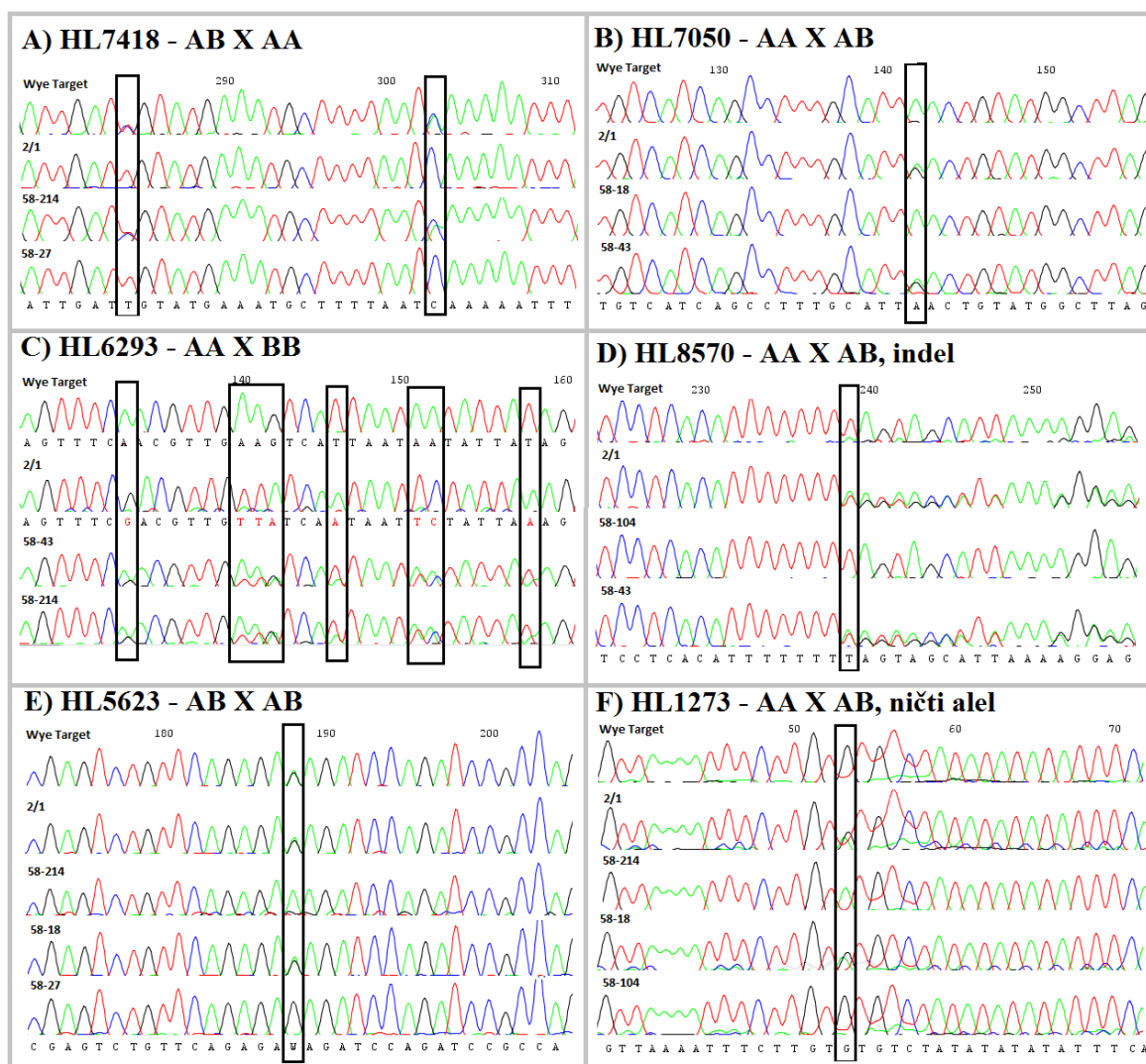
Seštevek dolžin NZ eksonov je bil 8554 bp, seštevek dolžin intronov pa 5338 bp. Frekvenca polimorfizmov v eksonih je bila 0,386 % (1 polimorfizem v 258 bp), v intronih pa 0,431 % (1 polimorfizem na 232 bp).



Slika 7: Škatelni diagrami vrednosti razmerij opaženih in predvidenih dolžin intronov po EST-RGA (A) in frekvenc zaznanih polimorfizmov (FP) v eksonih, intronih ter celotnem pridobljenem NZ EST-RGA (B). V primeru vrednosti s prevelikim odklonom je pripisano ime EST-RGA in pripadajoča izmerjena vrednost (v oklepaju).

Figure 7: Boxplots of observed to predicted intron length ratios in EST-RGAs (A) and polymorphism frequencies (FP) in exons, introns and throughout total lengths of sequences (B). In the case of outliers, the name of the corresponding EST-RGA names and measured values are shown (in parentheses).

Skupno 15 polimorfizmov je segregiralo v testni populaciji obeh staršev in šestih potomcev. Slika 8 prikazuje različne tipe opaženih polimorfizmov.



Slika 8: Segregacija različnih tipov opaženih polimorfizmov na ravni NZ pri obeh starših ('Wye Target' in BL2/1) in dveh oz. treh izbranih potomcih križanja. Prikazani so predstavniki vseh skupin opaženih polimorfizmov (A-E) in ena posebnost – opažen ničelni alel (F). A) SNP tipa AB X AA; B) SNP tipa AA X AB; C) polimorfizem tipa AA X BB, ki ni primeren za kartiranje; D) insercija/delecija v enem od alelov lokusa matere; E) SNP tipa AB X AB, za katerega so značilni trije različni genotipi pri potomcih; F) odsotnost enega alela v celoti (nični alel) pri materi (A0), ki povzroči pojav novega genotipa (B0), vidnega pri potomcu 58-214.

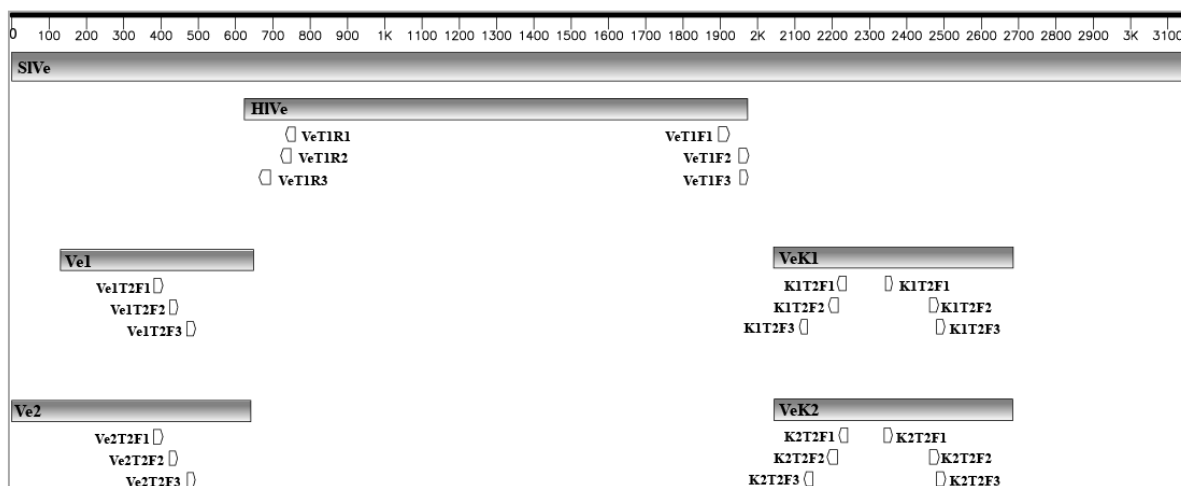
Figure 8: Segregation of different types of polymorphisms as observed at sequence level for both parents ('Wye Target' and BL2/1) and two or three selected progeny. All different types of noted polymorphisms (A-E) and an observed zero allele (F) are shown. A) a SNP of the type AB X AA; B) a SNP of the type AA X AB; C) An AA X BB polymorphism type, not suitable for mapping; D) an indel in a single allele of the mother's locus; E) a SNP of the type AB X AB, resulting in three different progeny genotypes; F) complete absence of a single allele (zero allele) observed in the mother's genotype, resulting in a novel genotype (A0) detected in progeny 58-214.

4.2 PRIDOBIVANJE VE1-PODOBNIH NZ HMELJA

4.2.1 Zasnova in potek poskusa

Izhodišče za pridobivanje NZ celotnih kodirajočih odsekov hmeljnih Ve1-podobnih NZ je bilo 1344 bp dolgo NZ, ki smo ga poimenovali HLVe. Pridobljeno je bilo na podlagi edinega hmeljnega EST, pridobljenega iz baze PlantGDB, katerega prevedeno AZ je kazalo podobnost s paradižnikovim Ve1 genom. Zaporedje je bilo nato s pomočjo PCR z degeneriranimi ZO razširjeno v 5' smeri.

Na podlagi HLVe smo zasnovali dva seta treh SZO (slika 9) in z njimi izvedli TAIL-PCR. Posamezne pridobljene fragmente smo izrezali iz gela in iz njih pridobili NZ z neposrednim določanjem NZ po Sangerju. V programu CodonCode Aligner 3.7.1 smo zaporedja pri 90 % ujemanja združili v soseske. Posamezna NZ, pridobljena z vsakim od setov ZO, so se pri danih pogojih prileganja združila v po dve edinstveni soseski. Na podlagi teh sosesk, ki smo jih poimenovali Ve1 in Ve2 ter VeK1 in VeK2, smo pripravili nadaljnjih 6 setov ZO (slika 5).



Slika 9: Prileganje sosesk Ve1, Ve2, VeK1 in VeK2 na NZ paradižnikovega gena Ve1, na podlagi katerega smo našli izhodiščni hmeljni EST. Na sliki ni prikazana zasnova treh kasneje proizvedenih setov ZO za pridobitev manjkajočih delov kodogenih zaporedij HLVe1 in HLVe2.

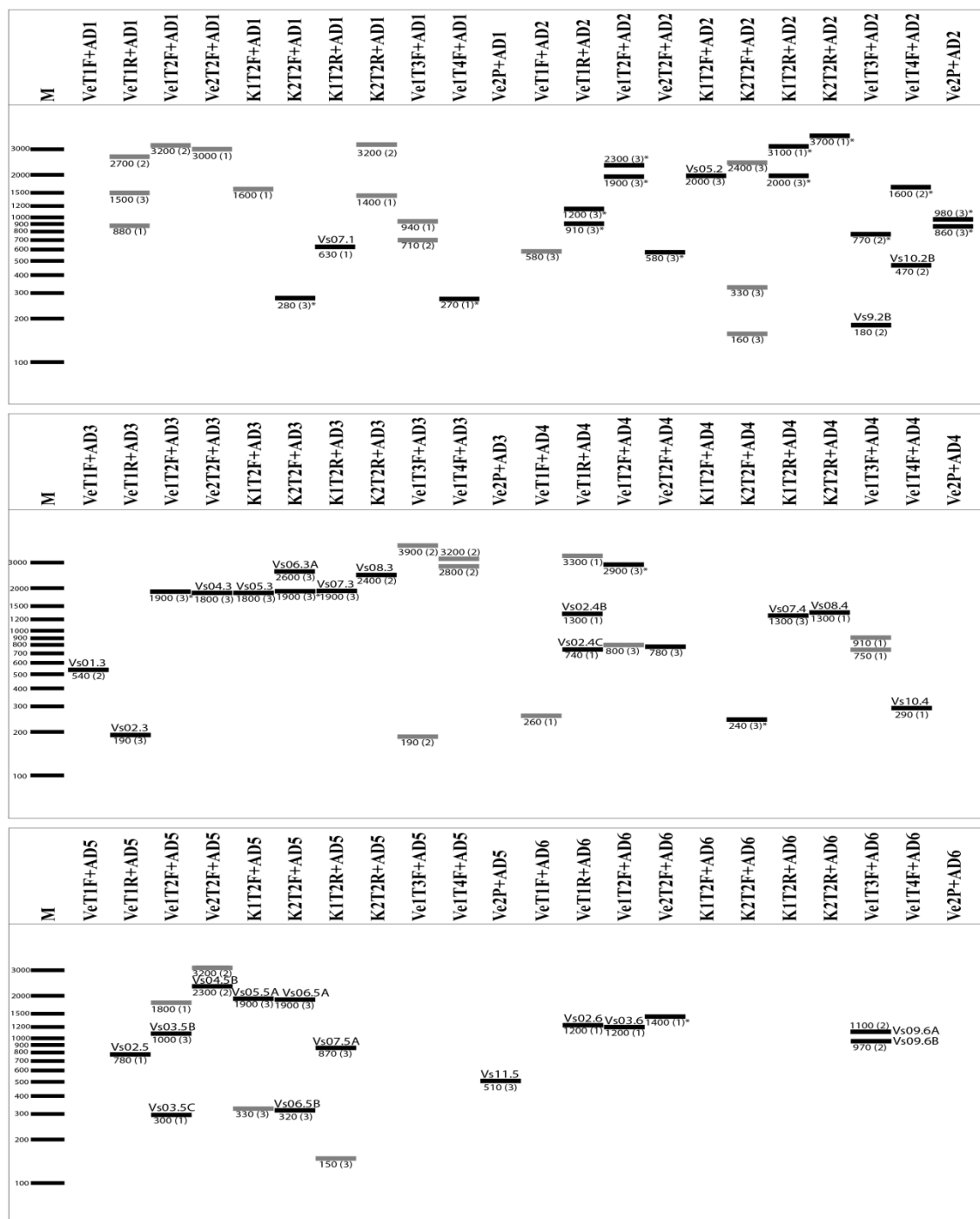
Figure 9: Alignment of contigs HLVe1 HLVe1, HLVe2, HLVeK1 and HLVeK2 with the sequence of the tomato Ve1 gene, used for the initial hop EST retrieval. The design of three sets of TAIL-PCR specific primers developed in later stages of the experiment is not shown.

S temi šestimi seti ZO smo uspeli pridobiti večino NZ preostalega kodirajočega področja gena za obe dobljeni skupini zaporedij. Poimenovali smo ju HLVe1-1 (vsebuje izhodiščno sosesko 'Ve1') in HLVe1-2 (vsebuje izhodiščno sosesko 'Ve2'). Za HLVe1-2 smo pridobili celotno kodirajočo področje in daljše kose promotorja (v 5' smeri) in končnega področja (v 3' smeri). V obeh primerih v tej fazi še nismo uspeli zajeti celotnega kodirajočega področja. Za HLVe1-1 smo sicer pridobili del NZ promotorja, NZ v smeri 3' konca kodirajočega področja gena pa nismo uspeli pridobiti. Za postopno določitev NZ 3' konca NZ HLVe1-1 smo potrebovali še dva koraka TAIL-PCR s sprotno zasnovo setov SZO (v nadaljevanju imenovanih Ve1-TAIL3-F1-3 ter Ve1-TAIL4-F1-3).

4.2.2 Pridobivanje dodatnih NZ bočnih regij HlVe1-1 in HlVe1-2 s TAIL-PCR

Za vseh 11 uporabljenih setov specifičnih ZO, pripravljenih za pomnoževanje posameznih delov HlVe1-1 in HlVe1-2 v TAIL-PCR, smo ovrednotili uspešnost pomnožitve v PCR. Ovrednotili smo skupno število fragmentov na agaroznem gelu, dolžino posameznih fragmentov in ponovljivost pomnožitve v vseh treh izvedenih ponovitvah za posamezne kombinacije SZO in AD. Posamezne fragmente, ki so v BLASTx analizi izkazali podobnost z Ve1-podobnimi zaporedji, smo klonirali in klonom določili NZ.

Slika 10 prikazuje posamezne fragmente, pridobljene v vsaj eni od ponovitev TAL-PCR za določen par SZO in AD za vseh 66 uporabljenih parov. V 51 primerih (76 % kombinacij ZO) smo zaznali vsaj en pomnožen fragment. Največje število pomnoženih fragmentov je bilo 3. Tri izrazite pomnožene fragmente smo opazili v primeru štirih kombinacij ZO (VeT1R&AD1, VeT1R&AD4, Ve1T2F&AD5 in K2T2F&AD2). V 18 primerih smo na gelu zaznali 2 fragmenta, v nadaljnjih 28 primerih pa 1 fragment (slika 10). Vseh izrazitih fragmentov po pomnožitvi za vse uporabljene kombinacije ZO je bilo 76. Povprečno število zaznanih fragmentov je bilo 1,15 za vse testirane kombinacije ZO oz. 1,52 za terciarne TAIL-PCR reakcije z uspešno pomnožitvijo vsaj enega fragmenta.



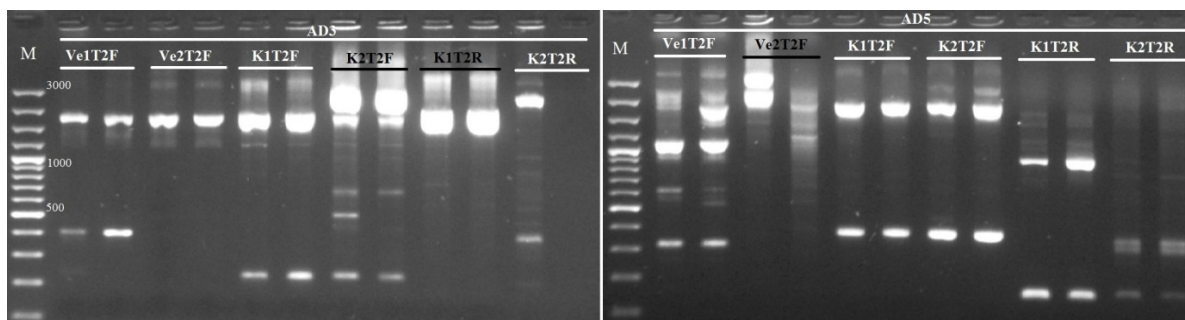
Slika 10: Shematičen prikaz pridobljenih fragmentov v TAIL-PCR za posamezne kombinacije specifičnih in arbitrarnih začetnih oligonukleotidov. Črte, ki predstavljajo PCR fragmente, so prikazane, kot bi bile zaznane na agaroznem gelu po ločevanju z elektroforezo. Pod črto je pripisana predvidena velikost fragmenta v bp, v oklepaju od nje pa število posameznih ponovitev pomnoževanja (od skupno 3), v katerih smo zaznali ta fragment. Zvezdica (*) označuje tiste fragmente, ki jih v nadaljevanju nismo uspeli klonirati in jim dokončno določiti NZ. Črna barva črte predstavlja fragmente, iz katerih smo kasneje uspešno določili NZ Ve1-podobnega zaporedja. Iz fragmentov, predstavljenih s sivo črto tega nismo pridobili Ve1-podobnih NZ, zato sklepamo, da gre verjetno za nespecifično pomnožitev. V kolikor smo zaporedja uspeli klonirati in klonom določiti NZ, je nad črto, ki prikazuje fragment, pripisana v nadaljevanju opisana soseska, ki ji NZ iz fragmenta pripada.

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 10

Figure 10: Retrieved TAIL-PCR fragments for different specific-to-arbitrary primer combinations. Bars representing fragments are shown as visualized on agarose gels. Below bars, the predicted fragment length is shown (in bp), with the number of observed amplifications (of a total of 3) shown in parentheses. Fragments which were not successfully cloned and sequenced are marked by asterisk (*). Black-coloured bars represent fragments from which a Ve-like sequence was successfully retrieved. Grey-coloured bars denote instances for which a Ve-like sequence was not retrieved, and likely represent non-specific amplification. For instances of successfully cloned and subsequently sequenced fragments, the name of the ensuing contig into which the sequence was assembled is noted above the corresponding bar.

Celoten postopek TAIL-PCR smo za vsako kombinacijo ZO izvedli trikrat, s čimer smo poskusili oceniti ponovljivost postopka. Slika 11 prikazuje elektroforegrame za po dve neodvisni ponovitvi TAIL-PCR izbranih kombinacij SZO in AD. Št. uspešnih pomnožitev posameznih TAIL-PCR fragmentov v treh poskusih je podano v oklepajih ob prikazu fragmentov na sliki 10. V vseh treh ponovitvah smo zaznali pomnožitev 35 posameznih fragmentov (46 % vseh). 17 fragmentov (22 %) smo zaznali v dveh ponovitvah, 24 (32 %) fragmentov pa le v eni od treh ponovitev (slika 12B).



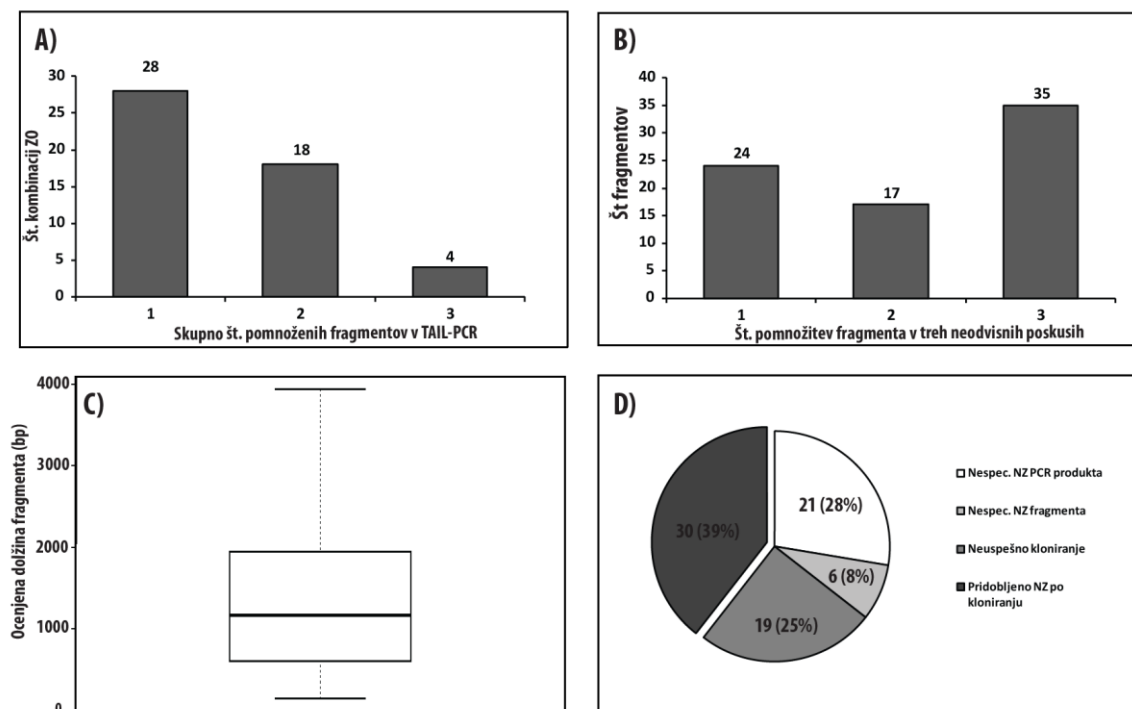
Slika11: Primer ponovljivosti pomnoževanja posameznih fragmentov v elektroforetsko ločenih produktih terciarne TAIL-PCR za 12 kombinacij specifičnih in arbitrarnih ZO. V primeru kombinacije ZO K2T2R in AD3 je v drugem primeru prišlo do izpada pomnožitve. V primeru kombinacije ZO Ve1T2F in AD5 se je v drugi reakciji pojavi dodaten fragment, v primeru kombinacije ZO Ve2T2F pa sta oba specifična fragmenta v drugi reakciji izpadla.

Figure11: An example of repeatability of fragment amplification in tertiary TAIL-PCR products for 12 combinations of specific and arbitrary primers. In the case of primers K2T2R and AD3, no amplification was present in the second case. For Ve1T2F and AD5, an additional fragment was amplified in the second PCR reaction, and for Ve2T2F, both specific fragments were absent in the second PCR reaction.

Dolžine fragmentov smo ocenili iz slik gelov s programom PyElph 1.4. Največja ocenjena dolžina posameznega fragmenta je bila 3.940 bp, najmanjša pa 148 bp. Mediana ocenjenih dolžin vseh 76 fragmentov je bila 1.175 bp ob kvartilnem razmiku 1.319 bp (slika 12C).

Pridobivanje NZ iz posameznih fragmentov smo izvedli v treh korakih, s čimer smo poskušali zmanjšati verjetnost nepotrebnega določanja NZ nespecifično pomnoženih fragmentov. Najprej smo NZ pridobili direktno iz produkta TAIL-PCR. V kolikor neposredno iz PCR produkta nismo pridobili uporabnega NZ, tudi izrezanim fragmentov nismo določili NZ. Na ta način smo iz nadaljnjih postopkov odstranili 12 produktov TAIL-PCR, kar predstavlja 24 % produktov z vsaj enim pomnoženim fragmentom oz. 18 % vseh kombinacij ZO za TAIL-PCR. Izločili smo skupno 21 fragmentov (28 %; slika 12D). Iz izrezanih fragmentov tistih produktov TAIL-PCR, za katere smo pridobili NZ in je to po BLASTx analizi kazalo podobnost z Ve1-podobnimi zaporedji, smo izolirali pomnoženo DNA in ji v celoti določili NZ. Za skupno 6 od preostalih 55 fragmentov nismo uspeli

določiti NZ, zato smo jih izključili iz nadaljnjih postopkov. Za preostalih 49 fragmentov smo izvedli molekularno kloniranje, ki je bilo še za nadaljnjih 19 fragmentov neuspešno. Za preostalih 30 fragmentov smo posameznim klonom po izvedbi PCR na osnovi kolonije uspešno določili NZ. Uspešnost pridobivanja NZ s kloniranjem je povzeta na sliki 12D.

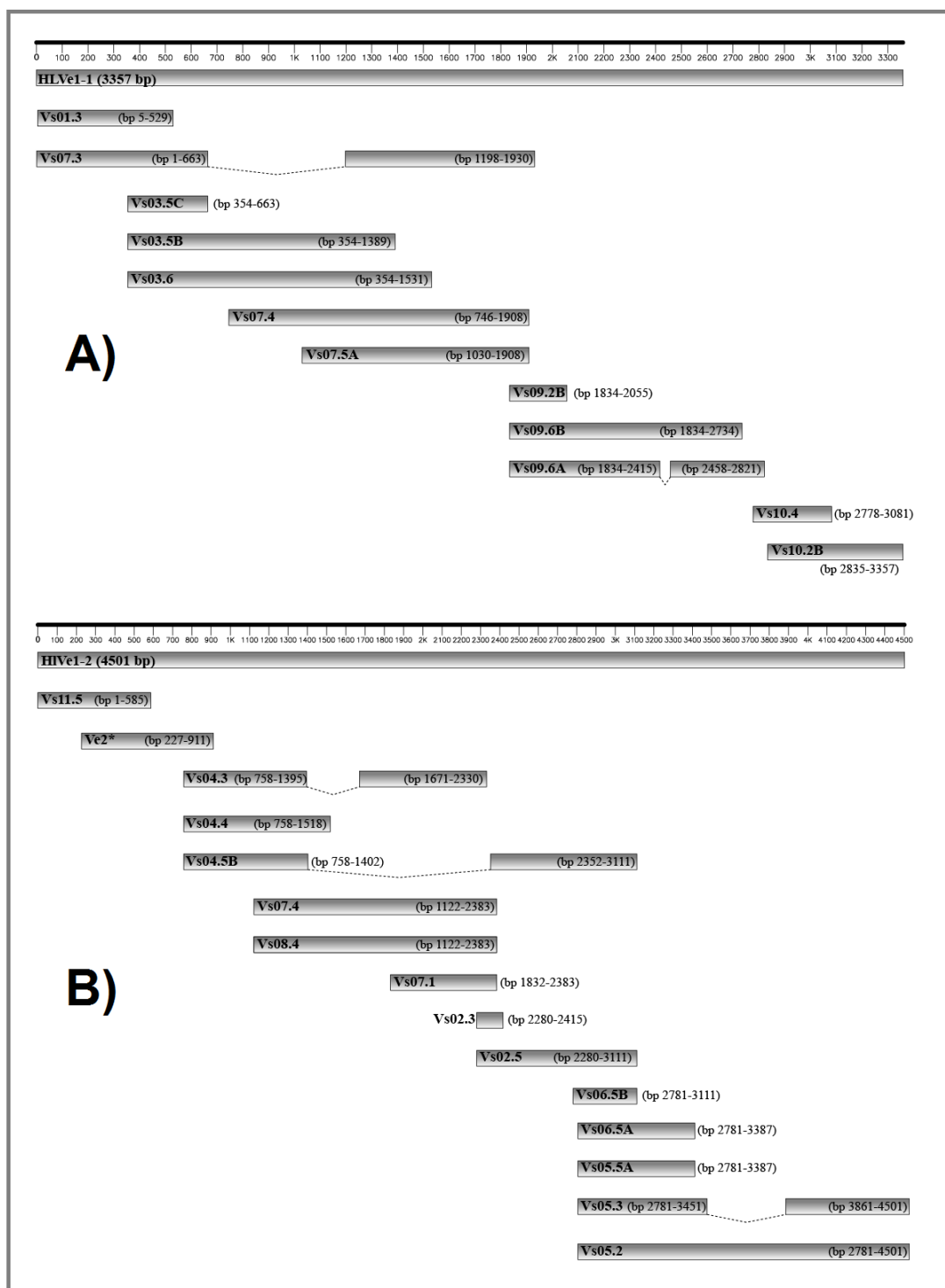


Slika 12: Povzetek pomnoževanja bočnih regij HLVe s TAIL-PCR in nadaljnjih postopkov pridobivanja NZ iz pomnoženih fragmentov. A – porazdelitev posameznih kombinacij TAIL-PCR ZO glede na skupno število pomnoženih fragmentov; B – porazdelitev ponovljivosti pomnoženih fragmentov v treh neodvisnih TAIL-PCR; C – škatlični diagram ocenjenih dolžin s TAIL-PCR pridobljenih fragmentov; D – potek izločanja posameznih fragmentov iz postopka kloniranja z ozirom na razlog. Za 30 fragmentov smo po uspešnem kloniranju pridobili NZ.

Figure 12: Summary of flanking region amplification using TAIL-PCR and ensuing sequencing of amplified fragments. A – distribution of individual combinations of TAIL-PCR primers according to total amplified fragment number; B – distribution of noted repeatability of amplified fragments in three independent TAIL-PCR reactions; C – boxplot of individual TAIL-PCR fragment length estimates; D – the progression of exclusion of individual fragments from the cloning process due to different reasons. A total of 30 fragments were successfully sequenced upon cloning.

4.2.3 Sestavljanje pridobljenih Ve1-podobnih zaporedij hmelja v soseske

Pridobljena NZ kloniranih zaporedij posameznih TAIL-PCR fragmentov smo pri 95 % najmanjšega ujemanja zaporedij združili v soseske. Zaporedja smo uspeli združiti v skupno 33 različnih sosesk, ki so bile v 8 primerih prekinjene, saj je bilo klonirano zaporedje predolgo za določitev NZ sredine zaporedja le z določanjem NZ z obeh koncev. Šest kloniranih zaporedij pri izbranih pogojih prileganja nismo uspeli dodati v nobeno od sestavljenih sosesk. Skupno število pridobljenih posameznih NZ po združevanju je bilo torej 39 (slika 13).



Slika 13: Sestavljanje nadsosesk HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B) iz posameznih sosesk pri 95 % najnižji ravni ujemanja NZ. V oklepaju je podano mesto posamezne soseske v nadsosesk. Črtkane črte povezujejo zaporedja, pridobljena z obeh koncev dolgih klonov, ki jih zaradi prekratkih odčitkov pri določanju NZ nismo uspeli združiti v celotno zaporedje.

Figure 13: Assembly of supercontigs HLVe1-1 (A) and HLVe1-2 (B) from individual contigs at 95 % minimum sequence identity. The exact location of individual contigs in the supercontig is given in parentheses. Sequences, retrieved from both ends of long clones and consequently not assembled into a single contig, are connected with dashed lines.

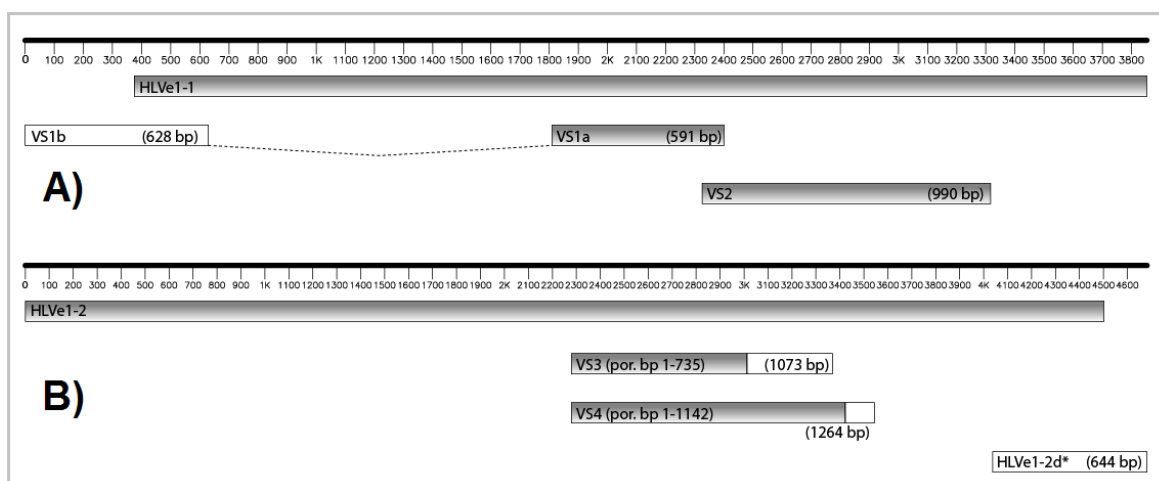
Soseske smo nato pri 95 % najmanjšega ujemanja združili v nadsoseske. 26 sosesk smo skupaj z izhodiščnima zaporedjema »Ve1« in »Ve2« združili v dve večji nadsoseski. 12 sosesk (izmed teh skupno 2 prekinjeni) smo združili v nadsosesko HLVe1-1, ki vsebuje izhodiščno zaporedje »Ve1«, 14 (5 prekinjenih) sosesk pa v nadsosesko HLVe1-2, vsebujočo »Ve2« (slika 13).

V nadsosesko HLVe1-2 nismo uspeli združiti dveh sosesk, izhajajočih iz fragmentov Vs05.5A in Vs06.5A, ki predstavljata določeni NZ koncev klonov, ki ležita izven kodirajočega področja gena in katerih drugi konec je vključen v HLVe1-2. Nadsosesko združeno iz teh dveh zaporedij smo poimenovali HLVe1-2d (preglednica 15, slika 13). Iz preostalih 7 sosesk, ki niso prilegale v nadsosesko HLVe1-1 ali HLVe1-2, smo pridobili skupno 5 nadsosesk, od katerih dve (VS1a in VS1b) predstavljata parna konca istega kloniranega zaporedja. Za teh 5 nadsosesk smo določili stopnjo ujemanja s HLVe1-1 in HLVe1-2. Za VS1a in VS2 smo opazili boljšo poravnavo s HLVe1-1, za VS3 in VS4 pa s HLVe1-2 (preglednica 15, slika 13).

Preglednica 15: Zraven HLVe1-1 in HLVe1-2 nadsosesk smo iz prejetih kloniranih NZ TAIL-PCR fragmentov sestavili še 7 dodatnih nadsosesk. Pet jih kaže določeno mero podobnosti s HLVe1-1 ali HLVe1-2, dve pa predstavljata NZ 5' ali 3' bočnih regij, ki so preko skupnega izvora NZ v soseskah vezane na HLVe1-1 oz HLVe1-2. V preglednici sta prikazana izvor posameznih NZ v soseskah in lastnosti poravnave nadsosesk s HLVe1-1 in HLVe1-2. Sama poravnava nadsosesk s HLVe1-1 in HLVe1-2 je prikazana na sliki 14.

Table 15: In addition to HLVe1-1 and HLVe1-2, a total of 7 additional supercontigs were retrieved by assembling cloned sequences of TAIL-PCR fragments. Five of those exhibited a certain degree of similarity with either HLVe1-1 or HLVe1-2, and an additional 2 represent sequences of 5' or 3' flanking regions that are linked to HLVe1-1 or HLVe1-2 due to origin from the same cloned sequences. The origin of individual assembled sequences and supercontigs to HLVe1-1 or HLVe1-2 and their alignment properties are given. The alignment of these additional supercontigs with HLVe1-1 or HLVe1-2 is shown in figure 10.

Ime nadsoseske	Dolžina	Izvorni TAIL-PCR fragment	Poravnava s HLVe1-1 oz. HLVe1-2
HLVe1-2d	644 bp	Vs05.5A(bp 1-572), Vs06.5A(bp1-644)	Ni poravnave, predstavlja del HLVe1-2 v smeri proti 3' koncu
VS1a	591 bp	Vs08.3	V celoti poravnan s HLVe1-1, 88 SNP, ena vrzel dolžine 3 bp
VS1b	628 bp	Vs08.3	ni poravnave; predstavlja parno zaporedje Vs1a v smeri proti 5' koncu HLVe1-1
VS2	990 bp	Vs09.6A	v celoti poravnan s HLVe1-1, 17 SNP, dve inserciji (dolžin 3 bp ter 7 bp)
VS3	1093 bp	Vs06.3A (bp 1-598), Vs02.4C (bp 353-1093), Vs09.6B (bp 355-1044)	bp 1-735 – poravnava s HLVe1-2, 111 SNP, dve inserciji (dolžin 8 bp in 3 bp) bp 736-1093 – ni poravnave
VS4	1264 bp	Vs02.4B (bp 1-1264), Vs02.6 (bp 1-1239)	bp 1-1142 – poravnava s HLVe1-2, SNP, ena insercija dolžine 3 bp bp 1143-1264 – ni poravnave

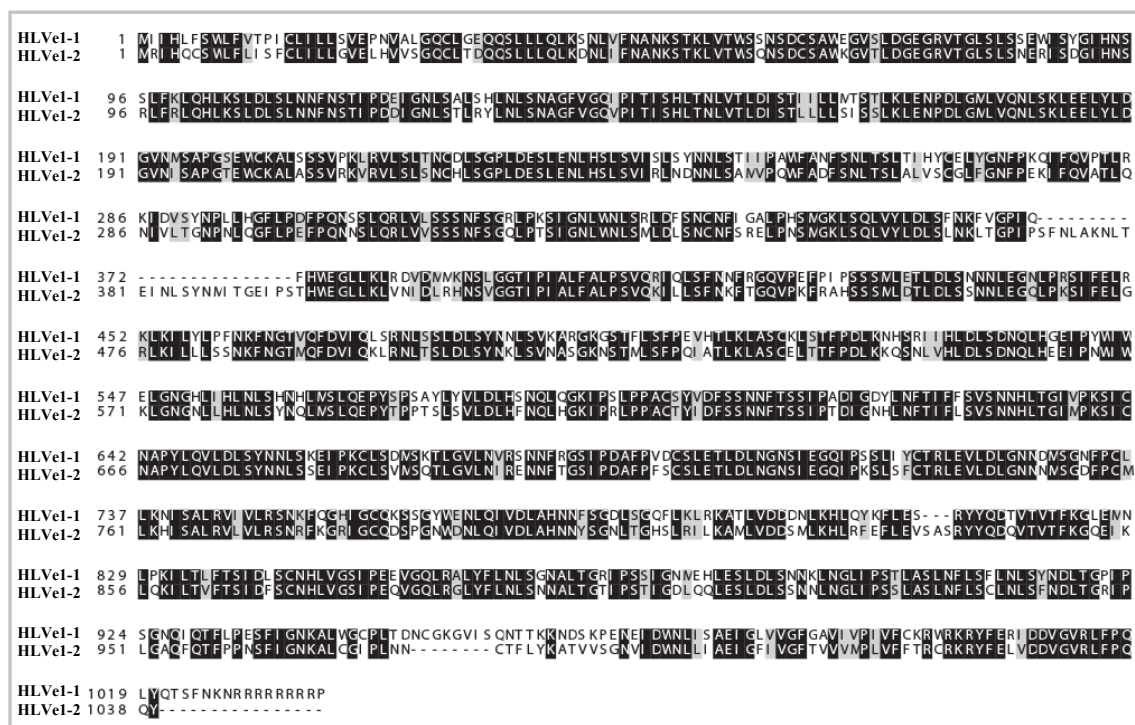


Slika 14: Poravnava preostalih Ve1-podobnih nadsosesk, ki pri 95 % ujemanja niso bile pridružene nobeni od HLVe nadsosesk, s HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B). V kolikor zaporedje oz. del zaporedja kaže poravnavo s HLVe1-1 oz. HLVe1-2, je le ta obarvan sivo. Prazen pravokotnik pomeni odsotnost poravnave.

Figure 14: Alignment of additional Ve1-like sequences that were not assembled into any of both HLVe supercontigs at 95% minimum sequence identity, with (A) HLVe1-1 and (B) HLVe1-2. Parts of the sequence exhibiting alignment with either HLVe1-1 or HLVe1-2 are shaded in grey. Empty boxes represent unaligned sequence parts.

4.2.4 Začetna karakterizacija Ve1-podobnih zaporedij hmelja

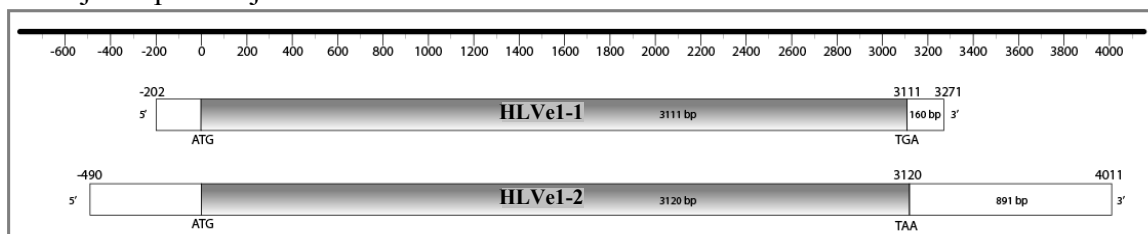
Za nadsoseski HLVe1-1 in HLVe1-2 smo pridobili pripadajoča aminokislinska zaporedja s programom Translate strežnika ExPaSy. Za HLVe1-1 smo pridobili AZ dolžine 1036 aminokislinskih ostankov (AKO), za HLVe1-2 pa AK dolžine 1039 AKO. Za obe AZ smo pripravili poravnavo v programu ClustalX2, ki je prikazana na sliki 15. Dolžina celotne poravnave je 1063 AKO. Identičnih AKO je v poravnavi 772 (72 %), 871 AKO (82 %) pa dosega pozitivno vrednost iz korelacijske matrike. V poravnavi sta na strani HLVe1-1 dve vrzeli, in sicer daljše (24 AKO) med AKO371 in AKO372 in krajše (3 AKO) med AKO811 in AKO812. Prvo sovpada z AKO 371-395, drugo pa z AKO 836-838 zaporedja HLVe1-2. Na strani HLVe1-2 sta dve vrzeli, in sicer 8 AKO dolgo med AKO976 in AKO977 ter 16 AK vrzel na samem koncu zaporedja; vrzeli sovpadata z AKO 950-957 ter končnimi 16 AKO (AKO1021-1036) zaporedja HLVe1-1.



Slika 15: ClustalX poravnava aminokislinskih zaporedij, prevedenih iz kodirajočih regij NZ HLVe1-1 in HLVe1-2.

Figure 15: ClustalX alignment of translated protein sequences from consensus nucleotide sequences of HLVe1-1 and HLVe1-2.

Na podlagi AZ smo določili obe meji med kodirajočo regijo in neprevedenima regijama. Prikaz opredelitve razpona kodirajočih regij, anotiranih na NZ obeh nadsosesk, je podan a sliki 16. Poravnava kodirajočih regij HLVe1-1 in HLVe1-2 je pokazala na izrazito podobnost obeh zaporedij na ravni NZ. V skupni dolžini ClustalX poravnave NZ (ni prikazana) v skupni dolžini 3193 bp je bilo skupno 2569 (80 %) nukleotidov identičnih v obeh zaporedjih. Zaznali smo tudi skupno sedem vrzeli v skupni dolžini 155 bp. Pridobili smo NZ dela promotorjev, in sicer v dolžini 202 bp za HLVe1-1 in 490 bp za HLVe1-2. Za nekodirajoča zaporedja v 3' smeri od kodirajoče regije smo pridobili skupno 160 bp NZ za HLVe1-1 in 891 bp NZ za HLVe1-2. Polimorfizmi v nekodirajočih področjih na meji s kodirajočim področjem so bili osnova za zasnovo ZO, namenjenih pomnoževanju celotnih kodirajočih področij HLVe1-1 in HLVe1-2.



Slika 16: Določitev kodirajočih in robnih nekodirajočih zaporedij za hmeljni Ve1-podobni zaporedji HLVe1-1 in HLVe1-2.

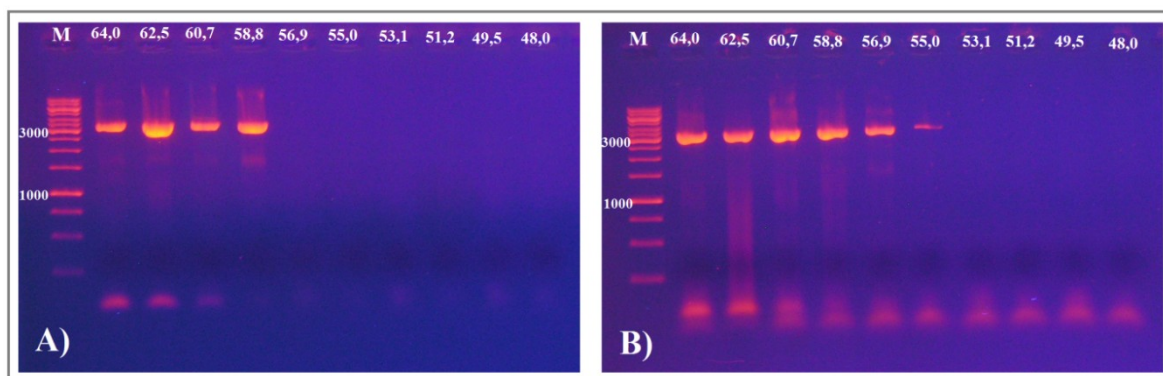
Figure 16: Determination of coding regions and flanking non-coding sequences for hop Ve1-like sequences HLVe1-1 and HLVe1-2

4.3 IZOLACIJA IN KLONIRANJE HMELJNIH HOMOLOGOV GENA VE1

ZO za pomnoževanje celotnih kodirajočih področij obeh zaznanih hmeljnih Ve1-podobnih zaporedij smo osnovali na osnovi poravnave 5' in 3' nekodirajočih zaporedij obeh genov. ZO smo osnovali v delih zaporedja, ki so v poravnavi izkazovali vrzeli oz. znatno število polimorfizmov na ravni NZ.

Za HLVe1-1 smo s parom specifičnih ZO določili predvideno dolžino pomnoženega področja pri 3379 bp. Pomnoženo področje je vključevalo 117 bp nekodirajočega zaporedja v smeri 5', celotno kodirajoče področje v dolžini 3111 bp in 151 bp nekodirajočega zaporedja v smeri 3'. Predvidena dolžina pomnoženega področja HLVe1-2 skupne dolžine 3196 bp je vključevalo 33 bp nekodirajočega zaporedja v 5' smeri, celotno kodirajoče področje skupne dolžine 3120 bp in 34 bp nekodirajočega zaporedja v 3' smeri.

Optimalno temperaturo prileganja za oba para ZO smo določili z gradientnim PCR pri 10 različnih temperaturah med 64 °C in 48 °C (slika 17). Za HLVe1-1 smo zaznali pomnožen produkt PCR pri temperaturah, enakih ali višjih od 58,8 °C. V primeru HLVe1-2 smo šibek specifičen fragment zaznali že pri temperaturi 55 °C, pri vseh preizkušenih višjih temperaturah pa smo zaznali izrazito pomnožitev enega fragmenta. Za oba para ZO smo pridobili fragment ustrezne velikosti, t.j. nekoliko večji od 3.000 bp. V nadaljnjih poskusih smo PCR vedno izvedli pri temperaturi 62 °C.

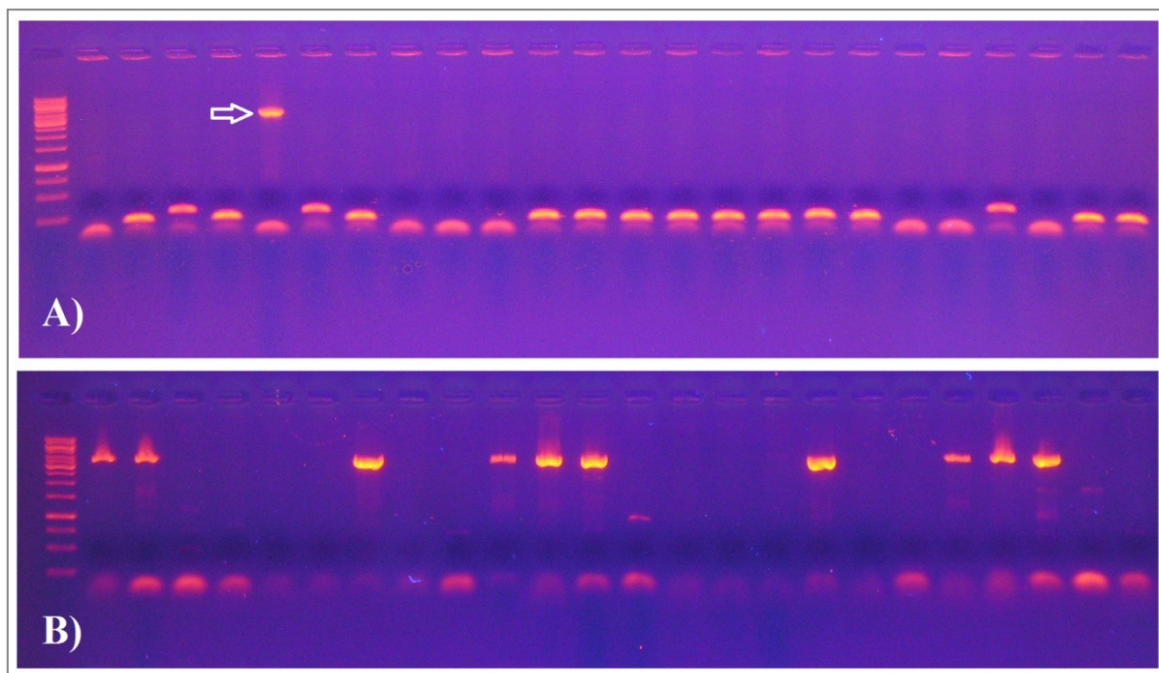


Slika 17: Izvedba PCR s temperaturnim gradientom s parom ZO za pomnoževanje A) HLVe1-1 in B) HLVe1-2. Kot matrično DNA smo v vseh reakcijah uporabili DNA hmeljnega kultivarja 'Wye Target'. Za izvajanje PCR v nadaljnjih fazah poskusa smo za obe zaporedji izbrali temperaturo 62 °C.

Figure 17: Temperature gradient PCR run with primer pairs for A) HLVe1-1 and B) HLVe1-2 amplification. For all reactions, 'Wye Target' DNA was used as matrix. Due to best observed amplification, ensuing PCR reactions were run at 62 °C.

Pomnožene fragmente smo izrezali iz gela in jih eluirali iz agaroze, nato pa izvedli postopek dodajanja A-koncev in ponovili celoten postopek elucije iz gela. Pridobljene raztopine PCR fragmentov HLVe1-1 in HLVe1-2 smo klonirali v vektor pGEM® T-Easy. Uspešnost kloniranja je bila izredno nizka. Za vsak izoliran fragment posebej smo celoten postopek kloniranja vključno s pomnoževanjem v PCR in elucijo iz agaroze izvedli štirikrat. V vseh primerih smo s PCR na osnovi kolonije testirali vse bele in svetlomodre kolonije. V treh izvedbah poskusa za vsakega od fragmentov nismo zaznali niti enega primera uspešno kloniranih zaporedij. V eni od ponovitev poskusa za HLVe1-1, v kateri je

bilo skupno število belih ali svetlomodrih kolonij na gojišču 25, smo pridobili en klon HLVe1-1. V eni od ponovitev enakega poskusa za HLVe1-2 pa smo pridobili 56 belih kolonij, izmed katerih je skupno 18 nosilo klonirano zaporedje HLVe1-2. Slika 18 prikazuje rezultate PCR na podlagi kolonije za klon, transformirane s produktom ligacije HLVe1-1 oz. HLVe1-2. Ponovljivega postopka kloniranja nismo uspeli vzpostaviti za nobenega od obeh vstavljenih fragmentov. Nadaljnje postopke v poskusu smo zato prilagodili delu na skupno 19 pridobljenih klonih HLVe1-1 oz. HLVe1-2.



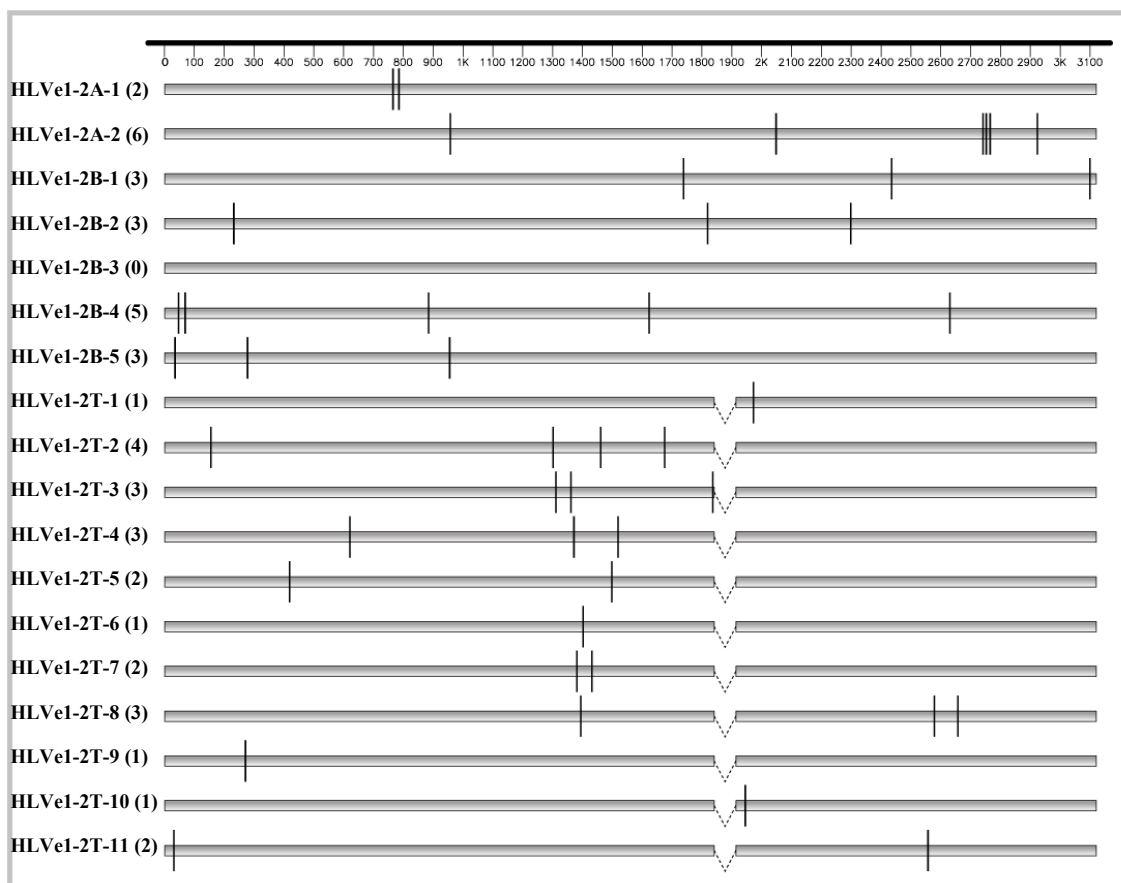
Slika 18: PCR na osnovi kolonije za 24 belih bakterijskih kolonij, pridobljenih v postopku molekularnega kloniranja za HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B). Iz pomnoženega zaporedja HLVe1-1 smo uspeli pridobiti skupno le en klon (puščica). Preostali kratki pomnoženi fragmenti so pomnoženi deli praznih vektorjev z za vektor specifičnim parom ZO. Za HLVe1-2 smo pridobili skupno 18 klonov.

Figure 18: Colony PCR for 24 white colonies, retrieved after molecular cloning of HLVe1-1 (A) and HLVe1-2 (B). In total, only one positive clone was retrieved for HLVe1-1 (arrow). Additional visible short fragments were amplified from empty circularized vectors. A total of 18 clones was retrieved for HLVe1-2.

Iz vseh 19 klonov smo izolirali plazmide s kloniranimi inserti in tem v celoti določili NZ. Edino pridobljeno NZ klona HLVe1-1 smo v poravnavi primerjali z neposredno iz PCR produkta pridobljenim NZ HLVe1-1 iz kultivarja 'Wye Target'. Na podlagi primerjave opaženih polimorfizmov v slednjem smo ugotovili, da klon predvidoma ne vsebuje nobenih s polimerazo vnešenih artefaktnih mutacij. NZ tega klona smo poimenovali HLVe1-1A. Neposredno določeno NZ PCR produkta iz 'Wye Target' je vsebovalo večje število predvidenih polimorfizmov v heterozigotnem stanju. Na podlagi primerjave tega NZ s HLVe1-1A in z ozirom na NZ TAIL-PCR sosesk, združenih v nadsosesko HLVe1-1, smo v programu CodonCode Aligner 3.7.1 ročno določili celotno predvideno NZ druge alelne oblike HLVe1-1, ki smo jo poimenovali HLVe1-1B. Razlike med obema NZ prikazuje slika 22A.

Za vseh 18 v celoti pridobljenih NZ klonov HLVe1-2 smo izvedli poravnavo z algoritmom MUSCLE v programu CodonCode Aligner 3.7.1. Na podlagi te poravnave smo preučili

stanja polimorfizmov posameznih NZ in ugotovili, da za HLVe1-2 obstajajo tri edinstvene alelne oblike (slika 22B). Dve alelni obliki predstavljata celotni neprekinjeni kodirajoči zaporedji v dolžini 3120 bp (vštevši STOP kodon), tretje pa z ozirom na poravnavo vseh treh alelnih oblik vsebuje 73 bp dolgo vrzel za nukleotidno bazo med mestoma 1840 in 1841 v NZ, ki povzroči premik bralnega okvirja in s tem skrajšanje beljakovinskega produkta. Neprekinjeni zaporedji smo poimenovali HLVe1-2A ter HLVe1-2B, prekinjeno pa HLVe1-2T. Izmed vseh 18 klonov HLVe1-2 sta dva klona pripadala HLVe1-2A, 5 klonov HLVe1-2B in 11 klonov HLVe1-2T. Za vsako alelno obliko HLVe1-2 smo določili skupna zaporedja na podlagi ujemanj med NZ klonov in upoštevaje zaznane polimorfizme v NZ neposredno določenega NZ izhodiščnega PCR produkta. V celotni dolžini vseh klonov smo zaznali mnogo neujemanj med kloni iste alelne oblike HLVe1-2, ki so bili posledica napak pri prepisovanju v PCR, ki so se kazale kot neujemanje določene baze v NZ samo enega klona s skupnim zaporedjem oz. vsemi ostalimi kloni (slika 19).

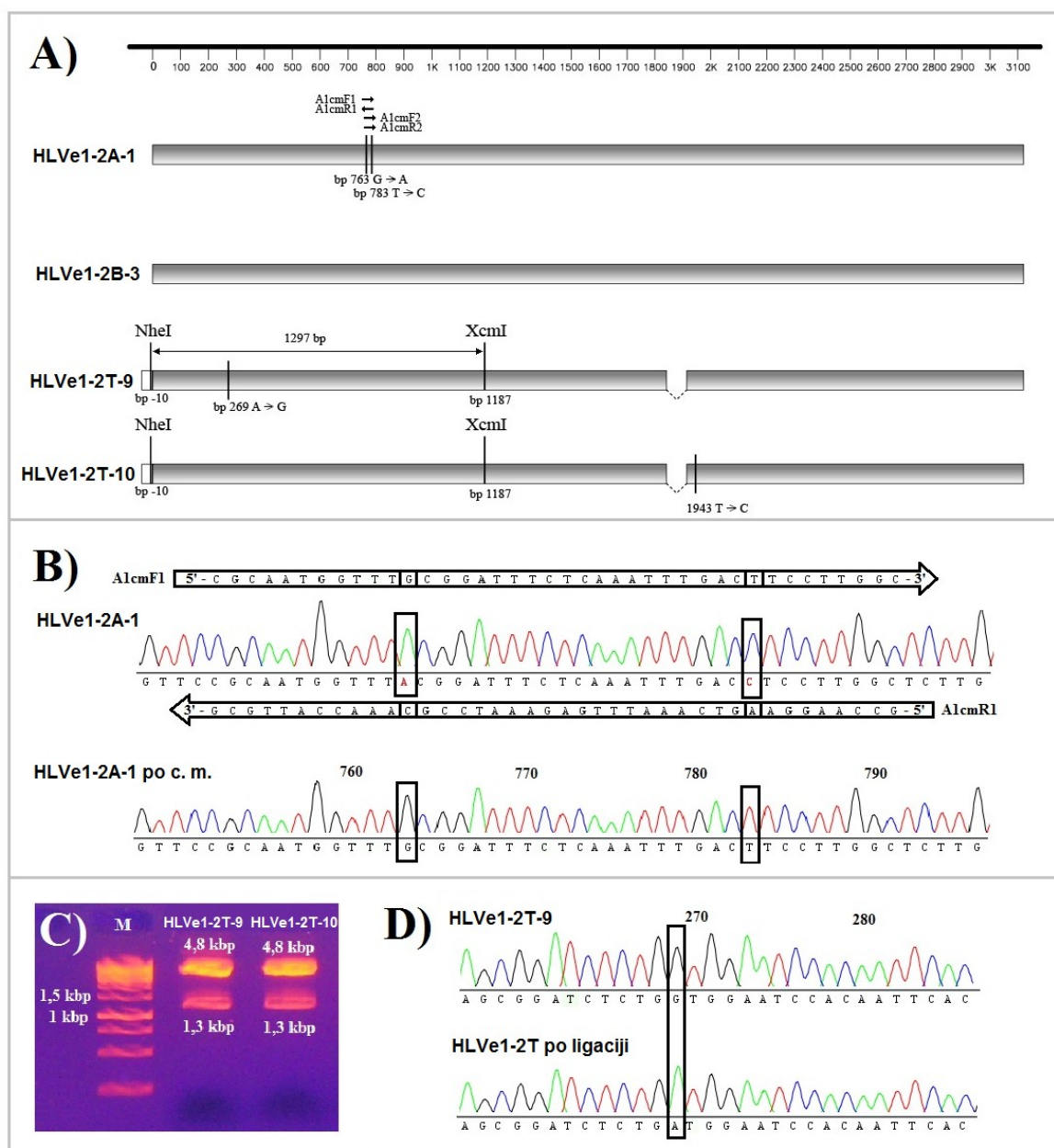


Slika 19: V postopku pomnoževanja v PCR s *Taq* polimerazo nenamerno vnešene mutacije, prikazane za vsako od 18 kloniranih HLVe1-2 zaporedij. Za imenom klona je v oklepaju podano skupno število mutacij v določenem klonu. Mesta posameznih mutacij v nukleotidnem zaporedju klona predstavlja navpična črta. Črtkana črta prikazuje lokacijo 73 bp dolge vrzeli v poravnavi HLVe1-2T s preostalima kloniranima HLVe1-2 zaporedjema.

Figure 19: Errors due to faulty polymerase activity present depicted for all HLVe1-2 cloned sequences. The sum total of all observed mutation events is shown in parentheses following clone names. Locations of individual mutations are represented by a vertical dash. The dotted line represents the location of an observed 73 bp alignment gap in HLVe1-2T clones.

Le klon HLVe1-2B-3 ni kazal nobenih s polimerazno vnešenih odstopanj od konsenzusnega zaporedja HLVe1-2B, zato je bil edini uporaben za nadaljnje postopke funkcijske karakterizacije alelnih oblik HLVe1-2. Za pridobitev popolnega NZ preostalih dveh alelnih oblik (HLVe1-2A in HLVe1-2T) smo morali uporabiti dodatne molekularno biološke postopke, opisane v nadaljevanju.

Klonirano zaporedje HLVe1-2T, enako skupnemu zaporedju te alelne oblike, smo pridobili s postopkom restrikcije in ligacije dveh klonov HLVe1-2T. Z uporabljenimi restrikcijskimi encimi smo pridobili dva fragmenta (slika 20C). Krajši fragment HLVe1-2T-10 smo ligirali v daljši fragment HLVe1-2T-9, vsebujoč celoten plazmid in večino kloniranega zaporedja HLVe1-2T. Ligacija in transformacija sta bili uspešni, pridobili smo več sto potencialno uspešnih klonov. Vsi štirje kloni, ki smo jim določili celotno NZ, so vsebovali HLVe1-2T zaporedje, enako skupnemu. Razporeditev neujemanj pri obeh klonih alelne oblike HLVe1-2A (HLVe1-2A-1 in HLVe1-2A-2) je omogočila pripravo popolnega kloniranega zaporedja HLVe1-2A s postopkom ciljane mutageneze. Z obema paroma ZO za ciljano mutagenezo smo po transformaciji kompetentnih celic dobili nekaj 100 kolonij. V obeh primerih smo soločili NZ po 4 klonov in pridobili HLVe1-2A NZ, enako skupnemu. Postopke pridobivanja kloniranih zaporedij HLVe1-2 alelnih oblik brez s *Taq* polimerazo vnešenih mutacij povzema slika 20.



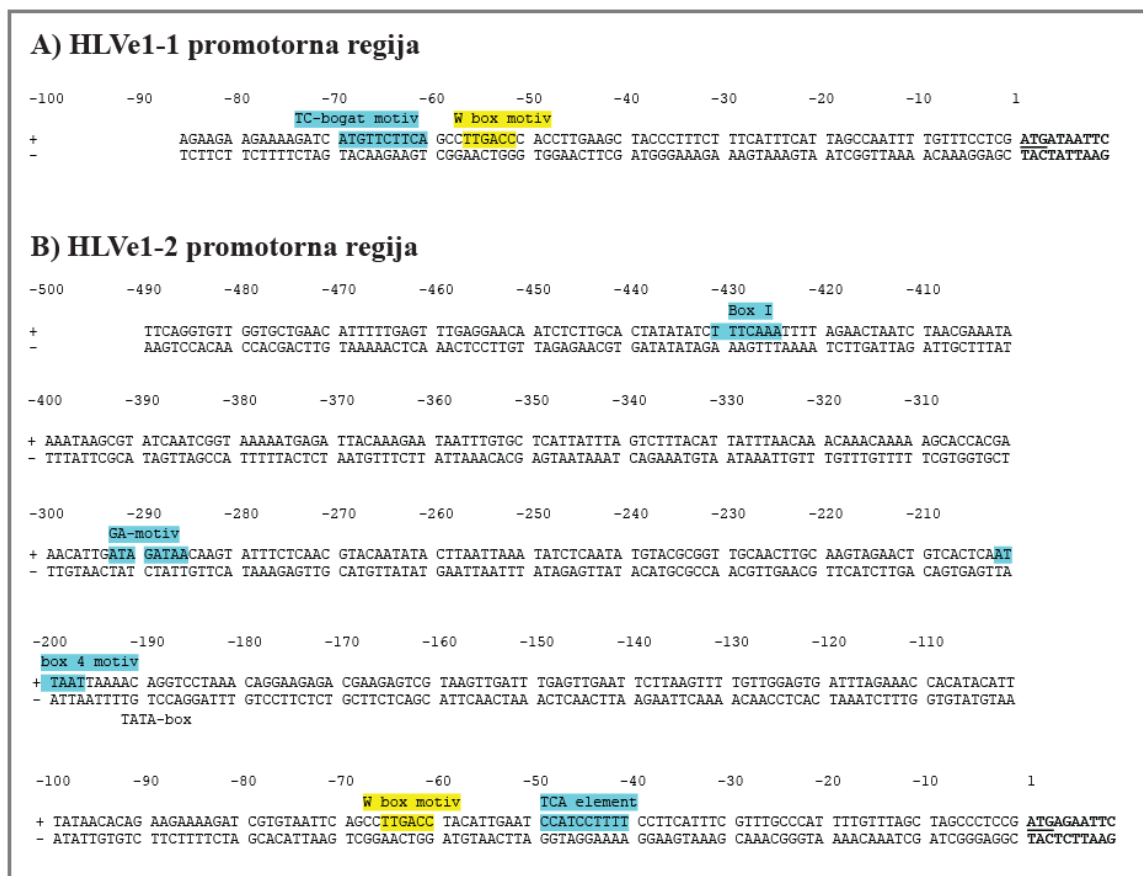
Slika 20: Pridobivanje kloniranih Ve1-podobnih zaporedij hmelja brez s *Taq* polimerazo vnešenih mutacij. A) Prikaz priprave ZO za postopek ciljne mutageneze s klonom HLVe1-2A-1 in zasnove postopka restrikcije in ligacije pravilnega zaporedja iz dveh različnih klonov HLVe1-2T. HLVe1-B-3 ni imelo nobene s *Taq* vnešene mutacije. B) V postopku ciljne mutageneze smo s prileganjem ZO s pravimi bazami na mestu mutacij v klonu HLVe1-2A-1, uspešno popravili to klonirano zaporedje. C) Ločeni produkti digestije klonov HLVe1-2T-9 in HLVe1-2T-10 z restrikcijskima encimoma NheI in XcmI. Krajši fragment klona HLVe1-2T-10 smo ligirali v daljši fragment HLVe1-2T-9. D) Po ligaciji smo pridobili skupnemu zaporedju enako NZ HLVe1-2T.

Figure 20: Retrieval of cloned Ve1-like sequences with corrected *Taq* polymerase induced mutations. A) Depiction of primer design for site-directed mutagenesis of clone HLVe1-2A-1 and design of restriction and ligation of correct sequences from two different HLVe1-2T clones. HLVe1-B-3 was free of polymerase mutations. B) Site directed mutagenesis enabled successful mending of clone HLVe1-2A-1 C) Agarose gel separated products of HLVe1-T-9 and HLVe1-2T-10 after digestion with NheI and XcmI. The shorter fragment of HLVe1-2T-10 was subsequently ligated into the longer fragment of HLVe1-2T-9. D) After ligation, an error free HLVe1-2-T cloned sequence was retrieved.

4.4 KARAKTERIZACIJA HMELJNIH HOMOLOGOV GENA Ve1

4.4.1 Promotorni regiji HLVe1-1 in HLVe1-2

S postopkom TAIL-PCR smo uspeli pridobiti 86 bp NZ promotorja HLVe1-1 in 490 bp promotorja HLVe1-2. Slika 21 prikazuje motive na ravni zaporedja, povezane z vezavo različnih modulatorjev, odgovornih za uravnavanje ravni prepisovanja.



Slika 21: Prikaz motivov za vezavo regulatornih beljakovin v promotorni regiji HLVe1-1 (A) in HLVe1-2 (B). Rumeno označen motiv (W box) je vpleten v odziv rastline na glivne patogene (Yamamoto in sod., 2004). Modro označeni motivi so vpleteni v odziv rastline na stres, odzivom na svetlobo oz. odzivom na signalizacijo s salicilno kislino.

Figure 21: Depiction of regulatory protein binding motifs in the promoter regions of HLVe1-1 (A) and HLVe1-2 (B). The motif marked with yellow (W box) is involved in plant response to fungal pathogens (Yamamoto et al., 2004). Individual motifs marked blue are involved in plant responses to stress, light responses or response to salicylic acid signalling.

Pridobljeno zaporedje promotorja HLVe1-1 je dolgo 86 bp. V njem smo zaznali dva z obrambnim odzivom rastline povezana motiva, in sicer s ponovitvami TC bogat motiv in t.i. W-box motiv. TC bogat motiv je cis-aktiven element, udeležen v obrambnih odzivih rastline in v odzivih na stres. W-box motiv naj bi sodeloval v odzivu na glivne elicitorje (Yamamoto in sod., 2004).

W-box, ki z vidika odziva na glive predstavlja potencialno pomembno mesto v zaporedju, smo zaznali tudi v HLVe1-2 promotorju. V njem smo opazili še tri v odziv na svetlobo vpletene motive, in sicer Box-I, Box4 in GA- motiv. Zaznali smo še motiv TCA element, ki je cis aktiven element, udeležen v metabolični poti salicilne kisline, ki je vpletena v obrambne odzive rastline na sistemski ravni. Oba promotorja torej vsebujeta določene motive, ki kažejo na udeležbo HLVe1-1 in HLVe1-2 genov v obrambnem odzivu rastline.

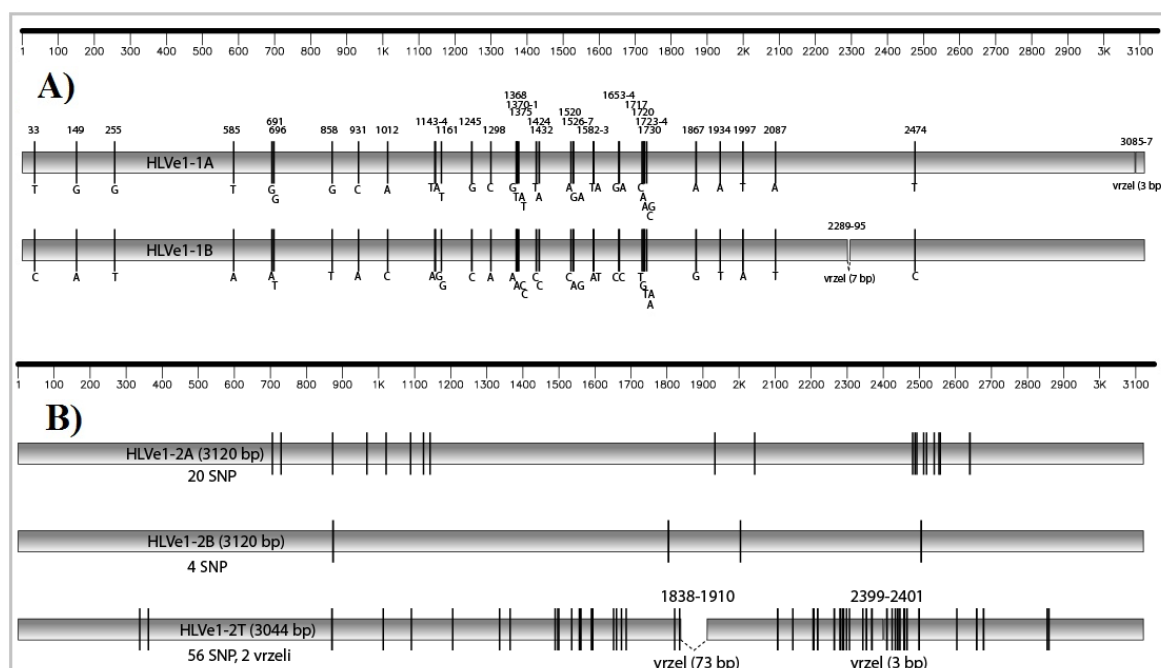
4.4.2 Analiza kodirajočih regij HLVe1-1 in HLVe1-2

V celoti smo pridobili NZ kodirajočih regij skupno 5 različnih oblik hmeljevih Ve1 homologov, in sicer dveh alelnih oblik HLVe1-1 (poimenovali smo ju HLVe1-1A in HLVe1-1B) in treh alelnih oblik HLVe1-2 - HLVe1-2A, HLVe1-2B ter skrajšano obliko HLVe1-2T. Tako za HLVe1-1 kot za HLVe1-2 smo že v začetni fazi pregleda NZ opazili, da ena od oblik (HLVe1-1B ter HLVe1-2T) predstavlja možno psevdogensko zaporedje zaradi vrzeli v kodirajoči regiji, ki spremeni bralni okvir in s tem povzroči skrajšanje beljakovine, ki je produkt gena. Preostale skupno tri oblike (HLVe1-1A ter HLVe1-2A in HLVe1-2B) na prvi pogled izgledajo funkcionalne. Za potrditev hipoteze o dejanski funkciji oz. odsotnosti le-te (stanju psevdogena) smo izvedli natančnejšo karakterizacijo zaporedij, podano v nadaljevanju.

Slika 22 podaja prikaz poravnave AZ, pridobljenih s programom Translate, za vse tri predvidoma funkcionalne oblike genov HLVe1-1 in HLVe1-2 in paradižnikovega gena Ve1, na kateri so označene lokacije posameznih funkcionalnih domen paradižnikovega gena Ve1 (Zhang, 2013). Na podlagi poravnave smo določili meje med LRR domenami vseh neprekinjenih HLVe1-1 in HLVe1-2 alelnih oblik.

4.4.2.1 Poravnava različnih alelnih oblik HLVe1-1 in HLVe1-2

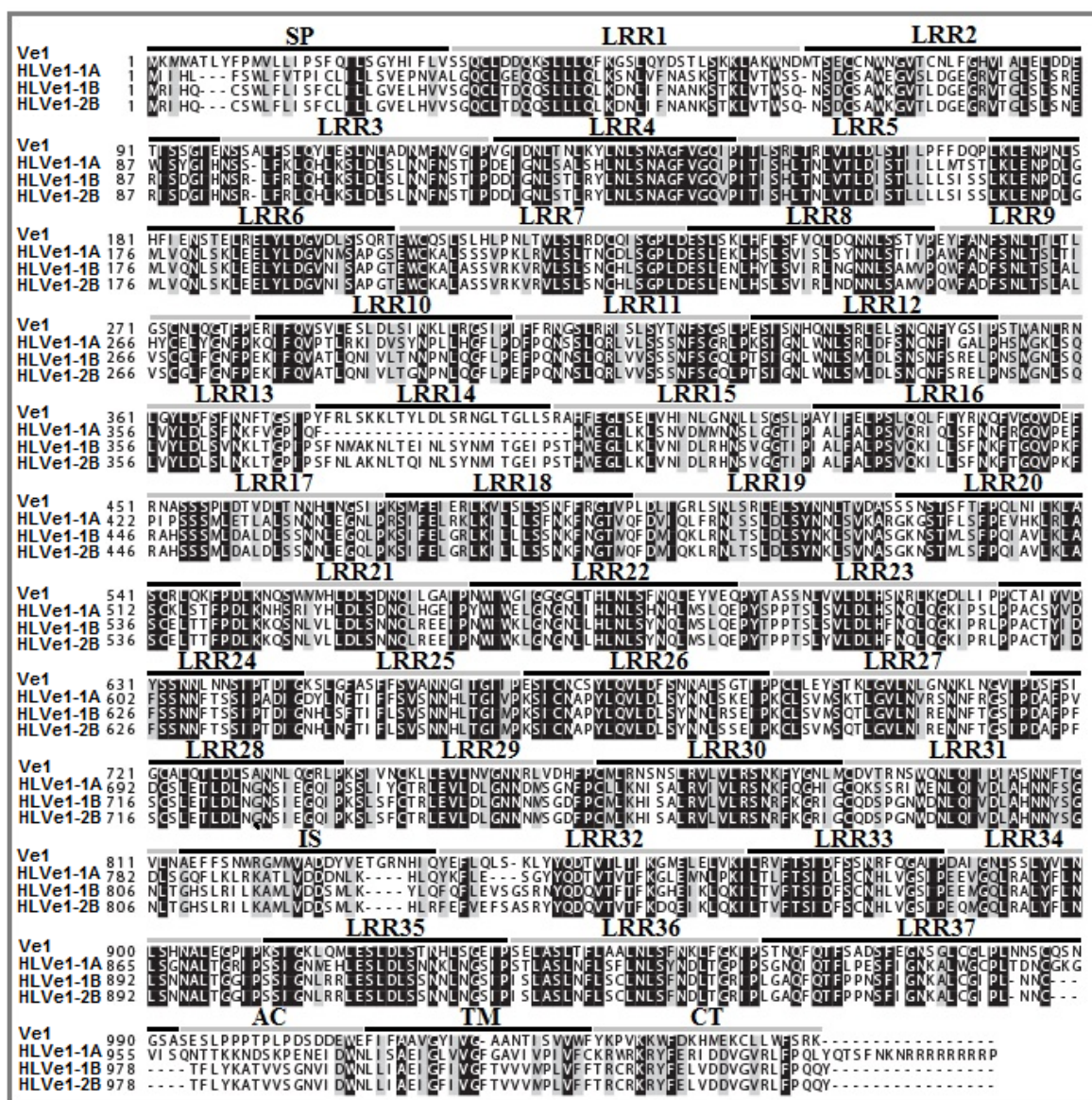
NZ obeh variant HLVe1-1 (HLVe1-1A, HLVe1-1B) in vseh treh variant HLVe1-2 (HLVe1-2A, HLVe1-2B in HLVe1-2T) smo ločeno poravnali z algoritmom ClustalX. Prikaz opaženih polimorfizmov v poravnavi posameznih alelov za HLVe1-1 in HLVe1-2 sta prikazani na sliki 22. Med HLVe1-1A in HLVe1-1B je 37 SNP, na vsakem od obeh zaporedij v poravnavi pa je ena vrzel. Med aleli HLVe1-2 se od ostalih dveh najbolj razlikuje HLVe1-2T, ki ima kar 56 privatnih SNP in že omenjeno vrzel.



Slika 22: Prikaz lokacije posameznih polimorfizmov v kloniranih zaporedjih HlVe1-1 (A) in HlVe1-2 (B). Vsaka navpična črta predstavlja en točkovni polimorfizem. Pri prikazu HlVe1-1 so prikazana stanja polimorfizma za vsakega od opaženih SNP med zaporedjima ter obe vrzeli. Pri HlVe1-2 so z navpično črto prikazana mesta, kjer se določena alelna oblika razlikuje od preostalih dveh. Pod imenom zaporedja je pripisano skupno število polimorfizmov oz. vrzeli (za katere je nad prikazom pripisan razpon v bp).
Figure 22: Depiction of the location of individual polymorphisms in cloned sequences of HlVe1-1 (A) and HlVe1-2 (B). Each vertical dash represents one polymorphic event. For HlVe1-1, the character states for each SNP as well as identified gaps are shown for each sequence. For HlVe1-2, vertical dashes represent sequence positions where one allele differs from the other two. Beneath the sequence name, the total number of SNPs and/or gaps is given (for gaps, the length is given above their respective sites).

4.4.2.2 Domene prevedenih AZ posameznih alelnih oblik HlVe1-1 in HlVe1-2

Za obe alelni obliki HlVe1-1 in vse tri alelne oblike HlVe1-2 smo določili mesto cepitve signalnega peptida s spletnim programom SignalP in razpon transmembranske regije s programom TMHMM. Razpon preostalih domen, značilnih za paradižnikov gen Ve1, in posameznih LRR motivov smo določili na podlagi poravnave z anotiranim zaporedjem Ve1 (Kawchuk in sod, 2001; Zhang., 2013). Slika 23 prikazuje poravnavo AZ Ve1 in vseh treh verjetno delujočih oblik Ve1 homologov hmelja.



Slika 23: Anotacija verjetno delujočih alelnih oblik HLVe1-1A, HLVe1-2A in HLVe1-2B s poravnavo s paradižnikovim genom Ve1, za katerega je znana razporeditev posameznih beljakovinskih domen.

Figure 23: Annotation of potentially functional hop Ve1-like alleles HLVe1-1A, HLVe1-2A and HLVe1-2B by alignment with the tomato Ve1 sequence, for which domain locations are well established.

Za vseh pet Ve1-podobnih beljakovin hmelja je značilen signalni peptid, ki se pri alelih HLVe1-1 cepi po AKO27, pri alelih HLVe1-2 pa po AKO28, kar smo določili z analizo v spletnem programu SignalP.

Pri treh verjetno delujočih HLVe1-1 oz. HLVe1-2 beljakovinah sledi LRR regija, ki je v primeru HLVe1-2A in HLVe1-2B sestavljena iz dveh domen, ločenim s t.i. otočkom (IS, island). V N-terminalni smeri od otočka je 31 LRR ponovitev, C-terminalno od otočka pa še nadaljnjih 6. Število LRR ponovitev in položaj otočka in posameznih LRR ponovitev popolnoma ustreza primarni strukturi te regije pri genu Ve1 (slika 23, slika 24). V primeru obeh alelov HLVe1-1 v celoti manjka LRR ponovitev LRR14, preostale ponovitve pa so ohranjene. HLVe1-1B se zaradi premika bralnega okvirja zaključi pri ponovitvi LRR30.

Na C-terminalnem koncu AK zaporedja HLVe1-1A, HLVe1-2A in HLVe1-2B so nanizane še tri značilne enote, in sicer domena s kislimi aminokislinami (AC), transmembranska domena (TM) in citoplazmatski rep, ki skrbi za endocitozo receptorja (CT). Pri obeh psevdogenskih zaporedjih HLVe1-2B in HLVe1-2T pride do prekinitve zaporedja s končnim kodonom v LRR regiji LRR23, zato C-terminalne domene manjkajo. Posledično beljakovina verjetno nima receptorske funkcije in predstavlja psevdogensko zaporedje.

HLVe1-1A HLVe1-1B			HLVe1-2A HLVe1-2B HLVe1-2T			
MIHLSFWLFTVPICLILLSVEPNVAL	SP	SP	MRIHQCSWLFLISFCILLGVELHV	SP	SP	SP
GQCLEGEQSLLLQLKSNLVFNANKSTKLVTWSS	LRR1	LRR1	SGQCLTDQQLSLLLQLKDNLIFFNANKSTKLVTWSQ	LRR1	LRR1	LRR1
NSDCSAWEGVSLDGEGRVTGLSLSEWISYGIH	LRR2	LRR2	NSDCSAWKGVTLDGEGRVTGLSLSENERISDGIH	LRR2	LRR2	LRR2
NSSLFLKQLHLSLDLSLNNFNSTIP	LRR3	LRR3	NSRLFRLQLHLSLDLSLNNFNSTIP	LRR3	LRR3	LRR3
DEIGNLSALSHLNLNAGFVGQIP	LRR4	LRR4	DDIGNLSTLRYLNLNAGFVGQVP	LRR4	LRR4	LRR4
ITISHLTNLVTLDISTILLMTST	LRR5	LRR5	ITISHLTNLVTLDISTILLLSISS	LRR5	LRR5	LRR5
LKLENPDLGMLVQNLKLEELYLDGVNMSAPGS	LRR6	LRR6	LKLENPDLGMLVQNLKLEELYLDGVNMSAPGT	LRR6	LRR6	LRR6
EWCKALSSVVKLRVSLTNCDSGLPD	LRR7	LRR7	EWCKALASSVRKVRVLSLNCCHLSGLPD	LRR7	LRR7	LRR7
ESLENLSLSVLSLNNLSTIIP	LRR8	LRR8	ESLENLSLSVIRLNDNNLSAMVP	LRR8	LRR8	LRR8
AWFANFNLSTLTHYCELYGNFP	LRR9	LRR9	QWFADFSNLSTLALVSCGLFGNFP	LRR9	LRR9	LRR9
KQIFQVPTLRKIDVSYNPLHGFPL	LRR10	LRR10	EKIFQVATLQNVLTGNPNLQGFPL	LRR10	LRR10	LRR10
DFPQNSLQRLVLSNFSNFGRLP	LRR11	LRR11	EFQPNNSLQRLVSSNFSNFGQLP	LRR11	LRR11	LRR11
KSIGNLWNLRLDFSNCFIGALP	LRR12	LRR12	TSIGNLWNLRLDLNCFNFSRELPL	LRR12	LRR12	LRR12
HSMGKLSQLVYLDLDFNKFVGPI	LRR13	LRR13	NSMGKLSQLVYLDLNLKLTGPI	LRR13	LRR13	LRR13
			SNLAKNLTEINLSYNMITGEIP	LRR14	LRR14	LRR14
QFHWEGLLKRDVDMKNSLGGTIP	LRR15	LRR15	STHWEGLLKLVNIDLRHNSVGGTIP	LRR15	LRR15	LRR15
IALFALPSVQRIQLSNNFRGQVP	LRR16	LRR16	IALFALPSVQKILLSFNKFTGQVP	LRR16	LRR16	LRR16
EFPISSSMLETDLSSNNLEGNLQ	LRR17	LRR17	KFRAHSSSMLDTLSSNNLEGNLQ	LRR17	LRR17	LRR17
RSIFELRKILYLPFNKFGTVQ	LRR18	LRR18	KSIFELGRKILYLPFNKFGTMQ	LRR18	LRR18	LRR18
FDVIQLSRNLSSLDLSSNNLSVKAR	LRR19	LRR19	FDVIQLSRNLSSLDLSSNNLSVNAS	LRR19	LRR19	LRR19
GKGSFSLFPEVHTLKASCKLSTFPD	LRR20	LRR20	GKNSTMLSPFQIATLKASCELTFPD	LRR20	LRR20	LRR20
LKNHSRIHLDLSDNLGHEIP	LRR21	LRR21	LKKQSNLHLDLSDNLGHEEIP	LRR21	LRR21	LRR21
YWIWELGNGLIHLNLSHNLMSLQE	LRR22	LRR22	NWIMWLGNGNLIHLNLSYNQLMSLQE	LRR22	LRR22	LRR22
PYSPSAYLYVLDLHNSNLQKIPSL	LRR23	LRR23	PYPPTSLSVLDLHFNQLHGKIPRL	LRR23	LRR23	LRR23
PPACSYVDSSNNFTSSIPADIG	LRR24	LRR24	PPACTYDSSNNFTSSIPTDIG	LRR24	LRR24	
DYLNFTJFVSNNHLTGIVP	LRR25	LRR25	NHNLFTJFVSNNHLTGIMP	LRR25	LRR25	
KSICNAPYLQVLDLSSNNLSKEIP	LRR26	LRR26	KSICNAPYLQVLDLSSNNLSSEIP	LRR26	LRR26	
KCLSDMSKTLGVNLNRSNFRGSIP	LRR27	LRR27	KCLSVMSQTLGVNLNRSNFRGSIP	LRR27	LRR27	
DAFPVDCSLETDLNGNSIEGQIP	LRR28	LRR28	DAFPVDCSLETDLNGNSIEGQIP	LRR28	LRR28	
SSLYCTRLEVLDLGNNDMSGNFP	LRR29	LRR29	KSLSFCTRLEVLDLGNNDMSGDFF	LRR29	LRR29	
CLLKNSALRVIVLRNKFQGHIG	LRR30	LRR30	CMLKHISALRVIVLRNKFGRIG	LRR30	LRR30	
CQKSSGYWENLQVDLAHNNYSGDLS	LRR31	LRR31	CQDSPGNWDLNQVDLAHNNYSGNLT	LRR31	LRR31	
GQFLKLRKATLVDDNLKHLQ	IS		GHSRLRKALMVDSDMLKHLR	IS		
YKFLESRYQDVTVTFKGLEMLNPKI	LRR32	LRR32	FEFLEVSASRYQDQVTVTFKQEIQLKI	LRR32	LRR32	
LTFTSIDLSLNNHVGSIIP	LRR33	LRR33	LTFTSIDFSCLNNHVGSIIP	LRR33	LRR33	
EEVGQLRALYFLNLSGNALTGRIP	LRR34	LRR34	EQVGQLRGLYFLNLSGNALTGTIP	LRR34	LRR34	
SSIGNMEHLESLDLSSNNKLNGLIP	LRR35	LRR35	STIGDLQLESLESLDLSSNNKLNGLIP	LRR35	LRR35	
STLASLNLFLSLNLSYNDLTGPPI	LRR36	LRR36	SSLASLNLFLSCLNLSYNDLTGRIP	LRR36	LRR36	
SGNQIQTLFPEISFNIGKALWGCPPLDNCCKGKVIS	LRR37	LRR37	LGAQFQTFPPNSFIGNKALGCIPLNLC	LRR37	LRR37	
QNTTKKNDSPENIDWN	AC		TLFYKATVVSNGVIDWN	AC		
LISAIEGLVVGFGAVIVPIVFC	TM		LLIAIEGIVGFTVVMVPLVFF	TM		
/RKRYFERIDVGVRLFPQLYQTSFNKNRRRRRRRRP	CT		TRCRKRYFELVDVGVRLFPQQY	CT		

Slika 24: Prisotnost oz. odsotnost posameznih domen oz. LRR motivov, značilnih za paradižnikov Ve1, pri vseh skupno petih alelnih oblikah obeh hmeljnih Ve1 homologov. Zraven HLVe1-1A in HLVe1-2A sta pripisani aminokislinski zaporedji posameznih domen. SP – signalni peptid, LRR1-37 – posamezne LRR ponovitve, IS – otoček (prekinitve dveh LRR regij), AC – domena s kislimi aminokislinami, TM – transmembranska regija, CT – citoplazemski rep (endocitotska domena).

Figure 24: Presence or absence of different domains and LRR motifs, characteristic for tomato Ve1, for all five allelic variants of both hop Ve1 homologues. Beside HLVe1-1A and HLVe1-2A, amino acid sequence strings for individual domains are shown. SP – signal peptide, LRR 1-37 – individual LRR repeats, IS – island domain linking two LRR domains, AC – acidic domain, TM – transmembrane region, CT – cytoplasmic tail (endocytosis motif bearing domain).

Na podlagi poravnave smo določili še identiteto s postopkom TAIL-PCR pridobljenih nadsosesk VS1a, VS2, VS3, in VS4 ter EST-RGA zaporedja HL6293, ki smo ga razvili v

MO. Vsa ta zaporedja kažejo visoko stopnjo podobnosti s HLVe1-1 oz. HLVe1-2 na nukleotidnem nivoju. Prepisana AZ v dveh primerih (VS1a in HL6293) kažejo popolno ujemanje z enim od funkcionalnih genov. Gre za odseka, ki pripadata nadsoseskama HLVe1-1 oz. HLVe1-2, a pri siceršnjih pogojih tvorbe nadsoseske vanjo nista bili dodani. Preostala tri zaporedja (VS1a, VS3 in VS4) bodisi vsebujejo vrzel v prevedenem AZ, bodisi je delu zaporedja prekinjena poravnava z Ve1-podobnimi zaporedji. Po vsej verjetnosti gre v teh treh primerih za psevdogenska zaporedja, ki ne kodirajo funkcionalnih Ve1-podobnih beljakovin, ali za podobna zaporedja LRR iz genoma hmelja.

Iz genoma hmeljnega kultivarja 'Wye Target' smo torej v celoti uspeli pridobiti tri različna potencialno delujoča Ve-podobna zaporedja (HLVe1-1A, HLVe1-2A in HLVe1-2B), dve psevdogeni Ve-podobni zaporedji (HLVe1-1B in HLVe1-2T) ter po vsej verjetnosti še tri dodatna psevdogenska ali LRR zaporedja, ki ne spadajo v nobeno od obeh okarakteriziranih skupin – skupno torej pet psevdogenih zaporedij, všteti tri samostojne soseske, dobljene v TAIL-PCR (preglednica 16, slika 14).

Preglednica 16: Identiteta preostalih nadsosesk, dobljenih s TAIL-PCR, ter Ve1-podobnega EST-RGA HL6293

Table 16: Identity of remaining with TAIL-PCR retrieved sequences and Ve1-like EST-RGA HL6293

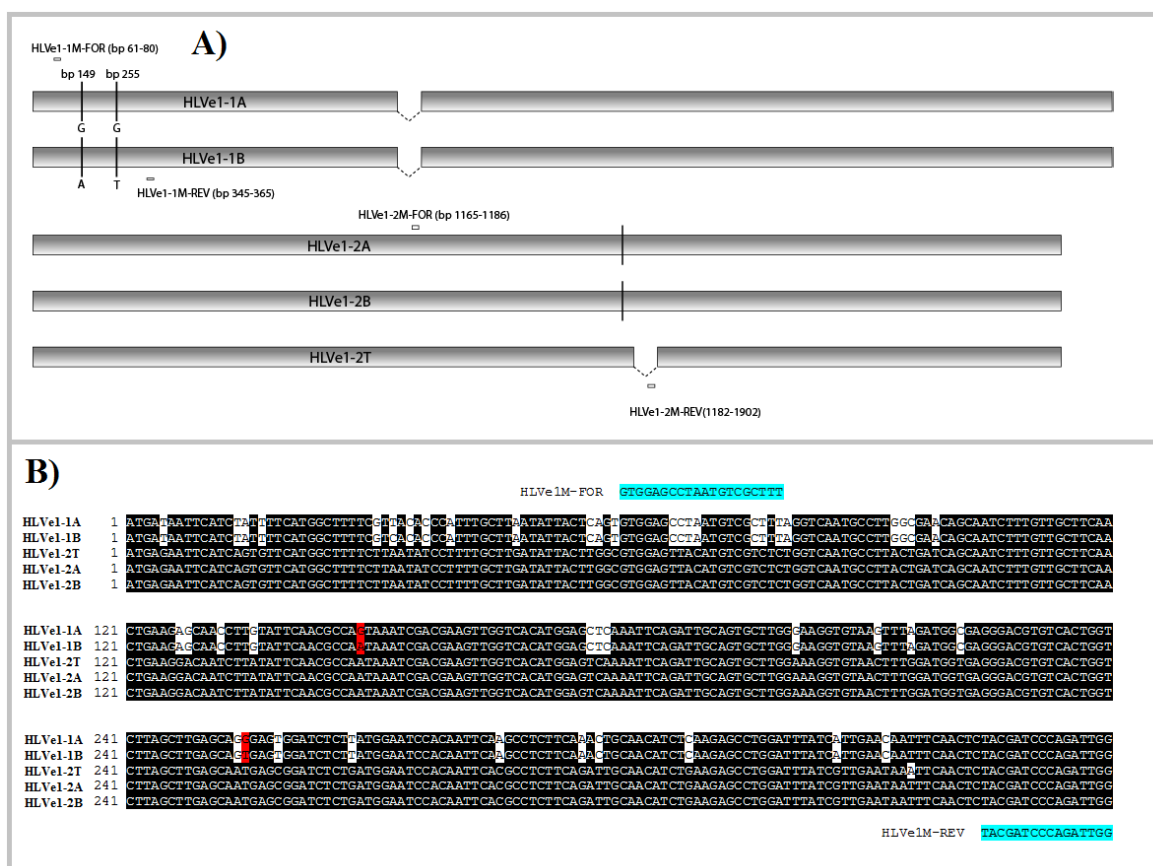
Ve1 podobno zaporedje	Identiteta
VS1a	Psevdogensko zaporedje
VS2	HLVe1-1A, AKO 582-911
VS3	Psevdogensko zaporedje
VS4	Psevdogensko zaporedje
HL6293	HLVe1-1A, AKO 0-210

4.5 PRIPRAVA MOLEKULSKIH OZNAČEVALCEV HLVE1-1 IN HLVE1-2

Molekulske označevalce na ravni NZ smo zasnovali ločeno za HLVe1-1 in HLVe1-2 na podlagi vrzeli v poravnavi med obema kodirajočima regijama genov. Tako smo dosegli pomnoževanje odseka le vsakega od homologov posebej, in sicer na mestu, kjer smo zaznali vsaj en polimorfizem tipa SNP (slika 25A).

Slika 25B prikazuje zasnovo začetnih oligonukleotidov za HLVe1-1. Za zasnovo ZO HLVe1-1M-FOR smo izbrali odsek NZ, ki se med HLVe1-1 in HLVe1-2 razlikuje v skupno 7 bazah, vključno s tremi od zadnjih štirih, s čimer smo dosegli lokusno specifično pomnožitev HLVe1-1 zaporedja.

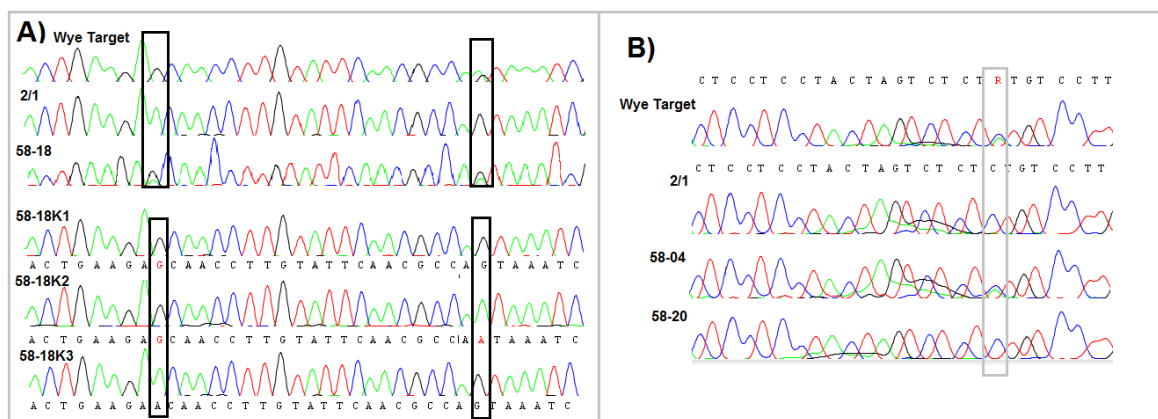
Par ZO za pomnoževanje HLVe1-2 smo zasnovali na podlagi vrzeli v NZ vseh petih alelnih oblik HLVe1-1 oz. HLVe1-2. Psevdogensko alelno obliko HLVe1-2T smo iz zasnove ZO izvzeli in predpostavili, da sta HLVe1-2A in HLVe1-2B alela lokusa HLVe1-2. ZO HLVe1-2M-F smo zasnovali v 72 bp dolgi vrzeli, značilni za HLVe1-1, ki leži med bp 1115-1186 NZ HLVe1-2. ZO HLVe1-2M-R smo zasnovali v 73 bp dolgi vrzeli v HLVe1-2-T med bp 1838 in 1910. Skupna dolžina predvidenega pomnoženega fragmenta je bila 305 bp za HLVe1-1M in 796 bp za HLVe1-2M.



Slika 25: Zasnova začetnih oligonukleotidov za molekulska označevalca HLve1-1M in HLve1-2M, pripravljena na podlagi razlik med zaporedjema HLve1-1 in HLve1-2. A) Prikaz položaja ZO in predvidenih SNP v amplikonih za zaporedji HLve1-1 in HLve1-2. B) Prileganje ZO za HLve1-1M na poravnavo vseh petih alelnih oblik HLve1-1 oz. HLve1-2.

Figure 25: Primer design for molecular markers HLve1-1M and HLve1-2M, based on nucleotide sequence mismatches between HLve1-1 and HLve1-2. A) Depiction of the position of primers on individual sequences and individual SNPs in the resulting amplicon. B) Predicted annealing of primers for HLve1-1M onto an alignment of all five allele variants of either HLve1-1 or HLve1-2.

Tako za HLve1-1M kot HLve1-2M smo uspešno pomnožili en fragment pričakovane dolžine in nato neposredno iz fragmentov pridobili NZ za oba starša in šest potomcev. V obeh primerih smo v naboru NZ zaznali pričakovane polimorfizme. Za MO HLve1-1M smo po določitvi NZ pri vseh šestih testiranih potomcih križanja opazili stanja polimorfizmov obeh materinih alelov (HLve1-1A in HLve1-1B). Predvideli smo, da lahko gre v tem primeru za podvojen gen z enakima alelnima oblikama na obeh kromosomih. Za oba starša in enega od potomcev smo izvedli kloniranje fragmenta HLve1-1M. Pri materinskem kultivarju 'Wye Target' sta bili prisotni obe predvideni obliki NZ, pri očetu BL2/1 pa le ena, ki je izkazovala dodaten SNP na mestu 128 v NZ kodirajočega zaporedja HLve1-1. Pri potomcu smo potrdili prisotnost obeh materinih oblik in očetove oblike HLve1-1M (slika 26A).

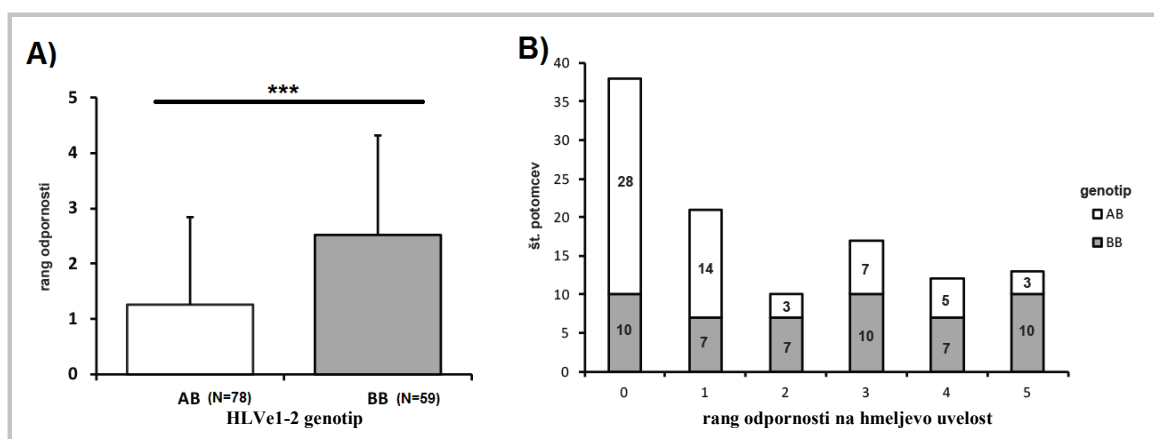


Slika 26: Segregacija HLVe1-1M in HLVe1-2M. A) HLVe1-1M glede na zaznan vzorec dedovanja predstavlja podvojen gen. Med NZ kloniranih amplikonov HLVe1-2M (58-18K1, 58-18K2 in 58-18K3) so vidni trije značilni haplotipi, in sicer haplotipa SNP obeh materinih alelov in haplotip edine očetove alelne oblike. B) Pripravljen SNP v NZ HLVe1-2M kaže pričakovano Mendelsko dedovanje in predstavlja kandidatni MO za kartiranje v družini 'Wye Target' X BL2/1.

Figure 26: Marker genotype segregation of HLVe1-1M and HLVe1-2M. A) According to observed segregation, HLVe1-1M represents a doubled gene. Marker amplicon cloning (clones 58-18K1, 58-18K2, 58-18K3) revealed that three different allelic variants are present in individual progeny, representing SNP haplotypes of both maternal and the only paternal allele variants. B) The SNP present in the HLVe1-2 sequence exhibits an usual pattern of Mendelian segregation and represents a candidate marker for mapping in the 'Wye Target' X BL2/1 mapping family.

Za HLVe1-2M, smo po določanju NZ amplikonov potomcev opazili segregacijo SNP, značilnega za alelni obliki HLVe1-2A in HLVe1-2B (slika 26B). MO HLVe1-2M smo izvednotili na celotnem potomstvu križanja 'Wye Target' x BL2/1. Za 137 potomcev smo uspeli pridobiti NZ in posledično določiti genotipe na lokusu HLVe1-2. Očetovo NZ je homozigotno za SNP, značilen za alel HLVe1-2B. Šlo je torej za križanje tipa AB x AA. Skupno 78 potomcem smo določili genotip HLVe1-2A/HLVe1-2B (AB), 59 potomcem pa genotip HLVe1-2B/HLVe1-2B (BB). Analiza variance med obema genotipoma je pokazala statistično značilno odstopanje v povprečni stopnji odpornosti potomcev na hmeljevo uvelost ($p=0,00014$; $\alpha=0,05$). Ta je bila pri genotipu AB $1,27 \pm 1,58$ (povprečje $\pm$ s.o.), pri genotipu BB pa $2,53 \pm 1,79$ (povprečje $\pm$ s.o.).

Rezultati fenotipskega vrednotenja odpornosti so na voljo za skupno 111 potomcev, in sicer 60 z genotipom AB in 51 z genotipom BB (Jakše in sod., 2013). Potomci, pri katerih je prišlo do segregacije alelne oblike HLVe1-2A, izkazujejo statistično značilno nižje izražanje simptomov hmeljeve uvelosti kot homozigoti HLVe1-2B. Porazdelitev števila potomcev s posameznimi genotipi nakazuje višjo odpornost heterozigotnih genotipov AB. V rang odpornosti 0, ki predstavlja nesimptomatske rastline, je bilo uvrščenih skupno 28 potomcev z genotipom AB, a le 10 potomcev z genotipom BB. V rang odpornosti 5, kamor spadajo popolnoma občutljive rastline, pa je bilo uvrščenih 10 potomcev z genotipom BB, a le trije potomci z genotipom AB (slika 27B).



Slika 27: Prisotnost alela HLVe1-2A v genotipu je povezana s povišano odpornostjo potomcev križanja. A) Primerjava povprečnih vrednosti razredov odpornosti na hmeljevo uvelost pri potomcih. Vrednost 5 pomeni popolnoma občutljivo rastlino, vrednost 0 pa popolnoma odporno. B) Razporeditev števila potomcev z različnimi genotipi lokusa HLVe1-2 po razredih odpornosti.

Figure 27: The detection of allele HLVe1-2A in individual genotypes may be linked to an enhanced progeny resistance. A) Comparison of average estimates of wilt resistance across both genotypes observed in individual progeny. A value of 5 was ascribed to completely susceptible plants, and a value of 0 to completely resistant ones. B) Distribution of total progeny count for both HLVe1-2 genotypes according to wilt resistance estimates.

4.6 DODAJANJE NOVIH MO NA KARTO POVEZANOSTI

Vse v tem delu proizvedene MO, ki so kazali segregacijo, smo kartirali na okvirno karto križanja 'Wye Target' x BL2/1 (Jakše in sod., 2011). Vključili smo tudi MO, za katere je bilo značilno statistično značilno odstopanje od neodvisne segregacije. Za izvedbo kartiranja je zaradi opažene segregacije polimorfizmov v potomstvu križanja ustrezalo 16 MO, in sicer 15 EST-RGA ter HLVe1-2M.

Test segregacije s statističnim testom hi-kvadrat je pokazal izrazita odstopanja od predvidene segregacije za 8 EST-RGA (50 % vseh MO). Za preostalih 7 EST-RGA in HLVe1-2M smo zaznali za neodvisno segregacijo pričakovano razmerje genotipov (preglednica 17). Za HL191 smo zaznali izrazito popačeno segregacijo (ang. distorted segregation) z enim manjkajočim genotipom (BB). To kaže na možno prisotnost letalnega alela tega lokusa, torej homozigoti za ta lokus niso viabilni.

Preglednica 17: Določitev odstopanj od predvidenega razmerja genotipov s statističnim testom χ^2 . Podana so predvidena in opažena razmerja genotipov in dobljene p-vrednosti.

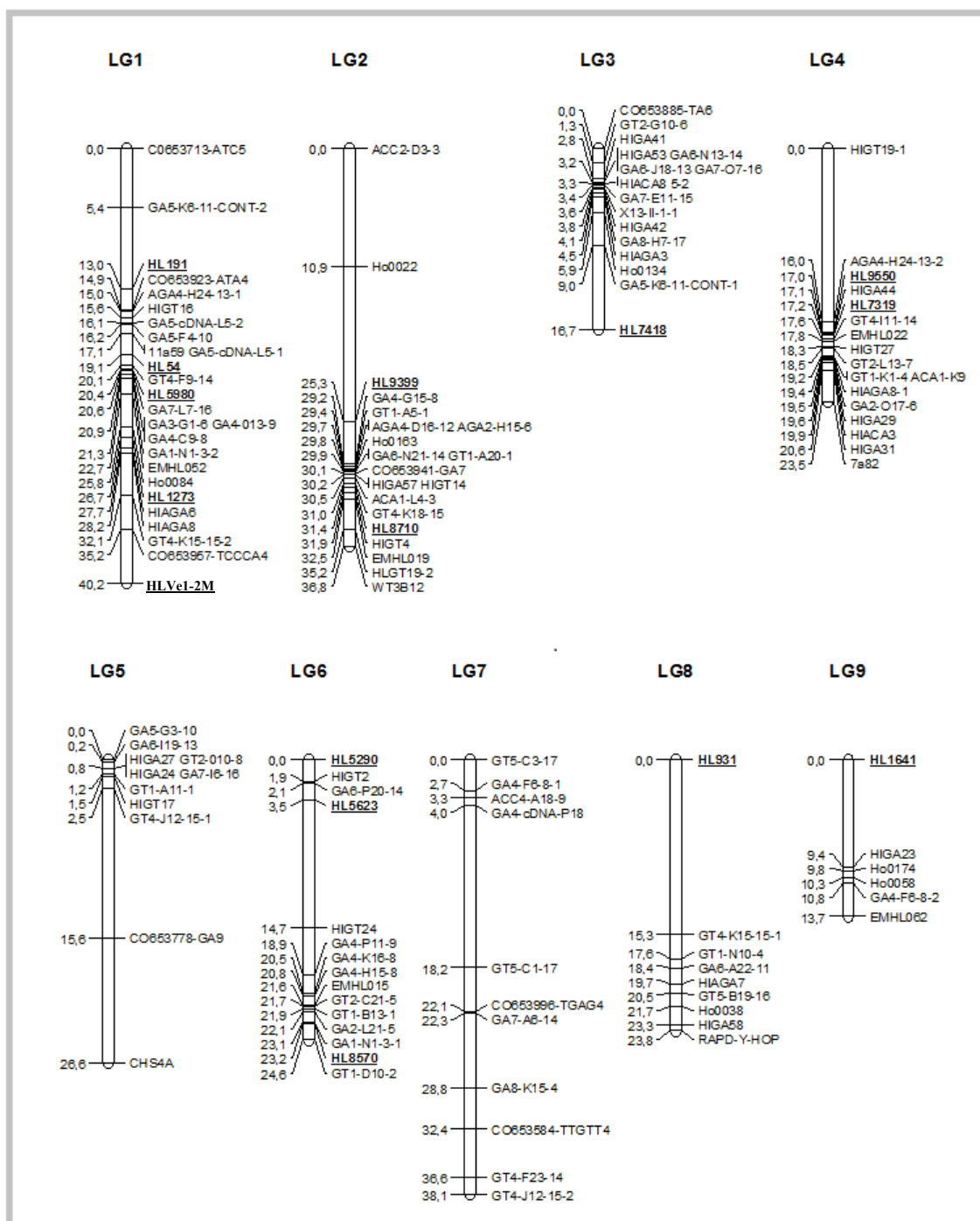
Table 17: Segregation patterns and p-values calculated in χ^2 test for individual hop EST-RGA markers

Molekulski označevalec	Starševski genotipi	Pričakovano razmerje genotipov	Opaženo razmerje genotipov	p-vrednost testa χ^2
HL54	AB X AA	1:1	80:51	$1,13 \cdot 10^{-2}*$
HL191	AB X AB	1:2:1	59:84:0	$3,01 \cdot 10^{-12}*$
HL931	AB X AA	1:1	44:84	$4,06 \cdot 10^{-4}*$
HL1273	A0 X AB	2:1:1 (a:-ab:b0)	87:34:13	$9,50 \cdot 10^{-5}*$
HL1641	AA X AB	1:1	74:67	0,555
HL5290	AA X AB	1:1	62:77	0,203
HL5623	AB X AB	1:2:1	29:79:36	0,360
HL5980	AB X AA	1:1	85:54	$8,55 \cdot 10^{-3}*$
HL7050	AA X AB	1:1	63:80	0,155
HL7319	AB X AA	1:1	95:48	$8,48 \cdot 10^{-5}*$
HL7418	AB X AA	1:1	70:74	0,738
HL8570	AA X AB	1:1	86:52	$3,80 \cdot 10^{-3}*$
HL8710	AB X AA	1:1	73:66	0,553
HL9399	AB X AA	1:1	68:71	0,799
HL9550	AB X AA	1:1	96:47	$4,17 \cdot 10^{-5}*$
HLVe1-2M	AB X AA	1:1	78:59	0,105

*statistično značilno odstopanje ($p < 0.05$)

S kartiranjem 16 MO smo dopolnili integralno karto družine 'Wye Target' X BL2/1, sestoječo iz 9 skupin povezanosti (slika 28). Nanjo smo dodali 15 novih MO. Le HL7050 nismo uspeli dodati na karto. Ta MO je sicer izkazoval zelo visoko mero povezanosti z MO CO653996-TGAG4 (LOD 12,4), GA8-K15-4 (LOD 18,5) in GA4-F6-8.1 (LOD 20,0) in bi moral pripasti skupini povezanosti LG7, a ni izkazoval zadostne mere povezanosti s vsemi preostalimi osmimi MO v tej skupini povezanosti.

Na karto smo dodali skupno 15 MO (14 EST-RGA in HLeV1-2M), ki so se razporedili po sedmih skupinah povezanosti. Le na 2 skupini povezanosti (LG5 in LG7) ni bil dodan noben novi MO. Na LG1 smo dodali skupno pet MO, med njimi HLeV1-2M, ki je bil umeščen na rob te skupine povezanosti. Na LG6 smo dodali tri MO. Na dve skupini povezanosti (LG2 in LG4) smo dodali po dva MO, na LG3, LG8 in LG9 pa po enega. Skupna dolžina okvirne karte križanja, objavljene v Jakše in sod. (2011), je bila 223,7 cM, nanjo pa je bilo kartiranih skupno 116 MO, kar predstavlja gostoto 1,93 cM na MO. Po dodatku 15 novih z odpornostnimi geni povezanih MO se je skupna dolžina karte povezanosti povečala na 244 cM (za 9,1 %), gostota MO na celotni dolžini genetske karte pa je padla na 1,86 (za 3,2 %).



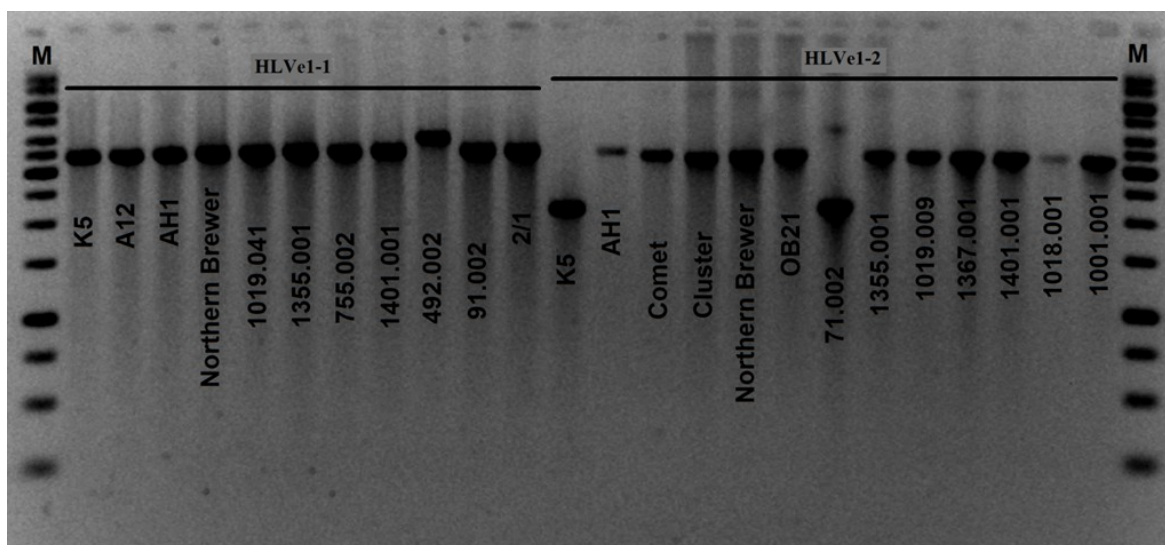
Slika 28: Okvirna karta povezanosti križanja 'Wye Target' X BL2/1 po dodatku 14 molekulskih označevalcev EST-RGA ter HLVel-2M. Vsaj en MO je bil kartiran na 7 skupin povezanosti, le dve (LG5 in LG7) sta ostali nespremenjeni.

Figure 28: The framework linkage map of the cross 'Wye Target' X BL2/1 after the addition of 14 EST-RGA markers and HLVel-2M. At least 1 novel marker was mapped onto 7 linkage groups, while two (LG5 and G7) remained unchanged.

4.7 FILOGENETSKA ANALIZA HMELJNIH VE1 HOMOLOGOV

Izvedli smo dve ločeni filogenetski analizi. Na nivoju nukleotidnih zaporedij smo izvedli analizo HLVe1-1 in HLVe1-2 zaporedij različnih hmeljnih akcesij, na nivoju aminokislinskih zaporedij pa študijo Ve1 genu podobnih zaporedij dvokaličnic, pridobljenih iz podatkovne baze GenBank. Na podlagi pridobljenih hmeljnih homologov Ve1 gena (HLVe1-1 in HLVe1-2) iz različnih akcesij hmelja smo izvedli znotrajvrstno analizo variant teh homologov.

Slika 29 prikazuje pomnožitev amplikonov HLVe1-1 in HLVe1-2 iz akcesij hmelja s PCR. Zaporedje HLVe1-1 smo uspešno pomnožili iz 10 akcesij divjega hmelja (1019.041, 1355.001, 755.002, 1401.001, 492.002, 91.002, BL2/1, K5, A12 in AH1; preglednica 1) in enega kultivarja ('Northern Brewer'). V 10 primerih smo zaznali dobro pomnožen fragment ustrezne dolžine, le fragment iz akcesije divjega hmelja 492.002 (*H. lupulus* var. *lupuloides* iz Nebraska v ZDA) je bil daljši. Za ta fragment smo s programom PyElph 1.4 ocenili dolžino in ugotovili, da gre za približno 1 kbp daljše zaporedje kot v preostalih 10 amplikonih. Zaporedje HLVe1-2 smo uspešno pomnožili s PCR iz 9 akcesij divjega hmelja (71.002, 1355.001, 1019.009, 1367.001, 1401.001, 1018.001, 1001.001), treh kultivarjev ('Comet', 'Cluster', 'Northern Brewer') in ene žlahtniteljske linije (OB21). V dveh primerih je bila zaznana pomnožitev fragmenta manjše jakosti (AH1 in 1018.001). V dodatnih dveh primerih (genotipa K5 in 71.002) smo zaznali za približno 1 kbp krajši fragment ustrezne jakosti.



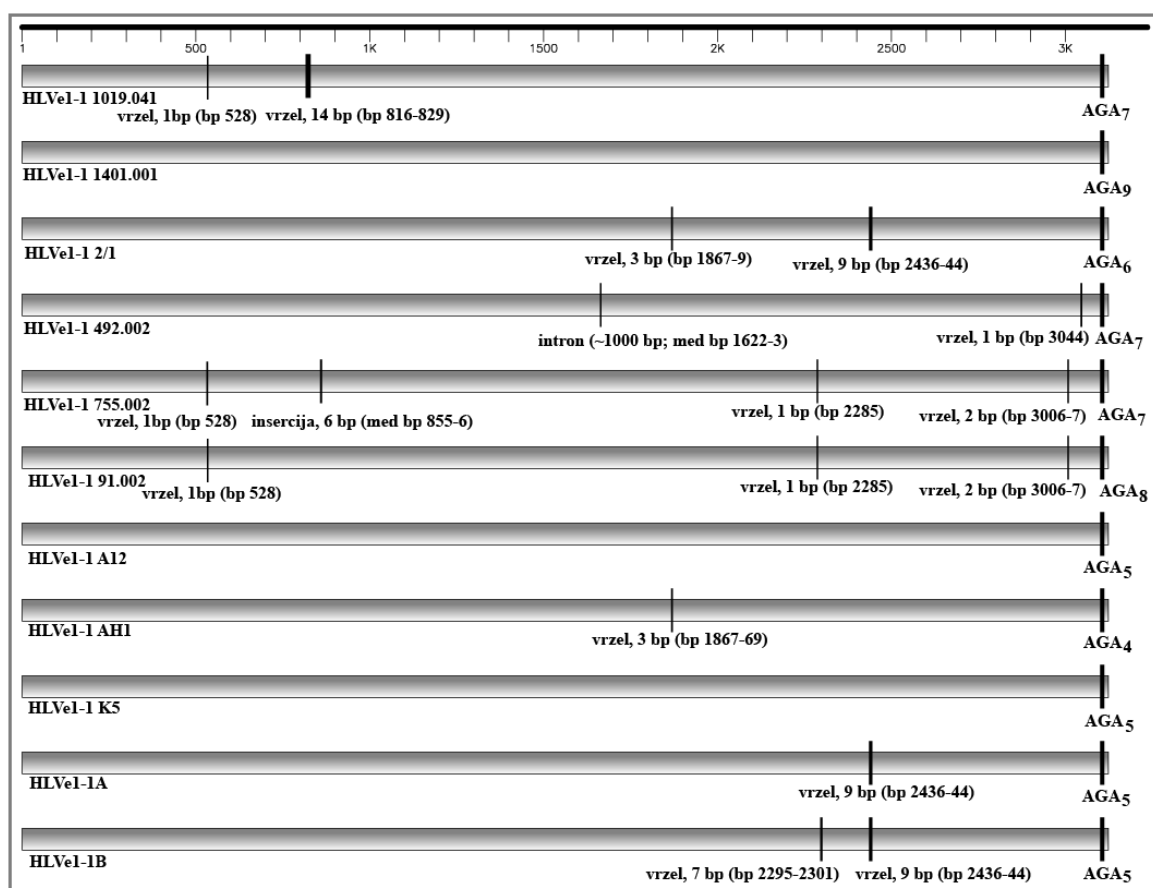
Slika 29: Pomnožitev celotnih kodirajočih zaporedij HLVe1-1 pri 11 akcesijah ter HLVe1-2 pri 13 akcesijah hmelja. V dveh primerih (AH1 in 1018.001) je bila pomnožitev HLVe1-2 šibka. V treh primerih (HLVe1-1 pri 492.002 ter HLVe1-2 pri K5 in 71.002) smo pridobili fragment dolžine, različne od pričakovane. V 10 primerih za HLVe1-1 in 9 primerih za HLVe1-2 smo zaznali ustrezno jakost fragmenta ustrezne dolžine.
Figure 29: Amplification of complete coding sequences of HLVe1-1 in 11 hop accessions and of HLVe1-2 in 13 hop accessions. In two cases (AH1 and 1018.001), amplification was weak. In 3 cases (HLVe1-1 for 492.002 and HLVe1-2 for K5 and 71.002), observed fragment size was different than expected. In 10 cases for HLVe1-1 and 9 cases for HLVe1-2, adequate amplification of a fragment of predicted size was detected.

Za vseh 11 amplikonov HLVe1-1 in za 12 od 13 amplikonov HLVe1-2 (vseh razen AH1) smo pridobili NZ v celotni dolžini pomnožene regije. V dveh primerih za HLVe1-1

('Northern Brewer' in 1355.001) in treh primerih HLVe1-2 ('Northern Brewer', 1018.001 in 1355.001) smo pridobili NZ z večjim številom polimorfizmov na ravni zaporedja in vidno prekinitvijo, predvidoma zaradi vrzeli značilne za eno od v genomu vzorca prisotnih alelnih oblik. To je onemogočilo določitev NZ po celotni kodirajoči regiji gena, zato smo ta zaporedja izvzeli iz filogenetske analize.

V posameznih pridobljenih zaporedjih HLVe1-1 in HLVe1-2 smo zaznali večje število vrzeli. V NZ HLVe1-1 akcesije 492.002, katerega izvorni fragment je na gelu kazal za približno 1 kb preveliko dolžino, smo zaznali intron, ki mu nismo uspeli v celoti določiti NZ, zato zanj točne dolžine ne poznamo.

Na 3' koncu HLVe1-1 (od bp 3100 dalje) smo zaznali različno število ponovitev očitnega genskega trinukleotidnega mikrosatelita z motivom AGA. Posebnosti za HLVe1-1 zaporedja podaja slika 30, za HLVe1-2 zaporedja pa slika 31.

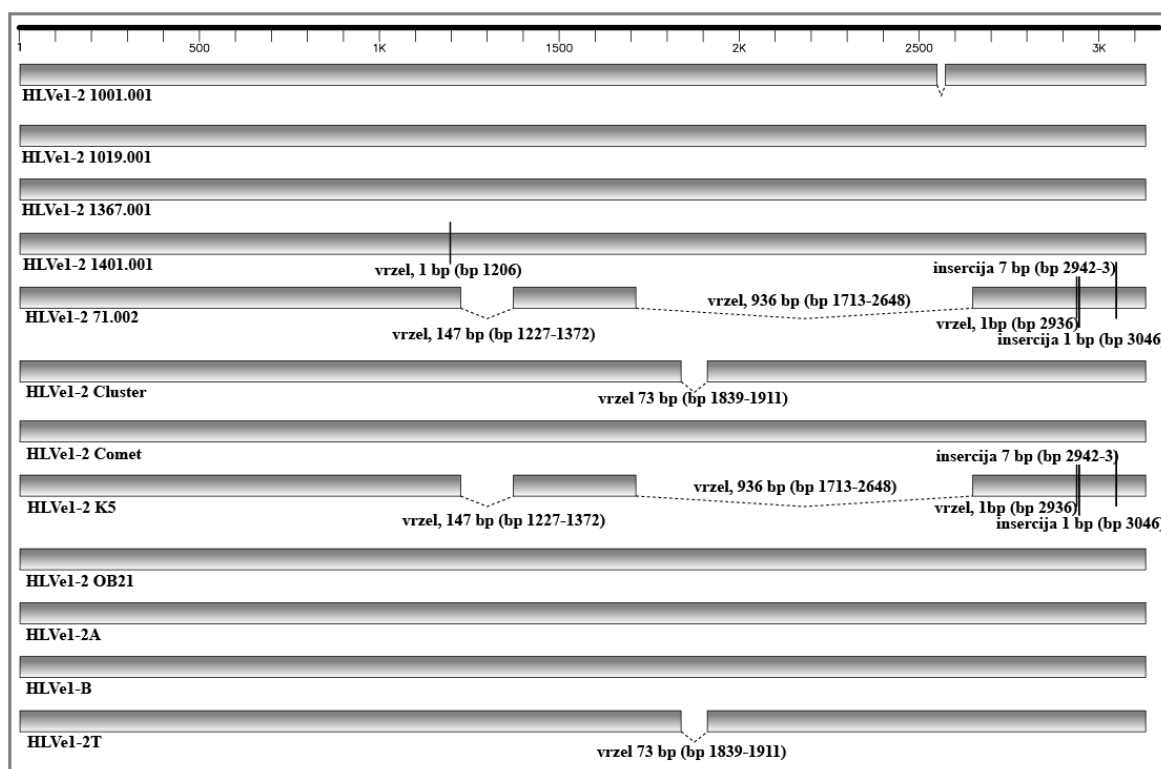


Slika 30: Opaženi polimorfizmi v zaporedjih HLVe1-1 (razen SNP) različnih akcesij hmelja. Navpične črte predstavljajo mesta krajših vzeli ali vstavitve s podanimi dolžinami, v oklepaju pa je podano njihovo mesto v zaporedju. Na 3' koncu vseh zaporedij (od bp 3100 dalje) je prisoten mikrosatelit tipa AGA_n z od 4 do 9 ponovitvami.

Figure 30: Observed sequence polymorphisms (SNPs are not shown) in HLVe1-1 sequences of different hop accessions. Vertical bars represent sites of short gaps or insertions, with length and location (in brackets) assigned. At the 3' end of all sequences (starting at bp 3100), a microsatellite of the AGA_n type with 4 to 9 repeats was observed.

V zaporedjih HLVe1-1 je smo zaznali od 0 (3 primeri – akcesije 1401.001, A12 in K5) do največ skupno 4 insercij oz. vrzeli (slika 30). Mikrosatelitno regijo in opažen intron smo odstranili iz zaporedij pred izvedbo poravnave, na ta način prirejena zaporedja pa vključili v filogenetsko analizo. Zaznali smo skupno pet primerov trištevne vrzeli in en primer trištevne insercije, ki ne izzove premika bralnega okvirja in tako ne vpliva na funkcijo gena. Takšne vrzeli so prisotne v zaporedjih HLVe1-1 akcesij BL2/1 (dve vrzeli) in AH1, ter v alelni obliki HLVe1-1A. V HLVe1-1 akcesije 755.012 so zraven 6 bp dolge insercije prisotne še tri vrzeli, dolge 1 bp (dvakrat) oz. 2 bp, pri alelni obliki HLVe1-1B pa je prisotna 7 bp vrzel za mestom 2295 v zaporedju. Pojav takšnih vrzeli ima za posledico premik bralnega okvirja, kar se ob prepisovanju gena odraži v izgubi funkcije prevedene beljakovine. Gre torej za psevdogeni zaporedji, h katerim zaradi podobnih vrzeli spadajo še HLVe1-1 akcesij 1019.041, 492.002, in 91.002. Tri HLVe1-1 zaporedja ne vsebujejo insercij ali vrzeli (iz akcesij 1401.001, A12 in K5). Predvidoma delujočih genov je torej med HLVe1-1 zaporedji skupno 6, predvidenih psevdogenov pa preostalih 5.

Opažene vrzeli lahko služijo kot filogenetski znak. Vrzel dolžine 9 bp je prisotna pri alelnih oblikah HLVe1-1A in HLVe1-1B, pa tudi v HLVe1-1 hmeljne akcesije BL2/1. Slednja ima na mestu 1867-9 vrzel dolžini 3 bp, ki je prisotna tudi v HLVe1-1 iz altajske akcesije AH1. V HLVe1-1 ameriških akcesij 755.002 in 91.002 sta na enakih mestih v zaporedju prisotni dve vrzeli (po 2 bp oz. 1 bp; slika 30).



Slika 31: Vrzeli in insercije v zaporedjih HLVe1-2 različnih akcesij hmelja. Navpične črte predstavljajo mesta krajših vzeli ali insercij s podanimi dolžinami, prekinjene črte pa razpon daljših vrzeli. V oklepaju je podan razpon vrzeli v nukleotidnem zaporedju.

Figure 31: Gaps and insertions in HLVe1-2 sequences of individual hop accessions. Vertical bars denote sites of short gaps or insertions, and dashed lines denote long gaps. Gap length and location (in brackets) is assigned to each instance.

V vseh 11 HLVe1-1 zaporedjih je za mestom 3100 prisoten mikrosatelit tipa AGA_n. Število ponovitev je med 4 in 9 (točno število podaja slika 30). Mikrosatelit je trišteven in na koncu gena, zato je možno, da ne vpliva na delovanje beljakovine, ki jo gen kodira.

Pri zaporedjih HLVe1-2 smo opazili manjše število posebnosti, in sicer skupno 6 primerov daljših vrzeli in en primer insercije (slika 31). Šest od teh posebnosti se pojavlja pri po dveh različnih zaporedjih HLVe1-2. V zaporedju HLVe1-2 evropskih akcesij 71.002 in K5 sta prisotni dve daljši trištevni vrzeli (147 bp in 936 bp), na koncu zaporedja pa še dve kratki vrzeli in ena kratka insercija. Že omenjeno 73 bp dolgo vrzel pri alelni obliki HLVe1-2T smo zaznali še pri HLVe1-2 zaporedju iz kultivarja 'Cluster'. Pri zaporedju HLVe1-2 akcesije 1401.001 je na mestu 1206 prisotna 1 bp dolga delecija. Opisanih 5 zaporedij predstavlja potencialne psevdogene, preostalih 7 HLVe1-2 zaporedij pa je potencialno delujočih.

Da bi bolj zanesljivo določili, katera pridobljena zaporedja so verjetno psevdogenska, smo v programu Translate strežnika ExPaSy vsa zaporedja prevedli v vseh šest bralnih okvirjev in zabeležili položaj končnih (stop) kodonov v zaporedjih, ki je lahko posledica spremembe bralnega okvirja ali pa mutacij posameznih nukleotidov (preglednica 18).

Preglednica 18: Določitev mesta končnega (stop) kodona v NZ posameznih HLVe1-1 in HLVe1-2 zaporedij posameznih hmeljnih akcesij.

Table 18: Determination of the terminal (stop) codon site in nucleotide sequences of HLVe1-1 and HLVe1-2 sequences of individual hop accessions.

Zaporedje	Izvorna akcesija	Mesto končnega kodona	Skupna dolžina beljakovine
HLVe1-1.1	1019.041	bp 574-6	191 AKO*
HLVe1-1.2	1401.001	bp 3121-3	1038 AKO
HLVe1-1.3	BL2/1	bp 3109-11	1034 AKO
HLVe1-1.4	492.002	bp 3046-8	1015 AKO
HLVe1-1.5	755.002	bp 574-6	191 AKO*
HLVe1-1.6	91.002	bp 574-6	191 AKO*
HLVe1-1.7	A12	bp 3112-4	1037 AKO
HLVe1-1.8	AH1	bp 3115-7	1038 AKO
HLVe1-1.9	K5	bp 3115-7	1038 AKO
HLVe1-2.1	1001.001	bp 2575-7	858 AKO*
HLVe1-2.2	1019.001	bp 3118-20	1039 AKO
HLVe1-2.3	1367.001	bp 3118-20	1039 AKO
HLVe1-2.4	1401.001	bp 1216-8	405 AKO*
HLVe1-2.5	71.002	bp 2005-2007 (bp 3079-81 poravnave)	668 AKO*
HLVe1-2.6	Cluster	bp 1966-8	655 AKO*
HLVe1-2.7	Comet	bp 3118-20	1039 AKO
HLVe1-2.8	K5	bp 2005-2007 (bp 3079-81 poravnave)	668 AKO*
HLVe1-2.9	OB21	bp 3118-20	1039 AKO

*psevdogensko zaporedje

^a zaporedji imata končni kodon na mestu 3079-81 poravnave (AKO 1026), torej je produkt gena lahko delujoča beljakovina

Med zaporedji HLVe1-1 iz posameznih akcesij je torej 6 verjetno funkcionalnih genov in 3 psevdogeni. Med zaporedji HLVe1-2 iz akcesij so verjetno funkcionalni štirje geni, psevdogenov pa je pet. HLVe1-1 zaporedje akcesije 492.002 je prekinjeno v domeni CT, in sicer 48 bp pred mikrosatelitnim priveskom, kar ne vpliva nujno na funkcijo, torej lahko

tudi v tem primeru gre za funkcionalno obliko gena. Dve skrajšani zaporedji glede na poravnavo (t.j. HLVe1-2 zaporedji akcesij 71.002 in K5) bi lahko potencialno predstavljali funkcionalna gena, če bi izkazovali neprekinjene posamezne funkcijske domene na koncu beljakovine (domene TM in CT ter vmesne domene). Poravnava z anotiranim HLVe1-2 genom pa je pokazala prvo prekinitev (1 bp dolgo vrzel, slika 31) v začetku domene, bogate s kislimi aminokislinami takoj za zadnjim LRR motivom. Tudi v tem primeru gre torej zelo verjetno za psevdogenski zaporedji. Psevdogenska zaporedja smo iz nadaljnje analize variabilnosti zaporedij kodirajočih zaporedij izločili, saj niso podvržena selekcijskemu pritisku in lahko nosijo slučajne mutacije, ki lahko za namene naše analize (ocena razmerja sinonimnih in nesinonimnih mutacij v zaporedjih pod selekcijskim pritiskom) povzročajo filogenetski šum.

Za vseh 7 funkcionalnih HLVe1-1 zaporedij (HLVe1-1A, HLVe1-1.2, HLVe1-1.3, HLVe1-1.4, HLVe1-1.7, HLVe1-1.8 in HLVe1-1.9) in vseh 6 funkcionalnih HLVe1-2 zaporedij (HLVe1-2A, HLVe1-2B, HLVe1-2.2, HLVe1-2.3, HLVe1-2.7, HLVe1-2.9) smo pripravili novi poravnave v programu MUSCLE. V programu DnaSP smo nato opravili analizo variabilnosti zaporedij (preglednica 19).

Preglednica 19: Izračun posameznih parametrov, nanašajočih se na variabilnost zaporedij v poravnah funkcionalnih regij HLVe1-1 in HLVe1-2. Pokazatelj selekcijskega pritiska na zaporedja, π_a/π_s , ima za zaporedja v poravnavi HLVe1-1 vrednost 0,91, za zaporedja v poravnavi HLVe1-2 pa 2,02, kar pri slednjem kaže na pozitivno selekcijo v kodirajočih zaporedjih.

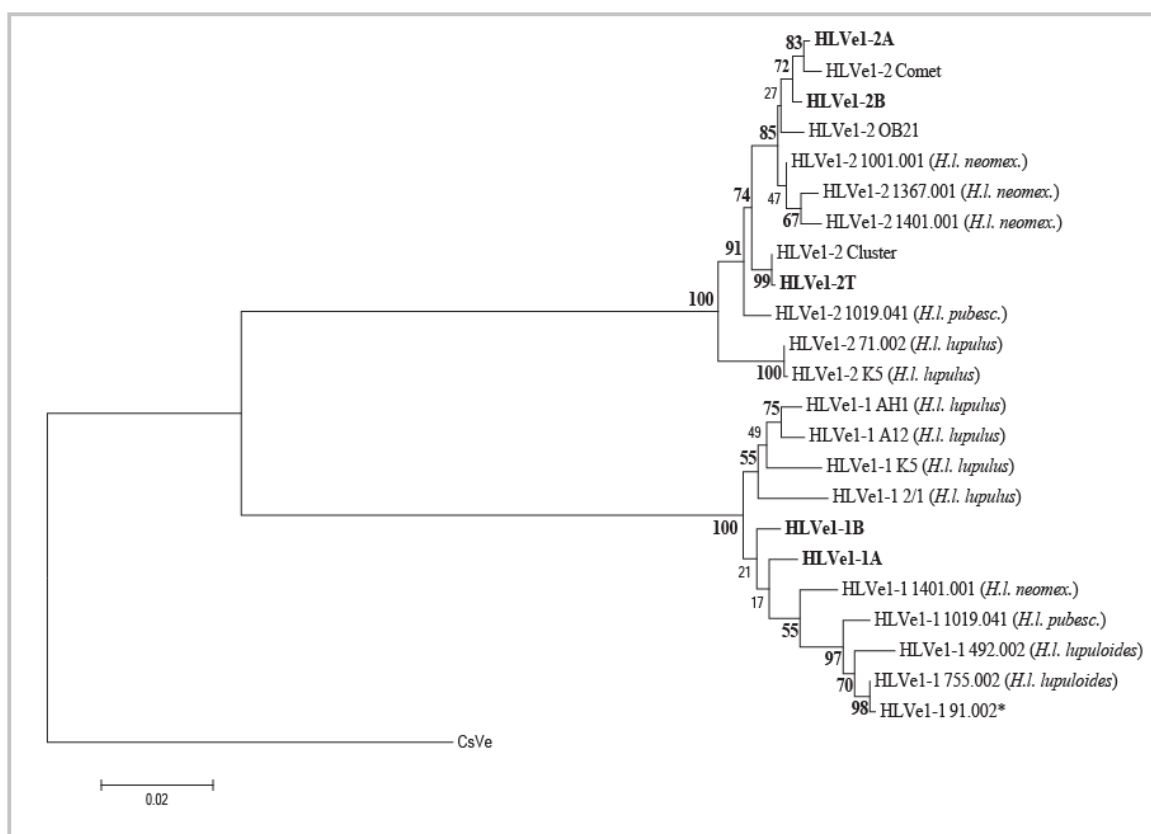
Table 19: Values of individual measures of sequence variability for alignments of functional regions of HLVe1-1 and HLVe1-2. π_a/π_s , which is a valid indicator of positive selection acting onto a sequence, amounts to 0,91 in HLVe1-1 and to as much as 2,02 in HLVe1-2, which indicates that positive selection is acting onto the latter.

	HLVe1-1	HLVe1-2
Št. variabilnih mest	151	95
Št. sinonimnih mutacij	39	14
Št. nesinonimnih mutacij	106	84
π	0,019	0,013
π_a	0,021	0,015
π_s	0,019	0,0076
π_a/π_s	0,91	2,02

Število variabilnih mest v celotni kodirajoči regiji HLVe1-1 je bilo 151, pri HLVe1-2 pa nekoliko nižje (95). Pri HLVe1-2 smo zaznali bistveno manj sinonimnih mutacij (14) kot pri HLVe1-1 (39). Tudi nesinonimnih mutacij je bilo nekoliko manj, in sicer 106 proti 84 v prid HLVe1-1. Povprečno število mutacij v zaporedju (π) je bilo 1,9 % za HLVe1-1 oz 1,3 % za HLVe1-2. Razmerje med sinonimnimi in nesinonimnimi mutacijami π_a/π_s je za HLVe1-1 znašalo 0,91, torej je gen morebiti podvržen blagi stabilizirajoči selekciji. Nasprotno pa je znašala vrednost π_a/π_s za zaporedja HLVe1-2 2,02. To je indikator, da je kodirajoča regija gena HLVe1-2 morda podvržena pozitivni selekciji na večjem številu kodonov, kar je značilnost nekaterih funkcionalnih R genov.

4.7.1 Filogenetska analiza NZ Ve1 homologov hmelja

MUSCLE poravnavo kodirajočih Ve1 homologov hmelja smo pripravili na podlagi 11 zaporedij HLVe1-1 (vseh 9 preostalih akcesijskih, HLVe1-1A in HLVe1-1B), 11 zaporedij HLVe1-2 (vseh 9 preostalih akcesijskih in HLVe1-2A, HLVe1-2B in HLVe1-2T) in konopljinega zaporedja CsVe, ki smo ga uporabili kot zunanjo skupino za razločevanje zaporedij hmelja. Kot najboljši model nukleotidnih zamenjav smo predhodno določili Jukes-Cantor model brez predvidenih invariantnih mest in brez gama korekcije. Konsenzusno filogenetsko drevo za hmeljne Ve1 homologe prikazuje slika 32.



Slika 32: Filogenetsko drevo sorodstvenih razmerij med nukleotidnimi zaporedji hmeljnih Ve1-podobnih zaporedij. Kot zunanja skupina je bilo uporabljeno Ve1-podobno zaporedje konoplje (CsVe). Zaporedja HLVe1-1 in HLVe1-2 so nedvoumno ločena v dve skupini. Imena taksonov, označena krepko, označujejo Ve1-podobna zaporedja iz kultivarja 'Wye Target'. Krepko označene vrednosti ob vozliščih so vrednosti, dobljene po metodi vezanja, višje od 50 (od največ 100), ki predstavljajo dobro podporo kladu za vozliščem. Figure 32: Phylogeny of hop Ve-like sequences inferred upon the nucleotide sequence alignment. A Ve-like sequence of hemp (CsVe) was used as an outgroup. HLVe1-1 and HLVe1-2 sequences fell into two distinct groups. Names highlighted in bold represent Ve-like sequences from the cultivar 'Wye Target'. Values at nodes, also in bold, represent bootstrap values above 50 (of 100), i. e. adequate support for individual nodes.

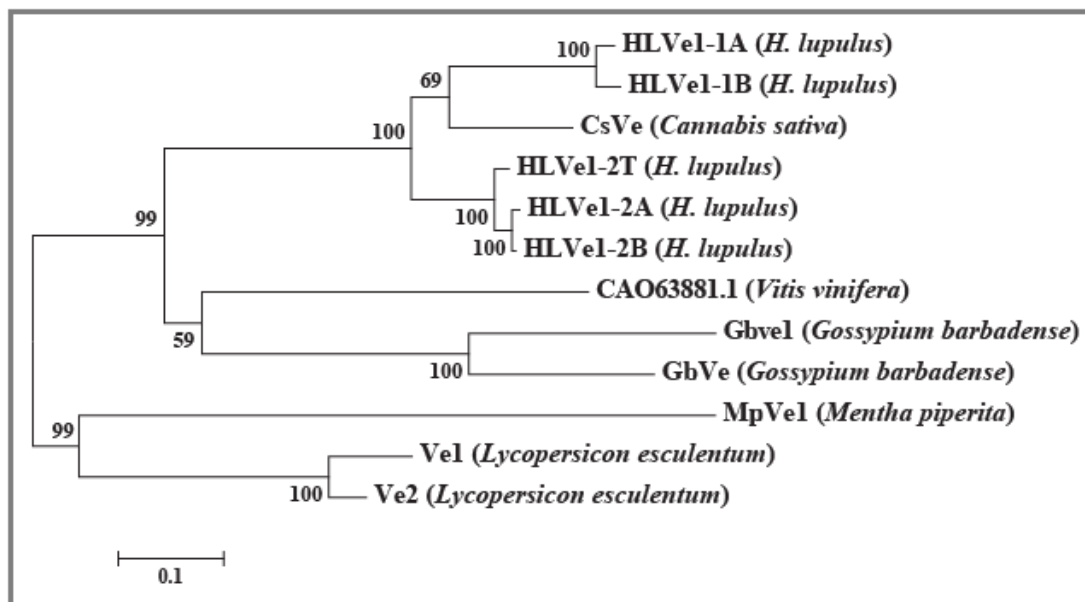
HLVe1-1 in HLVe1-2 zaporedja so bila po pričakovanju razločno ločena v dve skupini. Znotraj klada smo v obeh primerih opazili nedvoumno ločitev vzorcev z ameriško (*H. lupulus* var. *neomexicanus*, *H. lupulus* var. *lupuloides* oz. *H. lupulus* var. *pubescens*) ali evropsko dednino (*H. lupulus* var. *lupulus*). Vsi trije aleli HLVe1-2 iz kultivarja 'Wye Target' spadajo v isto skupino kot ameriške divje akcesije. HLVe1-2A kaže največjo podobnost s HLVe1-2 zaporedjem kultivarja Comet. Gre za ameriški kultivar hmelja, ki pa

je bil požlahtnjen z genetsko osnovo klasičnih angleških kultivarjev. Skupaj z Ve2B, OB21 (oče 'Northern Brewerja') in tremi divjimi hmelji podvrste *H. lupulus* var. *neomexicanus* tvori skupino, ki ji je sestrsko skupina s HLVe1-2T kultivarja 'Wye Target' in HLVe1-2 kultivarja 'Cluster'. Celotna skupina predstavlja akcesije oz. kultivarje s predniki z ameriško dednino, prejeta iz *H. lupulus* var. *neomexicanus*. Tej skupini se pridružuje še zaporedje HLVe1-2 iz ene akcesije *H. lupulus* var. *pubescens* v monofilum, ki združuje vse vzorce ameriške dednine, ki smo jim določili NZ. Ostro ločena od te je sestrsko skupina dveh evropskih akcesij *H. lupulus* var. *lupulus* (slovenske akcesije BL2/1 in kavkaške akcesije K5).

V primeru klada z 11 HLVe1-1 zaporedji je tudi vidna ločitev na zaporedja z izvorom iz evropske (klad s 4 zaporedji) in ameriške (klad s 6 zaporedji). Zaporedji HLVe1-1A in HLVe1-2 iz kultivarja 'Wye Target' ne spadata v nobeno od obeh skupin.

4.7.2 Filogenetska analiza AZ Ve1 homologov pri različnih rastlinskih vrstah

Za izračun filogenetskega drevesa z metodo največjega verjetja smo uporabili model WAG (Whelan-Goldman) z upoštevanjem frekvenc in invariantnih mest ter z uporabo gama distribucije s 5 kategorijami, po heuristični metodi NNI (zamenjava najbližjih sosedov, ang. nearest neighbor interchange). V analizo smo vključili prevedena AZ vseh petih alelnih oblik HLVe1-1 oz. HLVe1-2, opisanih v tem delu, konopljinega zaporedja CsVe ter petih bolje okarakteriziranih in objavljenih Ve1-podobnih zaporedij (Ve1 in Ve2 iz paradižnika, Gbve1 in GbVe iz bombaža, ter mVe1 iz mete). V poravnavo smo vključili še Ve1-podobno zaporedje vinske trte (CAO63881.1). Filogenetsko drevo je prikazano na sliki 33.



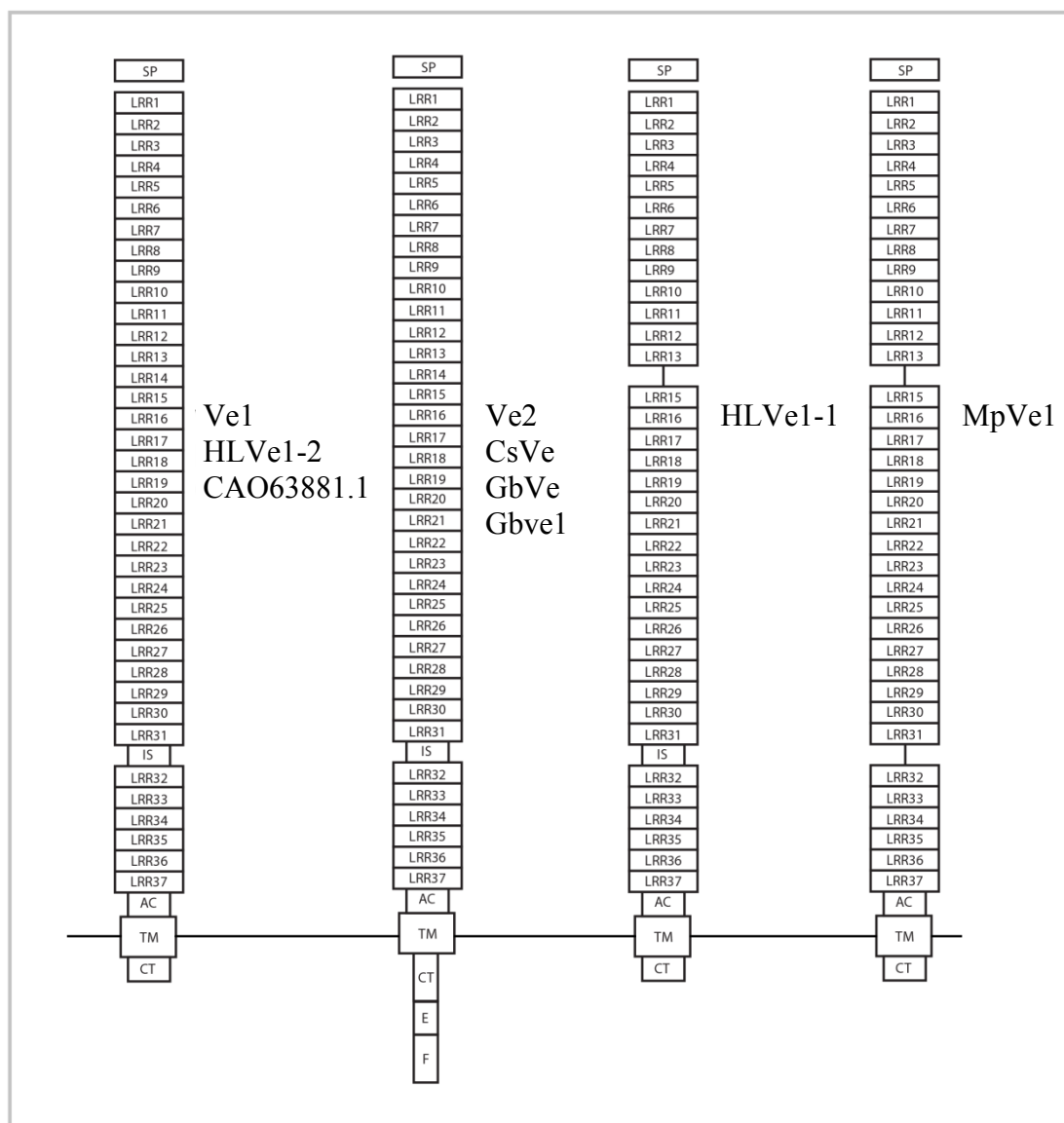
Slika 33: Filogenetsko drevo Ve1-podobnih zaporedij šestih rastlinskih vrst. Drevo je bilo določeno po metodi največjega verjetja (ML) ob implementaciji modela substitucij WAG s 1000 ponovitvami metode vezanja.

Figure 33: Phylogeny of Ve1-like sequences of five plant species. The phylogenetic tree was determined with a maximum likelihood (ML) approach implementing the WAG substitution model with a bootstrap of 1000.

Združitev v skupine se sklada s siceršnjimi sorodstvenimi odnosi izvornih vrst Ve1-podobnih zaporedij. Ve1-podobno zaporedje vinske trte (CAO63881.1) tvori monofilum z Ve1 homologoma bombaža. To ne odraža poznanih filogenetskih odnosov obeh vrst, kar morda nakazuje dokaj nizka podpora vozlišču (59 od 100). Ve1-podobna zaporedja iz konopljevke so sestrsko obema Ve1-podobnima zaporedjema iz bombaža. Prav tako je zaporedje MpVe1 iz mete sestrsko genoma Ve1 in Ve2 iz paradižnika, vendar velika dolžina veje, ki nosi MpVe1, nakazuje izjemno veliko filogenetsko oddaljenost.

HLVe1-1 zaporedja iz hmelja so s konopljinim zaporedjem CsVe združene v skupino, ki so ji zaporedja HLeVe1-2 sestrsko skupina. To kaže na možnost, da je prišlo do podvojitve obeh genov pred ločitvijo obeh vrst. Pri konoplji je bil HLeVe1-1 izgubljen, ali pa se ne izraža v zadostni meri in njegovo NZ posledično ni dostopno. Zaporedje CsVe je bilo namreč pridobljeno iz baze prepisanih zaporedij konoplje.

Na podlagi poravnave vseh zaporedij smo lahko nedvoumno proučili prisotnost in razpon posameznih domen v vsakem poravnanem zaporedju z ozirom na anotirani zaporedji Ve1 in Ve2 paradižnika. Vseh 9 v analizi uporabljenih AZ kaže visoko mero podobnosti bodisi z genom Ve1 ali Ve2, tudi glede na število in položaj posameznih LRR ponovitev (slika 34). Popolnoma enako domensko strukturo kot Ve1 paradižnika imata v tej raziskavi izoliran gen HLeVe1-2 in zaporedje CAO63881.1 iz vinske trte. Ve1 sta podobna še HLeVe1-1, v katerem manjka LRR ponovitev LRR14, ter MpVe1, kjer zraven LRR14 manjka še otoček (IS) med obema LRR delnima regijama, ki ga obdajata. Za paradižnikov Ve1 značilne znotrajcelične signalne domene, t.j. domena s kislimi aminokislinami (AC), transmembranska domena (TM) in citoplazemski rep (CT) so ohranjene pri vseh analiziranih homologih Ve1.



Slika 34: Prikaz domenske strukture beljakovinskih produktov v filogenetskih analizah uporabljenih Ve1-podobnih zaporedij. Vseh devet genov spada glede na v beljakovini prisotne domene v štiri podrazrede. HlVe1-2 je po domenski strukturi popolnoma enak paradižnikovemu genu Ve1.

Figure 34: Depiction of the domain structure of putative translated protein products for all Ve-like sequences used in the phylogenetic analysis. All nine genes can be assigned to one of four subclasses. HlVe1-2 and tomato Ve1 correspond to the same class according to their domain structure.

Paradižnikov gen Ve2 ima na C-terminalnem koncu dodani t.i. domeni E in F. Prva predstavlja povezovalno domeno druge, ki vsebuje PEST zaporedje, t.j. signal za vstop v pot razgradnje proteinov. Zaporedji GbVe in Gbve1, ki predstavljata Ve1 homologa bombaža, sta po domenski strukturi enaki Ve2 paradižnika. Dodatni domeni E in F ima tudi CsVe iz hmelju sorodne konoplje, kar je presenetljivo, saj ti domeni v obeh hmeljevih homologih manjkata.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Namen te doktorske disertacije je bil raziskati genetsko ozadje odpornosti hmeljnega kultivarja 'Wye Target' na okužbo s parazitom prevodnega sistema *Verticillium albo-atrum*. V ta namen smo uporabili dve metodi, ki sta v uporabi za iskanje potencialnih odpornostnih genov. Prva je slonela na iskanju RGA v bazah dostopnih transkriptomskih zaporedij, druga pa na natančni analizi kandidatnega gena, ki je homolog genu Ve1 paradižnika. Za slednjega je bila s številnimi raziskavami potrjena vloga v razvoju odpornosti paradižnika na verticilijevo uvelost.

5.1 PRIDOBIVANJE HMELJNIH EST-RGA MO

Dostopne baze oznak izraženega zaporedja so pomemben vir genomskih podatkov za manj pomembne poljščine, saj omogočajo razvoj z izraženimi zaporedji povezanih MO različnih tipov, npr. mikrosatelitov, SNP ali pa polimorfizmov razlik v dolžinah intronov (Jakše in sod., 2011; Wei in sod., 2005; Shang in sod., 2010). Z uporabo algoritmov za poravnavo, kakršen je orodje BLAST, lahko v uporabljeni bazi zaporedij hitro najdemo kandidatne gene, ki jih po pretvorbi v polimorfne MO lahko kartiramo v družini križancev. V tej disertaciji smo identificirali hmeljne EST, katerih zaporedja vsebujejo motive, povezane z rastlinskimi odpornostnimi geni. Te smo pretvorili v MO in ocenili njihovo uporabnost za kartiranje.

Do nedavnega je bilo na voljo le skupno 17 različnih NZ RGA hmelja. Ta so bila pridobljena z NBS profiliranjem, ki temelji na uporabi začetnih oligonukleotidov, konstruiranih na osnovi ohranjenih motivov NBS regije (Kozjak in sod., 2009). Naš izhodiščni cilj je bil povečati število dostopnih RGA. Pridobili smo dokaj nizko število možnih EST-RGA zaporedij iz EST podatkovne baze hmelja, in sicer 35, kar predstavlja 0,4 % od vseh 9.789 zaporedij v podatkovni bazi. Njihova nadaljnja anotacija s programom BLAST je pokazala, da je 17 od teh (skupno 0,2 % celotne baze) domnevno pravih R genov v preostalih 17 primerih (50 %) pa je šlo za drugačne gene, ki so vsebovali katero od za R gene značilnih domen. To opažanje se sklada z drugimi študijami. V študiji Rossi in sod. (2003) so denimo le 0,1 % celotne pregledane baze EST predstavljala potencialna R genska zaporedja. Tovrstnih zaporedij v rastlinskih genomih je 149 pri navadnem repnjakovcu (Meyers in sod., 2003), 533 pri rižu (Zhou in sod., 2004) in okrog 400 pri belem topolu, torej tovrstna zaporedja pri tipičnih rastlinskih vrstah predstavljajo nekaj odstotkov izmed vseh genov v genomu. Očitno nizka opažena zastopanost RGA pri hmelju je lahko tudi posledica nizkega izražanja R genov v tkivih, ki so bila vir EST iz katerih so bili ti izolirani. Tako Nagel in sod. (2008) kot Wang in sod. (2008b) so za vir RNA uporabili tkivo, obogateno za žlezne trihome hmelja, kjer zaradi prevladujoče funkcije (sinteza sekundarnih metabolitov) in nizke izpostavljenosti napadom s strani parazitov izražanje R genov morda ni tako izrazito.

Od skupno 34 hmeljnih EST, uporabljenih za razvoj MO, jih je bilo 30 (88 %) uspešno pomnoženih s PCR. Ta delež je nekoliko višji kot v primeru pomnoževanja intronskih MO z DNA paradižnika, pri katerem je bil uspeh pomnoževanja le 65 % (Wang in sod., 2010a). Li in sod. (2012) so zaznali višjo uspešnost pomnoževanja, in sicer kar 98 %. Je pa ta delež precej višji denimo v primerjavi z uspešnostjo pomnožitve mikrosatelitnih markerjev, kjer

se uspešnost pomnoževanja giblje med 30-50 % (Štajner in sod., 2005, Jakše in sod., 2008a).

Za skupno 24 EST-RGA smo po določitvi NZ prejeli uporabna NZ, izmed katerih je 15 (63 %) kazalo polimorfizme na ravni zaporedja. Li in sod. (2012) za intronske MO kavčukovca poročajo o podobni uspešnosti pridobivanja polimorfizmov (62 %). Tudi v ostalih študijah, ki uporabljajo predvidevanje mej med eksoni in introni, poročajo o podobni frekvenci opaženih polimorfizmov. Wei in sod. (2005) so primerjali dva pristopa, in sicer s predvidevanjem intronov v zaporedjih ter z opustitvijo tega koraka. Navajajo precej povišano incidenco opaženih polimorfizmov dolžin intronov za vrste rodu *Rhododendron* po predvidevanju mej E/I (63 %) v primerjavi s polimorfizmi, opaženimi v skupini MO, ki jim niso bile določene meje E/I (20 %; Wei in sod., 2005).

Navadno se za vrste, za katere genomske podatki niso na voljo, za določanje mej med E/I uporabljajo genomske podatki drugih rastlinskih vrst (Wei in sod., 2005, Liu in sod., 2012., Wang in sod., 2010a), ali pa baze možnih intronskih polimorfizmov (Yang in sod., 2007). V tej študiji smo uporabili celotno bazo dostopnih zaporedij na NCBI brez ozira na izvorno rastlinsko vrsto. Večina najboljših (68 %) prejetih zadetkov BLASTx poravnave je bila dobljena z zaporedji topola, le po en referenčni gen je imel boljšo poravnavo z genom iz repnjakovca in riža (preglednica 11). Vzrok je v dobro podprti filogenetski sorodnosti topola in hmelja, ki oba spadata k rožnicam (Rosidae; Judd in Olmstead, 2004). Dolžine intronov hmelja so povprečju za 24 % večje kot dolžine intronov referenčnih genov. Dva introna, sicer kratka v referenčnih genih, sta bila bistveno daljša v intronih EST-RGA hmelja, in sicer pri HL54 (razmerje 6,71) in HL1273 (razmerje 2,33). V nasprotju z opaženim v našem primeru so Wei in sod. (2005) poročali o bistveno višjih dejanskih dolžinah intronov vrst rodu *Rhododendron* v primerjavi z introni repnjakovca, na podlagi katerih so določali meje E/I. Vzrok je verjetno v že sicer zelo kompaktnem genomu repnjakovca. Wang in sod. (2010a) poročajo o uspešnem predvidevanju lokacije intronov, ne pa ustrezni določitvi dolžine intronov pri paradižniku. Do tega je lahko prišlo zaradi izgube zaporedij, v katerih so bili dejanski introni predolgi za uspešno pomnožitev s *Taq* polimerazo (Wang in sod., 2010a). To je možen vzrok tudi za izpad skupno štirih EST-RGA hmelja (HL1599, HL6437, HL9140, HL9840) v pričujoči študiji. Tak zaključek podpira tudi dejstvo, da v teh štirih primerih nismo zaznali niti uspešne pomnožitve v PCR.

Za skupno 16 od 24 zaporedij smo mesta intronov uspešno predvideli in njihovo prisotnost potrdili z določanjem NZ. Pridobili smo skupno 8 kb eksonov in 5 kb intronskih nukleotidnih zaporedij. V primeru paradižnika (Wang in sod., 2010a) je korak predvidevanja mej E/I imel za posledico kar detekcijo vseh (100 %) predvidenih intronov. V našem primeru je 9 EST-RGA, v katerih smo zaznali introne, kazalo polimorfizme v intronih, v eksonih pa ne. Preostalih 7 zaporedij je kazalo polimorfizme v kodirajočih zaporedjih (eksonih), obenem pa nobeno od teh zaporedij ni vsebovalo niti enega introna. Od skupno 33 eksonskih polimorfizmov je le 1 predstavljal 1 bp dolgo vstavev oz. delecijo, ki povzroči premik bralnega okvirja in s tem verjetno izgubo funkcije gena (slika 7). Skupna gostota polimorfizmov v intronih je bila 0,431 % in v eksonih 0,386 %, kar predstavlja 1,1-krat (za 11,7%) višjo zastopanost polimorfizmov v intronih, kar je bistveno nižje od v podobnih študijah opaženih razmerij. V intronih, ki niso kodogena zaporedja in navadno niso pod selekcijskim pritiskom, je frekvenca mutacij navadno precej večja kot v eksonih. Objavljeno razmerje med frekvencami polimorfizmov v intronih in eksonih je

denimo 3,7 za bombaž (Chee in sod., 2004), 3,4 za kavčukovec (Li in sod., 2012) in 2,4 za paradižnik (Wang in sod., 2010a). Dejstvo pa je, da so RGA geni podvrženi zelo hitremu razvoju (Tamura in Tachida, 2011) in je razmerje frekvenc polimorfizmov med eksoni in introni zaradi tega bolj uravnoteženo.

V študiji smo proizvedli skupno 15 polimorfni EST-RGA MO, izmed katerih so 4 predstavljali zaporedja, udeležena v odpornosti na bolezni. Osem od 15 zaporedij je izkazovalo značilno odstopanje od predvidenega razmerja genotipov ob predpostavki neodvisne segregacije po testu χ^2 . Odstopanja pri segregaciji so pogosta v študijah kartiranja hmelja (Seefelder in sod., 2000b, Čerenak in sod., 2006, Jakše in sod., 2013). Seefelder in sod. (2000b) denimo poročajo, da je v študiji kartiranja hmelja 54 od 224 kartiranih MO kazalo odstopanja od pričakovanega razmerja med genotipi. Razmerja genotipov, ki odstopajo od pričakovanih, so pogost pojav pri kartiranju tudi za ostale rastlinske vrste. MO, ki takšna odstopanja izkazujejo, so navadno vseeno vključeni v kartiranje, saj odstopanje ne vpliva na razvrstitev na karti (Mbanjo in sod., 2011).

Novi EST-RGA hmelja so brez izjeme MO tipa SNP. Kartirali so se na 7 od skupno 9 skupin povezanosti (slika 28). Skupaj s kartiranim MO Ve2M smo uspeli podaljšati skupno dolžino karte hmelja za 9,1 %, pri čemer je gostota MO na karti padla za 3,2 %.

Navkljub nizkemu številu najdenih R genskih zaporedij smo našli nekaj zanimivih zaporedij. Med temi je prednjačilo Ve1-podobno zaporedje (HL6293), ki se je kasneje izkazalo za del s postopkom TAIL-PCR izoliranega gena HLVe1-1.

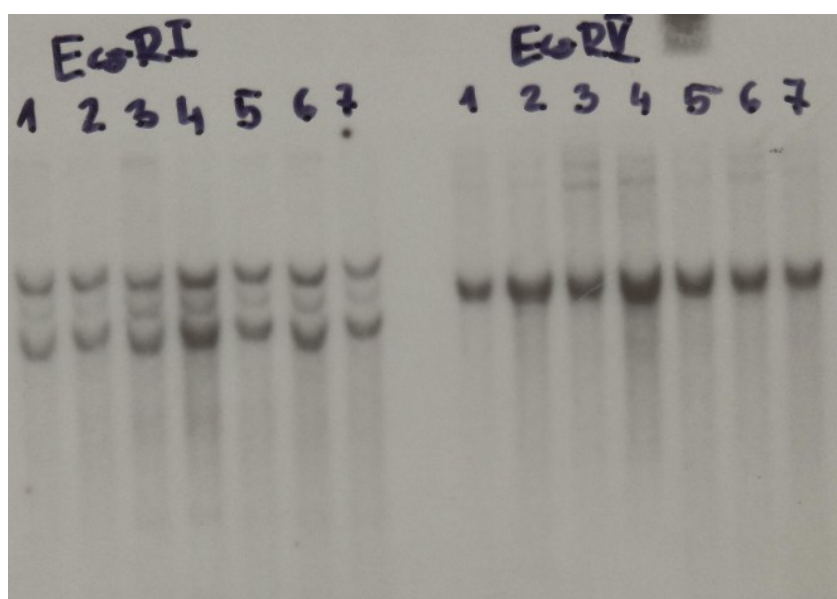
V tej študiji smo proizvedli 15 polimorfni MO, od katerih 4 predstavljajo domnevna zaporedja, vpletena v obrambni odziv rastline. Kartirali smo še en dejavnik prepisovanja tipa WRKY in 10 zaporedij, ki so vsebovala LRR domeno, a niso bila povezana z obrambnim odzivom.

Od vseh 24 EST-RGA zaporedij, ki smo jim določili NZ, je primerov z R geni povezanih beljakovin le skupno 10. Med temi smo našli tudi že omenjeno Ve1-podobno zaporedje, ki se je kasneje izkazalo za del s postopkom TAIL-PCR izoliranega gena HLVe1-1. Zraven tega smo detektirali tri s somatsko embriogenezo povezane kinaze (SERK), in z BRI-1 povezano kinazo (BAK), za katere je znana interakcija z genom Ve1 (Fradin in sod., 2009). Pridobili smo tudi nukleotidna zaporedja treh R genov tipa TNL. Za večino EST-RGA z ustrezno funkcijo smo torej potrdili povezavo s s PAMP pogojenim obrambnim odzivom (PTI) rastlin.

Uporabljena študija na osnovi iskanja domen, značilnih za R gene, je predstavljala dovolj zmogljivo metodo za pridobitev z R geni povezanih zaporedij iz javno dostopnih baz podatkov. Možna bi bila tudi uporaba zaporedij znanih R genov iz drugih rastlin in njihova poravnava s hmeljnimi EST zaporedji z orodjem BLAST (Dilbirligi in Gill, 2003). Z dostopnostjo nove množice EST zaporedij po zadnjem transkriptomskem projektu za hmelj (Clark in sod., 2013) bo možno z uvedeno metodo pridobiti še dodatne EST-RGA.

5.2 IZOLACIJA VE1 HOMOLOGOV PRI HMELJU

V nalogi smo zasnovali poskus, s katerim smo želeli pridobiti celotno kodirajoče zaporedje iz hmelja, ki je podobno Ve1 genu. Ta je pri paradižniku odgovoren za odpornost na verticilijevo uvelost. Predhodno znanje, ki nam je bilo na voljo in nam je služilo za zasnovu poskusa, lahko strnemo v tri trditve: 1) najbolj na hmeljevo uvelost odporen kultivar 'Wye Target' predvidoma nosi vsaj dva dominantna lokusa (Darby, 2001), ki sta vpletena v uspešen obrambni odziv na hmeljne izolate, vključno z letalnimi izolati PG2 (Radišek in sod., 2006), 2) na voljo smo imeli kratko EST zaporedje, ki je kazalo na aminokislinskem nivoju visoko raven podobnosti s paradižnikovim Ve1 in 3) predhodna Southern analiza je pokazala, da v genomu hmelja obstaja paradižnikovemu Ve1 genu podobno zaporedje (slika 35).



Slika 35 : Analiza po Southernu na sedmih vzorcih hmelja, razgrajenimi z restrikcijskima encimoma *EcoRI* oz *EcoRV*. Uporabljena radioaktivno označena sonda je bila pripravljena na podlagi dela paradižnikovega gena Ve1.

Figure 35: Southern analysis of seven samples each of *EcoRI*- or *EcoRV*-digested hop DNA. The radioactively labelled probe used in the analysis was prepared based on a stretch of tomato Ve1 sequence.

Za ta namen smo prilagodili postopek TAIL-PCR (Liu in sod., 1995), da smo lahko pridobili čim večjo raznolikost v zaporedjih. Med postopkom TAIL-PCR smo v 51 od 66 (77 %) kombinacij specifičnih in arbitrarnih ZO zaznali vsaj en pomnožen fragment.

V skupno 22 primerih smo namnožili več kot en fragment. TAIL-PCR deluje na podlagi specifičnega prileganja ZO na matrično DNA, s čimer lahko pomnožimo specifično zaporedje, če pride med PCR reakcijo prileganja specifičnega ZO in arbitrarnega ZO tako blizu na matrični DNA, da dobimo uspešno pomnožitev fragmenta z v TAIL-PCR uporabljeno DNA polimerazo. Če sta na robovih potencialnega amplicona dva SZO ali dva AD, pridobimo enega od tipov nespecifičnih fragmentov (Liu in sod., 1995), s čimer lahko pojasnimo večje število pridobljenih fragmentov. Skupno smo pridobili 76 fragmentov. Za 13 fragmentov po neposrednem pridobivanju NZ iz produkta PCR reakcije (brez izrezovanja fragmentov iz gela) nismo pridobili NZ. Možno je, da je v tem primeru šlo za

nespecifične produkte, na katere se specifični ZO za pridobivanje NZ niso vezali, kar ima za posledico izpad sekvenčne reakcije, ki jo izvedemo s specifičnim ZO zadnjega (tretjega oz. terciarnega) koraka TAIL-PCR.

Zanimivo pa je, da smo kar v 7 primerih iz dveh fragmentov iste TAIL-PCR reakcije pridobili Ve1-podobno zaporedje (slika 10). Navadno smo iz iste reakcije po določitvi NZ izrezanih fragmentov pridobili identično zaporedje, torej podvojitev fragmentov ni posledica pomnoževanja iz dveh različnih lokusov, temveč posledica podobnosti posameznih LRR motivov v zaporedjih tarčnih genov. Ti predstavljajo RLP, za katerega je značilna dolga ekstracelularna LRR domena, zato je možno, da smo iz istega gena pridobili dve pomnoženi zaoredji različne dolžine. Ocenjene dolžine fragmentov so se gibale med 4 kbp in 148 bp. Ponovljivost pridobivanja posameznih fragmentov je bila dokaj slaba; v vseh treh ponovitvah smo pridobili le 24 (32 %) vseh fragmentov, 17 pa smo jih pridobili v dveh od treh ponovitev. Pomnožitev torej ni robusten postopek. Slabšo ponovljivost lahko razložimo z uporabo arbitrarnih začetnih oligonukleotidov. Arbitrarne ZO denimo uporabljamo tudi v pomnoževanju MO tipa RAPD, za katere je značilna nizka ponovljivost pomnožitve fragmentov iz enake matrične DNA med različnimi laboratoriji, pa tudi že med posameznimi ponovitvami ob istih pogojih pomnoževanja (Patzak, 2001).

Iz izhodiščno 76 pomnoženih fragmentov smo za 39 (51,3 %) pridobili NZ, podobna Ve1. Pridobljene soseske iz klonov, dobljenih na podlagi posameznih fragmentov, smo združili v nadsoseske. Pridobili smo dve večji nadsoseski, ki sta po pridobitvi vseh potrebnih NZ s TAIL-PCR vsebovali celotni kodirajoči regiji dveh različnih Ve1-podobnih zaporedij, ki smo ju poimenovali HLVe1-1 in HLVe1-2. Zraven tega smo dobili še dva odseka obstranskih regij, ki predstavljata promotorno regijo, ki je v nadsoseske nismo uspeli dodati zaradi prekinitve v pridobljenem NZ. Pridobili smo še štiri soseske, ki se pri 95 % ujemanja niso pridružile kateri od obeh nadsosesk. Za te štiri soseske smo ob poravnavi opazili veliko mero podobnosti bodisi s HLVe1-1 (VS1a in VS1b, Vs2) oz. s HLVe1-2 (VS3 in VS4), ki so se še medsebojno prekrivala v poravnavi, v kateri so bile vidne razlike. Skupno smo s TAIL-PCR in nadaljnjimi postopki združevanja NZ torej pridobili dve celotni kodirajoči regiji Ve1 podobnih genov vključno s kratkimi obstranskimi zaporedji v 5' in 3' smeri in štiri tema dvema kodirajočima regijama podobna delna zaporedja. Možno je, da gre vsaj pri 'Wye Target' v primeru teh Ve1-podobnih zaporedij za znatno namnoženo gensko družino. Družina hmeljnih Ve1 homologov očitno vsebuje večje število članov. To je v podobno kot ob izolaciji Ve1 homologov mete (mVe1) (Vining in Davis, 2009), ki je bila tudi izvedena s TAIL-PCR. Po kloniranju in določitvi NZ alelov so bile prije bilo iz akcesije vrste *Mentha longifolia* denimo izoliranih skupno 7 variant mVe1, ki pa kažejo precej manjšo variabilnost kot hmeljna HLVe1-1 in HLVe1-2 iz 'Wye Target'.

Obe v celoti pridobljeni nukleotidni zaporedji smo prevedli v aminokislinsko zaporedje in izvedli poravnavo obeh pridobljenih AZ. V poravnavi je bilo 72 % AKO identičnih. V zaporedju HLVe1-1 smo zaznali 24 bp dolgo vrzel. S poravnavo prevedenega AZ na NZ smo tudi določili kodirajoča zaporedja obeh Ve1- podobnih zaporedij.

Za HLVe1-1 smo pridobili 202 bp, za HLVe1-2 pa 490 bp zaporedja promotorja. Promotorne regije smo analizirali s spletnim programom PlantCare, ki so ga za analizo medgenske regije Ve1 in Ve2 uporabili tudi Fradin in sod. (2009). V obeh promotorjih smo zaznali motiv W box, ki naj bi bil vpleten v odziv na glivne efektorje (Yamamoto in sod.,

2004; Lippok in sod., 2007). Ta je v medgenski regiji Ve lokusa paradižnika lociran okrog 110 bp pred kodirajočim zaporedjem Ve2, pri Ve1 pa je odsoten. V promotorju Ve1 smo zaznali še box 4 motiv in GA-motiv, ki sta vpletena v odziv na svetlobo, in TCA element, ki je vpleten v odziv na salicilno kislino. Slednji je v medgenski regiji Ve lokusa zastopan petkrat. TCA element je ojačevalec (ang. enhancer), na katerega se veže beljakovina TCA, katere izražanje je odvisno od koncentracije salicilne kisline v tkivu (Goldsbrough in sod., 1993). Salicilna kislina se pospešeno proizvaja in kopiči v tkivu (in organizmu) v pogojih stresa, tudi biotskega. Za izražanje R genov ni potrebna, a je pomembna za lokalni prenos signala in posledično mobilizacijo R genov pri mestu okužbe, in seveda za izražanje sistemske pridobljene odpornosti (SAR) na ravni organizma (Agrios, 2005). V preostanku kratkega pridobljenega zaporedja promotorja smo zaznali s TC ponovitvami bogat motiv, ki predstavlja zelo razširjen motiv v rastlinskih promotorjih in predstavlja mesto vezave RNA polimeraze (Bernard in sod., 2010).

Za HLVe1-1 in HLVe1-2 smo pripravili ZO za posamično pomnožitev s PCR. ZO smo zasnovali za prileganje v vrzelih ali pa zelo variabilnih delih NZ v poravnavi posameznih Ve1-podobnih variant. Na ta način smo želeli doseči selektivno pomnoževanje genov. Za optimalno temperaturo prileganja smo določili 62 °C. Obe zaporedji smo uspešno pomnožili v celoti, in sicer z encimom DNA polimerazo Phusion®, ki je namenjena pomnožitvi dolgih amplikonov z nizko stopnjo med postopkom PCR vnešenih mutacij. Ta encim tvori na 3' in 5' koncu tope konce, zato je bilo za predvideno kloniranje v AT vektorski sistem potrebno fragmentom na 3' konce obeh verig dodati štrleče adenozine. Edini vsaj v enem primeru uspešen postopek dodajanja adeninov je bil z uporabo navadne *Taq* polimeraze na očiščenem in razredčenem izhodiščnem PCR produktu (dobljenem z encimom Phusion®), s katero smo izvedli 10 ciklov PCR. S tem smo v nastale produkte nenamerno vnesli tudi določeno število s *Taq* polimerazno vnešenih mutacij, saj *Taq* povzroča do 50-krat več mutacij kot polimeraza Phusion® (New England Biolabs, 2014). Po kloniranju smo pridobili 18 klonov HLVe1-2 in le 1 klon HLVe1-1, nato pa smo na podlagi preostalih pridobljenih zaporedij za HLVe1-2 lahko določili NZ hipotetičnega drugega alela. Po postopkih popravljanja določenih klonov smo uspešno klonirali vse tri pomnožene alelne oblike HLVe1-2 in eno alelno obliko HLVe1-1.

Tako za HLVe1-1 kot za HLVe1-2 ena od alelnih oblik predstavlja psevdogen. V obeh je zaradi premika bralnega okvirja odsotna celotna transmembranska domena, torej ti alelni obliki predvidoma nista funkcionalni. Takšna zaporedja lahko mutirajo brez omejitev, zato ne preseneča visoko opaženo število SNP med prevdogenskimi in funkcionalnimi alelnimi oblikami istih Ve1-podobnih lokusov (slika 22).

Za boljšo ponazoritev funkcionalnih domen predvidoma funkcionalnih alelov vsakega od obeh genov smo zaporedja le-teh anotirali s poravnavo z Ve1 zaporedjem paradižnika, za katerega so že Kawchuk in sod. (2001) določili razpone funkcionalnih domen, bolj natančno pa jih je določil Zhang (2013). Za oba predvidoma funkcionalna HLVe1-2 alela smo dobili skoraj popolno poravnavo. Sklenili smo, da so v zaporedju prisotne vse funkcionalne domene Ve1, pa tudi v LRR regiji smo za oba gena določili enako število ponovitev. Pri HLVe1-1 smo v poravnavi zaznali vrzel, ki sovpada z LRR14 pri Ve1 oz. HLVe1-2. Zgolj ta LRR ponovitev je torej v HLVe1-1 odsotna (slika 23).

Dokončno smo pregledali še NZ preostalih Ve1-podobnih zaporedij hmelja, t.j. sosesk Vs1, Vs2, Vs3 in Vs4 ter EST-RGA HL6293 (preglednica 16). Za VS2 in HL6293 smo zaznali prileganje na alelni obliko HLVe1-1A do te mere, da verjetno predstavljata njen del. Preostala tri zaporedja imajo v NZ večje število polimorfizmov ter vrzeli, torej gre za psevdogenska zaporedja. Skupno smo torej v genomu 'Wye Target' odkrili tri funkcionalna Ve1-podobna zaporedja (HLVe1-1A, HLVe1-2A, HLVe1-2B) in pet psevdogenskih zaporedij (HLVe1-1B, HLVe1-2T, VS1a, VS3, VS4). Možno je, da gre za gensko družino, značilno za beljakovine tipa RLP, ki jim ta zaporedja pripadajo. NLR geni so navadno v genomih razporejeni v gručah. Pri repnjakovcu jih okrog 70 % pripada 43 gručam (Meyers in sod., 2003), pri topolu pa enak delež pripada 37 gručam (Kohler in sod., 2008). Pri rižu vsi od 480 NLR genov pripadajo skupno 44 gručam. Glede na primere in na proces podvajanja R genov je možno, da gre pri hmelju za podobno razporeditev

5.3 KARAKTERIZACIJA HLVE1-1 IN HLVE1-2

Na podlagi kloniranih alelnih oblik obeh hmeljnih Ve1-podobnih zaporedij smo ciljano pripravili molekulske označevalce na podlagi regij z visoko mero variabilnosti med obema genom oz. med alelnimi oblikami istega gena. Oba MO smo uspešno pomnožili in za pomnožen fragment pridobili NZ. MO za HLVe1-1 (HLVe1-1M) je pri vseh potomcih kazal enako segregacijo, ki je kazala na prisotnost obeh materinih in očetovega alela. Po kloniranju HLVe1-1M smo ugotovili, da so v potomcih vsi trije aleli prisotni, s čimer smo pokazali, da gre verjetno za podvojen gen. Gen s takšnimi značilnostmi dedovanja ne more pojasniti opažene segregacije odpornosti na hmeljevo uvelost v potomstvu križanja, ki kaže na izrazito variabilnost v stopnji odpornosti različnih potomcev, saj vsi potomci posedujejo obe alelni obliki HLVe1-1 matere – ta je tudi vir odpornosti – in imajo na tem lokusu posledično isti genotip.

Iz zasnove MO HLVe1-2M smo izključili predvidoma psevdogeni alel HLVe1-2T, za katerega je značilen zgodnji stop kodon. Privzeli smo, da sta zaporedji HLVe1-2A in HLVe1-2B alela istega lokusa. Tudi njuna segregacija kaže na to, saj smo pri HLVe1-2 v potomstvu križanja zaznali pričakovano mendelsko segregacijo. Mati 'Wye Target' je bila heterozigot HLVe1-2A/HLVe1-2B, medtem ko je bil oče BL2/1 homozigot za polimorfizem v NZ amplicona HLVe1-2M, značilen sicer za HLVe1-2B. Skupno 78 potomcev je dedovalo alel HLVe1-2A, 59 potomcev pa HLVe1-2B. Povprečna odpornost prvih je bila $1,27 \pm 1,58$ (povprečje $\pm$ s.o.), pri drugih pa $2,53 \pm 1,79$. Z analizo variance smo med obema vzorcema zaznali statistično značilno razliko ($p < 0,05$). Potomci, ki so od matere pridobili alel HLVe1-2A, značilno bolj odporni kot tisti, ki so pridobili HLVe1-2B. Pri odpornih potomcih je bilo tudi bistveno večje število takšnih z alelom HLVe1-2A (slika 27). To kaže na možnost povezanosti HLVe1-2 oz. povezavo genske regije, ki ji ta gen pripada, z odpornostjo na hmeljevo uvelost.

HLVe1-2M smo skupaj z EST-RGA geni kartirali na okvirno karto povezanosti družine 'Wye Target' X BL2/1. MO ni kazal nenormalne segregacije. Uspešno smo ga kartirali na skupino povezanosti LG1, in sicer na skrajni konec skupine v 5 cM oddaljenosti od najbližjega vezanega MO (slika 28). Ta skupina povezanosti sovпада z materino skupino povezanosti 'Wye-3' karte povezanosti za isto družino, pripravljeno na osnovi večjega števila RAPD, AFLP in mikrosatelitnih MO (Jakše in sod., 2013). Na to skupino

povezanosti je vezan QTL za odpornost na hmeljevo uvelost, imenovan *vh*, ki pojasni približno 25 % variabilnosti za to lastnost pri potomcih križanja. QTL *vh* je lociran blizu MO imenovanega EMHL052, ki je na v tem delu pripravljeni okvirni karti križanja od HLVe1-2M oddaljen 17,5 cM, QTL pa je lociran na strani bliže HLVe1-2A. Gre torej za očitno genetsko povezanost med *vh* in genom HLVe1-2. Za oceno vezave med HLVe1-2 in QTL *vh*, je potreben nov projekt kartiranja karte povezanosti za družino križanja 'Wye Target' x BL2/1. Pri solati so Hayes in sod. (2011b) prišli do podobnih zaključkov. V skupini povezanosti 9 na verticilij odpornega kultivarja solate 'La Brillante' so odkrili en QTL za odpornost na verticilijevo uvelost, ki po ocenah pojasni 49-68 % fenotipske variabilnosti potomcev. Tudi oni so iz EST dela Ve1 homologa razvili MO, ki so ga uspešno kartirali v neposredno bližino QTL.

5.4 FILOGENETSKA ANALIZA HLVE1-1 IN HLVE1-2

'Wye Target' je potomec hmeljne žlahtniteljske linije, imenovane 'AA 7', ki predstavlja ameriški divji hmelj podvrste *H. lupulus* var. *neomexicanus* (Darby, 2001). S filogenetsko analizo celotnih kodirajočih regij obeh hmeljnih Ve1 homologov smo preverili, če kateri od zaznanih alelov izhaja iz akcesij z ameriško dednino. Hmeljne akcesije smo izbrali na podlagi predhodnega večjega poskusa, v katerem smo okarakterizirali 144 akcesij divjih hmeljev in kultivarjev. Določili smo tudi mero selekcijskega pritiska na posamezna nukleotidna zaporedja v populaciji, imenovano π_a/π_s , ki predstavlja normalizirano razmerje med nesinonimnimi in sinonimnimi mutacijami. Napravili smo tudi poravnavo Ve1-podobnih zaporedij hmelja z Ve1-podobnimi zaporedji drugih rastlinskih vrst.

Na podlagi v celoti pomnoženih kodirajočih zaporedij HLVe1-1 ter HLVe1-2 smo posamič pripravili poravnave iz hmeljnih akcesij pomnoženih NZ. Zaradi polimorfizmov med različnimi aleli znotraj akcesije smo iz analize izvzeli NZ akcesij za HLVe1-1 in dve zaporedji akcesij za HLVe1-2. Na podlagi poravnave smo določili zaporedja, ki predstavljajo psevdogene, in jih izločili iz nadaljnje analize, ker ne predstavljajo zaporedij pod vplivom selekcije. V filogenetsko analizo NZ Ve1-podobnih zaporedij hmelja smo vključili tudi psevdogenska zaporedja.

Na podlagi poravnave NZ Ve1 homologov različnih akcesij hmelja smo izračunali razmerje π_a/π_s . Za sedem preostalih poravnanih funkcionalnih oblik HLVe1-1 gena smo določili razmerje 0,91. To razmerje je blizu 1, kar pomeni, da je gen pod vplivom nevtralne selekcije. Za 6 preostalih HLVe1-2 zaporedij akcesij je bila π_a/π_s vrednost 2,02, kar kaže na močan selekcijski pritisk v smeri spreminjanja zaporedij, kar ima za posledico povečano število nesinonimnih mutacij v primerjavi s sinonimnimi.

Na filogenetskem drevesu Ve1-podobnih zaporedij hmelja smo opazili pričakovano združevanje glede na izvor za obe skupini, v kateri so se združila zaporedja (slika 32). V primeru HLVe1-1 nobeno od obeh NZ iz kultivarja 'Wye Target' ni tvorilo skupine s katero od skupin, združujočih ameriške oz evropske akcesije hmelja. Izvor zaporedja kljub analizi torej ostaja neznan in ga ne moremo geografsko opredeliti. Za HLVe1-2 smo tudi opazili ustrezno ločevanje akcesij po geografskem poreklu. Vse tri alelne oblike HLVe1-2 so pripadle skupini z ameriško dednino. Alel HLVe1-2A, ki smo ga v analizi genotipov MO HLVe1-2M povezali s povišano odpornostjo na hmeljevo uvelost potomcev kultivarja

'Wye Target', je največ podobnosti kazal z ameriškim hmeljnim kultivarjem 'Comet' v skupini s sestrsko skupino, v kateri so združene tri akcesije podvrste *H. lupulus* var. *neomexicanus*. Določili smo torej pričakovan geografski izvor te alelne oblike – t.j. izšla je iz ameriške dednine, kar je zraven očitnega vpliva pozitivne selekcije na evolucijo zaporedja dodaten pokazatelj, da gre v primeru HLVe1-2 za dober kandidatni gen za odpornost na hmeljevo uvelost.

V filogenetski analizi Ve1-podobnih AZ različnih rastlinskih vrst smo določili drevo ki odraža pričakovane sorodstvene odnose izvornih vrst Ve1-podobnih zaporedij, razen v primeru združevanja zaporedij iz bombaža in vinske trte (slika 33). Nenavadno je bilo tudi združevanje prevedenega AZ konoplje (CsVe) s prevedenimi AZ obeh alelov HLVe1-1. Pričakovali smo namreč, da bo CsVe sestrška skupina skupini, vsebujoči vsa izolirana hmeljna Ve1-podobna zaporedja. Preostala zaporedja so tvorila pričakovane taksone. Zaporedje CsVe je tudi po domenski strukturi nenavadno, saj podobno kot zaporedji iz bombaža vsebuje N-terminalne domene Ve2 gena. Vsa preostala Ve1-podobna AZ imajo na C-terminalnem koncu za HLVe1-1 značilne domene. Za gena HLVe1-1 in MpVe1 mete je značilna delecija istega LRR motiva (LRR14), zraven tega pa manjka še povezovalna domena (IS, otoček; Zhang, 2013) med LRR motivoma LRR31 in LRR32. Za metin gen mVe1 tudi niso potrdili asociacije z odpornostjo (Vining in Davis, 2009).

HLVe1-2 predstavlja torej dober kandidatni gen za RLP, ki prepozna okužbo s povzročiteljem hmeljeve uvelosti. Gen je podoben Ve1 genu paradižnika, povezan s QTL za odpornost na hmeljevo uvelost. Po izvoru ustreza zaporedjem z dednino iz iste geografske regije kot žlahtniteljska linija, iz katere naj bi bila vanj požlahtnjena odpornost na hmeljevo uvelost. Nanj tudi deluje pozitivna selekcija, kar kaže na delujoč beljakovinski produkt gena, namenjen specifični prepoznavi determinant okužbe z glivo. Nasprotno pa za HLVe1-1 nič od naštetega ne drži. Gre za gen z neznano funkcijo, podvržen nevtralni selekciji, z izvorom iz neznane dednine.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Glive rodu *Verticillium* so talni patogeni, ki vstopajo v prevodni sistem rastlin in povzročajo verticilijevo uvelost. Ta bolezen povzroča znatno ekonomsko škodo za širok spekter poljščin, med temi tudi hmelj (*Humulus lupulus*), pri katerem okužbo z verticilijem imenujemo hmeljeva uvelost. V Slovenskih hmeljiščih je bila leta 1997 opažena huda oblika obolelosti, ki je zelo agresivna in povzroči propad okužene rastline v eni sami rastni sezoni. Učinkovitih fitofarmaceutskih sredstev proti povzročitelju te bolezni ni, v primeru izbruha bolezni v nasadih se izvedejo strogi fitosanitarni ukrepi, ki jim sledi dolga premena z negostiteljskimi poljščinami. Edini dolgoročno učinkovit ukrep proti bolezni predstavlja sajenje odpornih kultivarjev.

Žlahtnjenje novih kultivarjev pri hmelju je zahteven in dolgotrajen postopek. Doseganje žlahtniteljskih ciljev lahko pospeši in poceni vpeljava postopkov selekcije ob pomoči molekulskih označevalcev (MAS). Glavna cilja naloge sta bila 1) priprava molekulskih označevalcev (MO), uporabnih za selekcijo ob pomoči križanja za namene žlahtnjenja za odpornost in 2) kloniranje genov za odpornost na hmeljevo uvelost iz na hmeljevo uvelost najbolj odpornega znanega kultivarja hmelja, imenovanega 'Wye Target'. Ta je odporen tudi na letalne patotipe *V. albo-atrum*, ki povzročajo omenjeno hudo obliko hmeljeve uvelosti.

Izhodiščno smo želeli odkriti nova genska zaporedja, povezana z odpornostjo na bolezen. S pregledom baz oznak izraženih zaporedij (EST) hmelja smo pridobili set analogov R genov (RGA), iz katerega smo pripravili 24 t. i. EST-RGA MO. Petnajst hmeljnih EST-RGA MO smo izvrednotili v populaciji 144 potomcev križanja 'Wye Target' in na uvelost občutljive moške žlahtniteljske linije BL2/1, pri katerih odpornost na hmeljevo uvelost segregira kot kvantitativna lastnost. Štirinajst EST-RGA MO smo uspešno kartirali na karto povezanosti te družine. Verjetnost uspešne pomnožitve in posledično zaznave polimorfizmov smo povečali z določanjem mej med eksoni in introni ob zasnovi začetnih oligonukleotidov za posamezne EST-RGA. Zraven 8 kb eksonskih nukleotidnih zaporedij (NZ) smo prejeli še 5 kb intronskih NZ in izvedli začetno karakterizacijo le-teh, ki predstavlja prvi vpogled v lastnosti razporeditve hmeljevih intronov, hkrati pa predstavlja validacijo uporabljenega postopka za pridobivanje MO. Opazili smo denimo, da sta povprečni frekvenci opaženih polimorfizmov v celotni dolžini pridobljenih NZ intronov (0,431 %) in eksonov (0,386 %) skoraj enaki, čeprav je v primerih, opisanih za druge rastlinske vrste, frekvenca 2 do 3-krat večja v prid polimorfizmov v intronih.

Pri hmelju smo tudi želeli tudi ciljano izolirati gen, ki kultivarju 'Wye Target' podaja značilno močno odpornost na hmeljevo uvelost. Odpornost na hmeljevo uvelost je najbolj okarakterizirana pri paradižniku, kjer jo podaja en dominanten lokus, imenovan Ve. V tem lokusu sta dva paraloga gena, ki kodirata receptorju podobni beljakovini (RLP), imenovani Ve1 in Ve2. Le Ve1 je vpleten v pojav odpornosti, Ve2 pa naj bi bil neaktiven gen. Pri različnih rastlinskih vrstah so znani homologe Ve1 gena, ki so najbolj okarakterizirani pri bombažu, meti in solati. Pri prvih dveh je odpornost verjetno kvantitativne narave in ima

homolog Ve1 v njenem razvoju manjšo vlogo oz. ni pomemben, pri solati pa je možno, da homolog Ve1 podobno kot pri paradižniku podaja odpornost na verticilijevo uvelost. Genetsko ozadje odpornosti na verticilijevo uvelost je bilo dobro okarakterizirano še pri križnicah, kjer pa ni bil najden niti en homolog Ve1, torej se odpornost razvije z drugimi genetskimi mehanizmi.

Pri hmelju smo predhodno zaznali EST, ki predstavlja del homologa Ve1 gena paradižnika, s postopkom hibridizacije po Southernu pa je bila prisotnost homologa potrjena. V tej nalogi smo s postopkom TAIL-PCR, ki omogoča pridobivanje NZ bočnih regij znanih zaporedij, iz genomske DNA kultivarja 'Wye Target' pridobili preostanek NZ kodirajočih zaporedij tega gena. Po združevanju prejetih NZ smo pridobili skupni NZ dveh edinstvenih hmeljnih homologov gena Ve1, ki smo ju poimenovali HLVe1-1 in HLVe1-2.

Pripravili smo začetne oligonukleotide za ločeno pomnoževanje obeh genov. Po uspešni pomnožitvi obeh homologov smo za kultivar 'Wye Target' pridobili NZ celotnih kodirajočih regij za oba gena. HLVe1-1 je dolg 3111 bp, HLVe1-2 pa 3020 bp, kar se sklada z dolžino Ve1 paradižnika. Oba gena sta brez intronov. Pridobili smo tudi 86 bp promotorja HLVe1-1 in 490 bp promotorja HLVe1-2 in v njih odkrili motive, povezane z vezavo faktorjev prepisa, ki sodelujejo v pojavu odpornosti rastlin na biotski stres, med katerimi prednjačita motiv W-box, ki je povezan z zaznavo glivnih elicitorjev, in TCA element, ki sodeluje v signalizaciji s salicilno kislino. Slednja je pomemben signal tudi v pojavu sistemskega odpornega odziva rastlin.

Pomnožene kodirajoče regije HLVe1-1 in HLVe1-2 smo poskusili klonirati. Za HLVe1-1 smo pridobili le en klon, katerega NZ smo poimenovali HLVe1-1A, iz vseh v nalogi prejetih NZ za HLVe1-1 pa smo uspeli določiti še NZ predvidene druge alelne oblike (HLVe1-1B). Poskus kloniranja HLVe1-2 pa je bil uspešen. Pridobili smo klone in NZ le-teh za skupno tri alelne oblike tega gena, ki smo jih poimenovali HLVe1-2A, HLVe1-2B in HLVe1-2T.

Na podlagi opaženih polimorfizmov v NZ alelnih oblik HLVe1-1 in HLVe1-2 smo pripravili MO tipa SNP za vsakega od lokusov. Za HLVe1-1 smo opazili, da za zanj pripravljen MO (HLVe1-1M) vsi potomci križanja prejmejo obe obliki polimorfizma matere, torej obe alelni obliki gena. Predvideli smo, da gre pri 'Wye Target' za podvojen gen, kar smo potrdili s kloniranjem amplikonov HLVe1-1M. Po določanju NZ tega amplikona smo potrdili prisotnost obeh variant matere in značilne variante očeta pri potomcih. S pregledom polimorfizmov celotne NZ 'Wye Target' pa smo ugotovili, da pri tem kultivarju obstajata le dve alelni obliki. HLVe1-1 torej zaradi načina dedovanja ne more podajati odpornosti na hmeljevo uvelost, saj vsi potomci, ki sicer izkazujejo izrazite razlike v odpornosti, od odporne matere prejmejo enaki alelni obliki.

Za HLVe1-2 smo opazili običajno mendelsko segregacijo dveh funkcionalnih alelnih oblik (HLVe1-2A in HLVe1-2B) pri potomstvu križanja. Pri potomcih z različnimi genotipi smo opazili značilne razlike ($p \ll 0,05$) v odpornosti na hmeljevo uvelost; prejemniki alela HLVe1-2A so bili v povprečju bolj odporni kot prejemniki alela HLVe1-2B. MO smo tudi kartirali na karto povezanosti in ugotovili, da je verjetno vezan z lokusom kvantitativne lastnosti *v/h*, ki pojasni okrog 25 % variabilnosti v pojavu odpornosti na hmeljevo uvelost pri potomcih križanja.

Za HLVe1-1 in HLVe1-2 smo pridobili NZ iz nabora svetovnih kultivarjev in divjih hmeljev. Na podlagi poravnave teh NZ smo izrisali filogenetsko drevo vseh 11 izoliranih NZ za HLVe1-1 in vseh 12 izoliranih NZ za HLVe1-2, všteti 2 oz. 3 alele iz 'Wye Target'. Zaporedja obeh genov sta se na drevesu ostro ločila v samostojni skupini. Pokazali smo, da je bil lokus HLVe1-2 v 'Wye Target' tekom žlahtnjenja vnešen iz ameriške dednine, kar se sklada z rodovnikom. Analize zaporedij iz različnih hmeljnih akcesij so pa pokazale, da na zaporedje HLVe1-2 deluje pozitivna selekcija ($\pi_a/\pi_s = 2,02$). Po drugi strani pa je HLVe1-1, ki predvidoma ni vpleten v razvoj odpornosti, predvidoma pod vplivom nevtralne selekcije ($\pi_a/\pi_s = 0,91$). Na podlagi poravnave AZ doslej izoliranih homologov Ve1 pri različnih vrstah smo pripravili filogenetsko drevo, ki je kazalo ustrezne sorodstvene odnose. Anotacija domen paradižnikovega Ve1 s poravnavo na posamezne hmeljeve in ostale homologe je pokazala izjemno ohranjenost domen, vključno s posameznimi ponovitvami LRR motivov. Za HLVe1-2 in Ve1 smo pokazali, da imata popolnoma enako domensko strukturo.

Vseh 15 v nalogi izvrednotenih MO, razvitih na podlagi zaporedij domnevnih R genov, smo dodali na okvirno karto križanja 'Wye Target' x BL2/1. Skupna dolžina vseh skupin povezanosti karte se je povečala za 9,1 %, povprečna gostota MO na karti pa je padla za 3,2 %. Vsaj en nov MO je bil dodan na 7 od skupno 9 skupin povezanosti okvirne karte.

V nalogi smo uspešno izolirali, klonirali in okarakterizirali hmeljne homologe gena Ve1. Izvedene analize segregacije ter analize lastnosti promotorjev in domen HLVe1-1 in HLVe1-2 predstavljajo dober pokazatelj, da gen HLVe1-2 podaja vsaj del odpornosti na hmeljevo uvelost kultivarju 'Wye Target'. Tekom raziskave proizveden MO HLVe1-2M predstavlja že zaradi same vezave s QTL za odpornost na hmeljevo uvelost uporaben MO za MAS v smeri odpornosti nove generacije kultivarjev hmelja. Skupno 24 proizvedenih EST-RGA MO, od katerih smo jih 14 kartirali, pa predstavlja uporabne MO za kartiranje RGA na druge karte povezanosti hmelja, in nenazadnje tudi potencialne kandidate za uporabo v MAS za žlahtnjenje na odpornost. Tekom dela smo, nenazadnje, tudi uspešno klonirali tri alele HLVe1-2 in en alel HLVe1-1, ki jih lahko uporabimo za analizo funkcije teh genov v modelnih sistemih. Kolegi iz nizozemskega laboratorija so opravili študijo koekspresije treh alelov HLVe1-2 z 'Wye Target' in glivnega efektorja Ave1, ki ga prepozna paradižnikov Ve1, v rastlini tobaka. Za HLVe1-2A, ki je bil v nalogi prepoznan za predvidoma dominanten alel HLVe1-2, se je izkazalo, da prepozna Ave1, kar je še dodaten pokazatelj, da je ta gen povezan z odpornostjo hmelja na hmeljevo uvelost.

6.2 SUMMARY

Fungi of the genus *Verticillium* are soil pathogens that invade the vascular system of host plants, causing the disease termed Verticillium wilt. This disease causes considerable economic setbacks in a wide range of crops, including hops (*Humulus lupulus* L.), for which infection with *Verticillium sp.* is termed 'hop wilt'. In Slovene hop gardens, a severe form of hop wilt was noticed in 1997. This form is very aggressive and can cause the infected plant to die within a single growing season. No effective phytopharmaceuticals against the infecting agent are available. In case of disease outbursts, strict phytosanitary measures must be adhered to, followed by crop rotation of non-host crops through several growing seasons. The only sustainable measure against the disease is planting resistant cultivars.

Breeding new hop cultivars is a demanding and slow process. The attainment of breeding goals can be accelerated – and its cost reduced – by the incorporation of marker assisted selection (MAS) practices into the breeding process. The major aims of the dissertation were 1) to develop molecular markers, potentially useful for MAS towards resistance breeding of hop and 2) to clone the genes conferring resistance to hop wilt to the most wilt-resistant hop cultivar 'Wye Target'. This cultivar is resistant even to lethal pathotypes of *V. albo-atrum*, which cause the severe form of hop wilt.

Initially, we set out to discover novel genic sequences putatively involved in disease resistance. By scanning the expressed sequence tag database of hop, we retrieved a set of R gene analogs (RGA), from which we produced 24 EST-RGA markers. Fifteen hop EST-RGA markers were successfully scored in a population of 144 progeny obtained from a cross of 'Wye Target' and the hop wilt susceptible male breeding line BL2/1. In this cross, hop wilt resistance is a quantitatively segregating trait. Fourteen EST-RGA markers were successfully added onto a linkage map of the cross. The probability of successful amplification and therefore ensuing polymorphism detection was heightened by determining exon/intron boundaries while designing primer pairs for individual EST-RGA. In addition to 8 kb resequenced exons, approximately 5 kb novel intronic sequences were retrieved. An initial characterisation of these hop introns was executed, representing a first glimpse into the characteristics of intron distribution in hop, as well as being a form of validation of the procedure used for marker design. We have noted, for example, that the average polymorphism frequencies for introns (0,431 %) and exons (0,386 %) are almost equal for our sample, despite the ratio between the two, described for other species, being 2 to 3 times higher for introns.

Using a goal-directed approach, we wished to isolate the hop gene conferring to 'Wye Target' the characteristic strong and durable resistance to hop wilt. Verticillium wilt resistance is best characterised in tomato, where it is conferred by one dominant locus, termed *Ve*. This locus is comprised of two paralogs of a gene coding for receptor-like proteins (RLP), named *Ve1* and *Ve2*. Only *Ve1* confers resistance, while *Ve2* represents an inactive gene. Homologs of the *Ve1* gene have been noted in several plant species, but they are best characterised for cotton, mint and lettuce. For cotton and mint, resistance is presumably of a quantitative nature, with *Ve1* playing a minor or no real role in its development. In lettuce, *Ve1* was shown to be linked to a major QTL for Verticillium wilt

resistance and possibly represents a major gene conferring disease resistance. The genetic background of *Verticillium* wilt resistance was also well characterized in crucifers, but no Ve1 homolog was found in this case, suggesting that resistance arises through other genetic means.

Initially, a hop EST representing a part of a hop Ve1 homolog was discovered and a Southern blot confirmed the presence of this homolog in the hop genome. In the present study, we have used TAIL-PCR, an approach of obtaining flanking regions of a known sequence stretch, to sequence the remaining portions of this Ve1 homologue from the 'Wye Target' genome. After assembly, two unique hop Ve1 homologous sequences were obtained and named HLVe1-1 and HLVe1-2.

Next, we designed primer pairs for individual amplifications of both genes. Following successful amplification of both homologs, complete coding region sequences were obtained from 'Wye Target' genomic DNA. HLVe1-1 and HLVe1-2 comprise 3111 bp and 3020 bp, respectively, which is in agreement with the length of tomato Ve1. Another similarity to Ve1 is in the lack of introns in both hop homologs. We also obtained 86 bp of the HLVe1-1 promotor and 490 bp of the HLVe1-2 promotor, which harbour motifs that bind transcription factors for which a role is established in development of resistance towards biotic stressors. Among these, the W-box and the TCA element motifs are of note. The former is involved in binding fungal elicitors, while the latter is involved in salicylic acid signalling. Salicylic acid is an important signal in systemic acquired resistance development in plants under stress.

Furthermore, we attempted to clone the amplified coding regions of HLVe1-1 and HLVe1-2. For HLVe1-1, only a single clone was obtained, and the cloned sequence named HLVe1-1A. Based on the rest of obtained HLVe1-1 sequences, the sequence of the presumed second allele (HLVe1-1B) was also determined. Cloning HLVe1-2 was, however, successful, and clones of three variants of the gene (named HLVe1-2A, HLVe1-2B and HLVe1-2T) were obtained and subsequently sequenced.

Based on observed polymorphisms in sequenced variants of HLVe1-1 and HLVe1-2, SNP markers were designed for each of the loci. In the case of HLVe1-1, segregation of the polymorphism within the designed marker (HLVe1-1M) suggested inheritance of both maternal alleles in all progeny. We supposed that a doubled gene at the Ve1 locus is present in 'Wye Target', which was confirmed by cloning HLVe1-1M. Cloned sequences confirmed the presence of both maternal variants and the single paternal variant in a single progeny. By scanning the whole span of the sequence of HLVe1-1 of 'Wye Target' for polymorphisms, we noted that only two distinct alleles were present in the cultivar. Due to the characteristics of its inheritance, HLVe1-1 cannot differentially confer resistance to hop wilt in progeny, because all progeny, which individually exhibit remarkable difference in resistance, receive an equal pair of alleles from the resistant mother.

For HLVe1-2, a typical Mendelian segregation of the two presumably functional alleles (HLVe1-2A and HLVe1-2B) was observed for the sum of progeny. For the two groups of offspring with different genotypes, a significant difference ($p < 0.05$) was observed for the hop wilt resistance level; those receiving the allele HLVe1-2A were, on average, more

resistant that those receiving HLVe1-2B. The marker was successfully added to the linkage map and noted, that it may be linked to a QTL termed *vh*, which explains approximately 25 % of variability in hop wilt resistance in the 'Wye Target' x BL2/1 progeny.

We obtained HLVe1-1 and HLVe1-2 sequences in a select set of world cultivars and wild hop accessions. Based on the alignment of all these sequences, we inferred a phylogenetic tree of all 11 isolated sequences of HLVe1-1 and all 12 isolated sequences of HLVe1-2, including the 2 and 3 respective alleles from 'Wye Target'. Sequences of both genes were strictly separated into two groups. We have managed to show that the HLVe1-2 locus of 'Wye Target' was introgressed from american hop germplasm, which is in accordance with its pedigree. Analyses of sequences from different hop accessions have also shown HLVe1-2 to be under the effect of positive selection ($\pi_a/\pi_s = 2.02$). On the other hand, since HLVe1-1 presumably does not confer resistance, it is apparently under the effect of neutral selection ($\pi_a/\pi_s = 0.91$). Based on the alignment of accessible protein sequences of Ve1 homologs in various plant species, a second phylogenetic tree was inferred, reflecting the established relations between the taxa. We performed an annotation of tomato Ve1 domains onto Ve1 homolog sequences of hop and other species and noted a remarkable conservation of domains, including individual LRR motifs, throughout the set of Ve1 homologs. We have shown that Ve1 and HLVe1-2 exhibit an identical domain structure.

All 15 developed markers that had been scored in this study were added to a framework linkage map of the cross 'Wye Target' x BL2/1. Upon addition, the total length of the map was increased by 9.1 %, while the average marker density dropped to 3.2 %. At least one new marker was added to 7 of 9 linkage groups of the framework map.

In this study, we have successfully isolated, cloned and characterized hop Ve1 homologs. The completed analyses of locus segregation, promoter motifs as well as coding region domain characteristics represent good initial evidence that HLVe1-2 may contribute at least part of the resistance to hop wilt to the cultivar 'Wye Target'. The marker HLVe1-2M, designed during this study, represents, due to its linkage to the known hop wilt resistance QTL, a useful marker for MAS towards novel resistant hop cultivars. The total of 24 designed EST-RGA markers, of which 14 were mapped, represent useful markers for mapping RGAs onto other hop linkage maps, as well as potential candidate markers for use in MAS. Last but not least, we have successfully cloned all three alleles of HLVe1-2 and one of the two alleles of HLVe1-1, which can be therefore further characterized in model systems to establish the function of these genes. In an outsourced study, the herein described HLVe1-2 alleles were coexpressed with the *V. dahliae* effector Ave1, which is recognised by the tomato Ve1 protein. As a result, HLVe1-2A, i.e. the presumably dominant allele of HLVe1-2, was shown to recognise Ave1, providing yet more evidence that this gene is involved in resistance of hop to hop wilt.

7 VIRI

- Acciarri N., Rotino G. L., Tamietti G., Valentino D., Voltattorni S., Sabatini E. 2007. Molecular markers for Ve1 and Ve2 *Verticillium* resistance genes from Italian tomato germplasm. *Plant Breeding*, 126: 617-621
- Ackerveken G.F., Kan J.A., De Wit P. J. 1992. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *The Plant Journal*, 2: 359-366
- Agrios G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th Edition. New York, Elsevier Academic Press: 952 str.
- Arens P., Mansilla C., Deinum D., Cavellini L., Moretti A., Rolland S., Van der Schoot H., Calvache D., Ponz F., Collonnier C., Mathis R., Caranta C., Vosman B. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and Applied Genetics*, 120: 65-664
- Ashfield T., Ong L.E., Nobuta K., Schneider C.M., Innes R.W. 2004. Convergent evolution of disease resistance gene specificity in two flowering plant families. *The Plant Cell Online*, 16: 309-318
- Barbara D.J., Clewes E. 2003. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology*, 4: 297-305
- Bassil N.V., Gilmore B., Oliphant J.M., Hummer K.E., Henning, J.A. 2008. Genic SSRs for European and North American hop *Humulus lupulus* L. *Genetic resources and crop evolution*, 55: 959-969
- Behre K.E. 1999. The history of beer additives in Europe—a review. *Vegetation History and Archaeobotany*, 8: 35-48
- Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S., Patocchi A., Barbieri M., Zhu J., Vinatzer B.A., Gianfranceschi L., Gessler C., Sansavini S. 2004. The *hcrvf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 886-890
- Belkhadir Y., Subramaniam R., Dangl J. L. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 391-399
- Bent A.F., Mackey D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 399-436
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. 2005. GenBank. *Nucleic acids research*, 33: D34-D38
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki063> (5. mar. 2014)
- Bernard V., Brunaud V., Lecharny A. 2010. TC-motifs at the TATA-box expected position in plant genes: a novel class of motifs involved in the transcription regulation. *BMC Genomics*, 11: 166
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-166>
- Bhat R.G., Subbarao K.V. 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 89: 1218-1225
- Birney E., Durbin R. 1997. Wise2.
<http://www.sanger.ac.uk/Software/Wise2>. (10. mar. 2013)

- Bolek Y., El-Zik K.M., Pepper A.E., Bell A.A., Magill C.M., Thaxton P.M., Reddy O.U.K. 2005. Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton. *Plant Science*, 168: 1581-1590
- Boyd L.A., Ridout C., O'Sullivan D.M., Leach J.E., Leung H. 2012. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, 29: 233-240
- Caicedo A.L. 2008. Geographic diversity cline of R gene homologs in wild populations of *Solanum pimpinellifolium* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 95: 393-398
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10: 421
- Caplan J., Padmanabhan M., Dinesh-Kumar S.P. 2008. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host and Microbe*, 3: 126-135
- Castro C.B., Whittock L.D., Whittock S.P., Leggett G., Koutoulis A. 2008. DNA sequence and expression variation of hop (*Humulus lupulus*) valerophenone synthase (VPS), a key gene in bitter acid biosynthesis. *Annals of Botany*, 102: 265-273
- Chadwick L.R., Pauli G.F., Farnsworth N.R. 2006. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*, 13: 119-131
- Chee P.W., Rong J., Williams-Coplin D., Schulze S.R., Paterson A.H. 2004. EST derived PCR-based markers for functional gene homologues in cotton. *Genome* 47: 449-462
- Chen N.W., Sévignac M., Thureau V., Magdelenat G., David P., Ashfield T., Innes R.W., Geffroy V. 2010. Specific resistances against *Pseudomonas syringae* effectors AvrB and AvrRpm1 have evolved differently in common bean (*Phaseolus vulgaris*), soybean (*Glycine max*), and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 187: 941-956
- Chen R., Zhang Z., Sun W., Fu Y., Zhang Q., Wei L., Liang Y., Dong, R. 2012. System Position and Divergent Time of Based on ITS Sequence *Humulus scandens*. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 1470-1475
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G. 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell Online*, 1: 465-476
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803-814
- Cirulli M., Colella C., D'Amico M., Amenduni M., Bubici G. 2008. Comparison of screening methods for the evaluation of olive resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Plant Pathology*, 90: 7-14
- Clark S.M., Vaitheeswaran V., Ambrose S.J., Purves R.W., Page, J.E. 2013. Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). *BMC Plant Biology*, 13: 12
- Collard B.C.Y., Mackill D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363: 557-572
- Collier S.M., Moffett P. 2009. NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. *Trends in Plant Science*, 14: 521-529
- Čerenak A., Javornik B. 2001. Analysis of molecular markers correlated with resistance of hop (*Humulus lupulus* L.) to damson-hop aphid (*Phorodon humuli* Schrank). V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Canterbury, 5.-7. avgust 2001. Seigner E. (ur.). Canterbury, International Hop Growers Convention: 32-35

- Čerenak A., Javornik B. 2004. Marker assisted selection in hop breeding. V: Proceedings of the 1st International *Humulus* Symposium, Corvallis, Oregon, ZDA 1.-7. avgust 2004. Hummer K.E. (ur.), Henning J. (ur.). Leuven, International Society for Horticultural Science: 35-40
- Čerenak A., Radišek S., Košir I.J., Oset M. 2010. Strategija razvoja žlahtnjenja novih sort hmelja (*Humulus lupulus* L.). V: Novi izzivi v poljedelstvu 2010, Rogaška Slatina, 2. in 3. december 2010. Kocjan Ačko D., Čeh B. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 108-113
- Čerenak A., Šatovič Z., Javornik B. 2006. Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content. *Genome*, 49: 485-494
- Čerenak A., Šatovič Z., Jakše J., Luthar Z., Carović-Stanko K., Javornik B. 2009. Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 170: 141-154
- Dangl J.L., Jones J.D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833
- Dangl J.L., Horvath D.M., Staskawicz B.J. 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science*, 341: 746-751
- Danilova T.V., Karlov G.I. 2006. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 151: 15-21
- Darby P. 2001. Single gene traits in hop breeding. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Canterbury, 5.-7. avgust 2001. Seigner E. (ur.). Canterbury, International Hop Growers Convention: 86-91
- Darby P. 2005. The assesement of resistance to diseases in the UK breeding programme. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, George, 20.-25. februar 2005. Seigner E. (ur.). George, International Hop Growers Convention: 7-11
- Darby P. 2007. The UK hop breeding programme: a new site and new objectives. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Tettnang, 24.-28. junij 2007. Seigner E. (ur.). Tettnang, International Hop Growers Convention: 10-13
- Darby P. 2009. The inheritance of resistance to aphids from the new UK variety 'Boadicea'. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, León, 21.-25. junij 2009. Seigner E. (ur.). León, International Hop Growers Convention: 9-12
- Darby P. 2013. Could there be a dominant gene for susceptibility to hop powdery mildew? V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Kiev, 4.-9. junij 2011. Seigner E. (ur.). Kiev, International Hop Growers Convention: 17-20
- Darby P., Atkinson R., Buggey L.A., Meacham A.E. 2003. The potential for selective breeding to increase the xanthohumul content of hops. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Dobrna-Žalec, 24.-27. junij 2003. Seigner E. (ur.). Dobrna-Žalec, International Hop Growers Convention: 97-100

- de Jonge R., Bolton M., Kombrink A., van den Berg G., Yadeta K., Thomma B.P.H.J. 2013. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Research*, 23: 1271-1282
- de Jonge R., van Esse H.P., Maruthachalam K., Bolton M.D., Santhanam P., Saber M.K., Zhang Z., Usami T., Lievens B., Subbarao K.V., Thomma B.P.H.J. 2012. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 5110-5115
- De Keyser E., De Riek J., Van Bockstaele E. 2009. Discovery of species-wide EST-derived markers in *Rhododendron* by intron-flanking primer design. *Molecular Breeding*, 23: 171-178
- De Smet I., Voß U., Jürgens G., Beeckman T. 2009. Receptor-like kinases shape the plant. *Nature Cell Biology*, 11: 1166-1173
- De Wit P.J., Mehrabi R., van den Burg H.A., Stergiopoulos I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, 10: 735-747
- Derksen H., Rampitsch C., Daayf F. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science*, 207: 79-87
- DeYoung B.J., Innes R. W. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology*, 7: 1243-1249
- Dilbirligi M., Gill K.S. 2003. Identification and analysis of expressed resistance gene sequences in wheat. *Plant Molecular Biology*, 53: 771-787
- Divashuk M.G., Alexandrov O.S., Kroupin P.Y., Karlov G.I. 2011. Molecular cytogenetic mapping of *Humulus lupulus* sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 134: 213-219
- Diwan N., Fluhr R., Eshed Y., Zamir D., Tanksley S.D. 1999. Mapping of Ve in tomato: a gene conferring resistance to the broad-spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 315-319
- Dixon M.S., Jones D.A., Keddle J.S., Thomas C.M., Harrison K., Jones J.D. 1996. The Tomato Cf-2 Disease Resistance Locus Comprises Two Functional Genes Encoding Leucine-Rich Repeat Proteins. *Cell*, 84: 451-459
- Dodds P.N., Rathjen, J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11: 539-548
- Dolinar M., Ferant N., Žolnir M., Simončič A., Knapič V. 2002. Bolezni, škodljivci in pleveli v hmeljnih nasadih. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 51-101
- Dolinar M., Simončič A. 1999. Hmeljeva Uvelost (*Verticillium albo-atrum* Reinke at Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn) v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 3.-4. marec 1999. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 201-208
- Dorn C., Bataille F., Gaebele E., Heilmann J., Hellerbrand C. 2010. Xanthohumol feeding does not impair organ function and homeostasis in mice. *Food and Chemical toxicology* 48: 1890-1897
- Duvick J., Fu A., Muppirala U., Sabharwal M., Wilkerson M.D., Lawrence C.J., Lushbough C., Brendel V. 2008. PlantGDB: a resource for comparative plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 36:D959-F965
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm1041> (5. mar. 2014)
- Eitas T.K., Dangl J.L. 2010. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 472-477

- Ellendorff U., Fradin E.F., de Jonge R., Thomma B.P.H.J. 2009. RNA silencing is required for *Arabidopsis* defense against verticillium wilt disease. *Journal of Experimental Botany*, 60: 591-602
- Ellis J.G., Rafiqi M., Gan P., Chakrabarti A., Dodds P.N. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:399-405
- FAOSTAT. FAO Statistical Databases. Agriculture Data Collection (Primary Crops). 2009. <http://faostat.fao.org> (31. mar. 2013)
- Feltus F.A., Singh H.P., Lohithaswa H.C., Schulze S.R., Silva T.D., Paterson A. H. 2006. A comparative genomics strategy for targeted discovery of single-nucleotide polymorphisms and conserved-noncoding sequences in orphan crops. *Plant Physiology*, 140: 1183-1191
- Finn R.D., Mistry J., Tate J., Coggill P., Heger A., Pollington J.E., Gavin O.L., Gunasekaran P., Ceric G., Forslund K., Holm L., Sonnhammer E.L., Eddy S.R., Bateman A. 2010. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 38: D211-D222
- Flores-Sanchez I.J., Verpoorte R. 2008. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*, 7: 615-639
- Fourmann M., Charlot F., Froger N., Delourme R., Brunel D. 2001. Expression, mapping, and genetic variability of *Brassica napus* disease resistance gene analogues. *Genome*, 44: 1083-1099
- Fradin E.F. 2011. Functional Analysis of the Tomato Ve Resistance Locus Against Verticillium Wilt. Doktorska disertacija. Wageningen, Wageningen University: 163 str.
- Fradin E.F., Abd-El-Halim A., Masini L., van den Berg G.C., Joosten M. H., Thomma B.P.H.J. 2011. Interfamily transfer of tomato Ve1 mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156: 2255-2265
- Fradin E.F., Thomma B.P.H.J. 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7: 71-86
- Fradin E.F., Zhang Z., Ayala J.C.J., Castroverde C.D.M., Nazar R.N., Robb J., 2009. Genetic dissection of Verticillium wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiology*, 150: 320-332
- Friedman A.R., Baker B.J. 2007. The evolution of resistance genes in multi-protein plant resistance systems. *Current opinion in genetics & development* 17: 493-499
- Gatica-Arias A., Farag M.A., Stanke M., Matoušek J., Wessjohann L., Weber G. 2012. Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Reports*, 31: 111-119
- Gatica-Arias A., Stanke M., Häntzschel K.R., Matoušek J., Weber G. 2013. Over-expression of the transcription factor HlMYB3 in transgenic hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettnanger) modulates the expression of genes involved in the biosynthesis of flavonoids and phloroglucinols. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113: 279-289
- Gent D. 2012. New outbreaks of Verticillium wilt on hop in Oregon caused by nonlethal *Verticillium albo-atrum*. *Plant Health Progress*. <http://dx.doi.org/10.1094/php-2012-0521-01-rs>
- Gent D.H., Mahaffee W.F., Turechek, W.W. 2006. Spatial heterogeneity of the incidence of powdery mildew on hop cones. *Plant Disease*, 90: 1433-1440
- Gerhäuser C. 2005. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 827-831

- Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauf J., Neumann I., Scherf H.-R., Frank N., Bartsch H., Becker H. 2002. Cancer Chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 959-969
- Goese M., Kammhuber K., Bacher A., Zenk M.H., Eisenreich W. 1999. Biosynthesis of bitter acids in hops. *European Journal of Biochemistry*, 263: 447-454
- Gold J., Robb J. 1995. The role of the coating response in *Craigella* tomatoes infected with *Verticillium dahliae*, races 1 and 2. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47: 141-157
- Goldsbrough A.P., Albrecht H., Stratford R. 1993. Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes. *The Plant Journal*, 3: 563-571
- Gómez-Gómez L., Boller T. 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5: 1003-1011
- Goujon M., McWilliam H., Li W., Valentin F., Squizzato S., Paern J., Lopez R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38: W695-W699
- Grabowska-Joachim A., Śliwińska E., Piguła M., Skomra U., Joachim A. J. 2006. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold and Zucc.(Cannabaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 75: 207-214
- Grattapaglia D., Sederoff R. 1994. Genetic linkage mapping in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137: 1121-1137
- Gupta P.K., Rustgi, S. 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional & Integrative Genomics*, 4: 139-162
- Gururani M.A., Venkatesh J., Upadhyaya C.P., Nookaraju A., Pandey S.K., Park S.W. 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78: 51-65
- Häffner E., Karlowsky P., Diederichsen E. 2010. Genetic and environmental control of the *Verticillium* syndrome in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 10: 235
- Hammond-Kosack K.E., Jones, J.D. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Biology*, 48: 575-607
- Hammond-Kosack K.E., Parker J.E. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 177-193
- Hartl L., Seefelder S. 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 112-116
- Hauck P., Thilmony R., He S.Y. 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 8577-8582
- Hawke M.A., Lazarovits G. 1995. The role of melanin in the survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytoparasitica*, 23: 54
- Hayes R.J., Maruthachalam K., Vallad G.E., Klosterman S.J., Simko I., Luo Y., Subbarao K.V. 2011a. Iceberg lettuce breeding lines with resistance to *Verticillium* wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae*. *HortScience*, 46: 501-504

- Hayes R.J., McHale L.K., Vallad G.E., Truco M.J., Michelmore R.W., Klosterman S.J., Maruthachalam K., Subbarao K.V. 2011b. The inheritance of resistance to *Verticillium* wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante. *Theoretical and Applied Genetics*, 123: 509-517
- Hématy K., Cherk C., Somerville S. 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 406-413
- Henning J.A., Townsend M.S., Gent D.H., Bassil N., Matthews P., Buck E., Beatson R. 2011. QTL mapping of powdery mildew susceptibility in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 180: 411-420
- Hofmann K., Baron, M. D. 1996. Boxshade 3.21. Pretty printing and shading of multiple-alignment files. Kay Hofmann ISREC Bioinformatics Group, Lausanne, Švica
- Hogenhout S.A., Van der Hoorn R.A., Terauchi R., Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe interactions*, 22: 115-122
- Horlemann C., Schwekendiek A., Höhnle M., Weber, G. 2003. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 22: 210-217
- Howard E.L., Whittock S.P., Jakse J., Carling J., Matthews P.D., Probasco G., Henning J.A., Darby P., Cerenak A., Javornik B., Killian A., Koutoulis A. 2011. High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DART). *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 1265-1280
- Hu G., DeHart A.K., Li Y., Ustach C., Handley V., Navarre R., Hwang, C.-F., Aegerter B. J., Williamson V. M., Baker B. 2005. EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene Ve. *The Plant Journal*, 42: 376-391
- Huan H.C., Hanna M.R. 1991. An efficient method to evaluate alfalfa cultivars for resistance to *Verticillium* wilt. *Canadian Journal of Plant Science*, 71: 871-875
- IHGC. 2011. International hop growers' convention economic commission summary reports.
<http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/IHGC%20hop%20supply.pdf> (3. feb. 2013): 4 str
- Inderbitzin P., Davis P. M., Bostock R. M., Subbarao K. V. 2011. The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS One*, 6: e18260
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018260>
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28
- Jacob F., Vernaldi S., Maekawa T. 2013. Evolution and conservation of plant NLR functions. *Frontiers in Immunology*, 4: 297
- Jacobsen P. 1957. The sex chromosomes in *Humulus*. *Hereditas*, 43: 357-370
- Jakše J., Čerenak A., Radišek S., Šatović Z., Luthar Z., Javornik B. 2013. Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 1431-43
- Jakše J., Javornik B. 2001. High Throughput Isolation of Microsatellites in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 217-226
- Jakše J., Kindlhofer K., Javornik B. 2001. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. *Genome*, 44: 773-782

- Jakše J., Luthar Z., Javornik B. 2008a. New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus* L. *Molecular Ecology Resources*, 8: 769-772
- Jakše J., Šatovič Z., Javornik B. 2004. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 47: 889-899
- Jakše J., Štajner N., Kozjak P., Čerenak A., Javornik B. 2008b. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 21: 139-148
- Jakše J., Štajner N., Luthar Z., Jeltsch J.M., Javornik B. 2011. Development of transcript-associated microsatellite markers for diversity and linkage mapping studies in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 28: 227-239
- Jiang F., Zhao J., Zhou L., Guo W.Z., Zhang T.Z. 2009. Molecular mapping of Verticillium wilt resistance QTL clustered on chromosomes D7 and D9 in upland cotton. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52:872-884
- Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329
- Judd W.S., Olmstead R.G. 2004. A survey of tricolpate (eudicot) phylogenetic relationships. *American Journal of Botany*, 91: 1627-1644
- Karlov G.I., Danilova T.V., Horlemann C., Weber G. 2003. Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica*, 132: 185-190
- Kawchuk L.M., Hachey J., Lynch D.R., Kulcsar F., van Rooijen G., Waterer D.R., Robertson A., Kokko E., Byers R., Howard R.J., Fischer R., Prufer D. 2001. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 98: 6511-6515
- Kawchuk L.M., Hachey J., Lynch D.R. 1998. Development of sequence characterized DNA markers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato. *Genome*, 41: 91-95
- Klosterman S. J., Atallah Z. K., Vallad G. E., Subbarao F.V. 2009. Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *The Annual Review of Pathology*, 47: 39-62
- Klosterman S.J., Subbarao K.V., Kang S., Veronese P., Gold S.E., Thomma, B. P.H.J., Chen Z., Henrissat B., Lee Y.H., Park J., Garcia-Pedrajas M.D., Barbara D.J., Anchieta A., de Jonge R., Santhanam P., Maruthachalam K., Atallah Z., Amyotte S.G., Paz Z., Inderbitzin P., Hayes R.J., Heiman D.I., Young S., Zeng Q., Engels R., Galagan J., Cuomo C.A., Dobinson K.F., Ma L.J. 2011. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS pathogens*, 7:e1002137 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002137>
- Koelling J., Coles M.C., Matthews P.D., Schwekendiek A. 2012. Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. *Molecular Breeding*, 30: 479-484
- Kohler A., Rinaldi C., Duplessis S., Baucher M., Geelen D. 2008. Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology*, 66: 619-636
- Koie K., Inaba A., Okada Y., Kaneko T., Ito K. 2005. Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus* L.). *Acta Horticulturae*, 668: 59-67
- Kozjak P., Jakše J., Javornik B. 2009. Isolation and sequence analysis of NBS-LRR disease resistance gene analogs from hop (*Humulus lupulus* L.) *Plant Science*, 176: 775-82

- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305: 567–580
- Kruijt M., De Kock M.J., De Wit, P.J. 2005a. Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular Plant Pathology*, 6: 85-97
- Kruijt M., Kip D.J., Joosten M.H., Brandwagt B.F., de Wit, P.J. 2005b. The Cf-4 and Cf-9 resistance genes against *Cladosporium fulvum* are conserved in wild tomato species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 1011-1021
- Kump B., Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114: 149-158
- Lacombe S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E., Peeters N., Dahlbeck D., van Esse H.P., Smoker M., Rallapalli G., Thomma B.P.H.J., Staskawitz B., Jones J.D.G., Zipfel, C. 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology*, 28: 365-369
- Larkan N.J., Lydiate D.J., Parkin I.A.P., Nelson, M.N., Epp, D.J., Cowling W.A., Rimmer S.R., Borhan M. H. 2013. The *Brassica napus* blackleg resistance gene LepR3 encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVR1M1. *New Phytologist*, 197: 595-605
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948
- Leister D. 2004. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends in Genetics*, 20: 116-122
- Leister D., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, 14: 421-429
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne, M. 2009. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 451-458
- Lescot M., Déhais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y., Rouzé P., Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30: 325-327
- Li D., Xia Z., Deng Z., Liu X., Dong J., Feng F. 2012. Development and characterization of intron-flanking EST-PCR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Molecular Biotechnology*, 51: 148-159
- Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., Walker J.C. 2002. BAK1, an *Arabidopsis* LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell*, 110: 213-222
- Liao P.C., Lin K.H., Ko C.L., Hwang, S.Y. 2011. Molecular evolution of a family of resistance gene analogs of nucleotide-binding site sequences in *Solanum lycopersicum*. *Genetica*, 139: 1229-1240
- Librado P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452

- Liebrand T.W., Kombrink A., Zhang Z., Sklenar J., Jones A.M., Robatzek S., Thomma B.B.H.J., Joosten M.H. 2013a. Chaperones of the endoplasmic reticulum are required for Ve1-mediated resistance to *Verticillium*. *Molecular plant pathology* <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12071> (5. mar. 2014)
- Liebrand T.W., van den Berg G.C., Zhang Z., Smit P., Cordewener J.H., America A.H.P., Sklenar J., Jones A.M.E., Tameling W.I.L., Robatzek S., Thomma B.P.H.J., Joosten M. H. 2013b. Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 10010-10015
- Lippok B., Birkenbihl R.P., Rivory G., Brümmer J., Schmelzer E., Logemann E., Somssich I.E. 2007. Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen-or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 420-429
- Liu H., Lin Y., Chen G., Shen Y., Liu J., Zhang S. 2012. Genome-scale identification of resistance gene analogs and the development of their intron length polymorphism markers in maize. *Molecular Breeding*, 29: 437-447
- Liu Y.G., Mitsukawa N., Oosumi T., Whittier R.F. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal*, 8: 457-463
- Lorenzana A., Hermoso de Mendoza A., Seco M.V., Casquero P.A. 2010. Population development of *Phorodon humuli* and predators (*Orius* spp.) within hop cones: Influence of aphid density on hop quality. *Crop Protection*, 29: 832-837
- Lukasik E., Takken F.L. 2009. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 427-436
- Maekawa T., Kracher B., Vernaldi S., van Themaat E.V.L., Schulze-Lefert P. 2012. Conservation of NLR-triggered immunity across plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 20119-20123
- Mahaffee W., Pethybridge S., Gent D.H. 2009. Compendium of hop diseases and pests. American Phytopathological Society: 93 str.
- Mandelc S., Radišek S., Jamnik P., Javornik B. 2009. Comparison of mycelial proteomes of two *Verticillium albo-atrum* pathotypes from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 159-171
- Mandelc S., Timperman I., Radišek S., Devreese B., Samyn B., Javornik, B. 2013. Comparative proteomic profiling in compatible and incompatible interactions between hop roots and *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 68: 23-31.
- Mbanjo E.G.N., Tchoumboungang F., Mouelle A.S., Oben J.E., Nyine M., Dochez C., Ferguson M.E., Lorenzen J. 2012. Molecular marker-based genetic linkage map of a diploid banana population (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica*, 188: 369-386
- McAdam E.L., Freeman J.S., Whittock S.P., Buck E.J., Jakše J., Čerenak A., Javornik B., Kilian A., Wang C.-H., Andersen D., Vaillancourt R.E., Carling J., Beatson R., Graham L., Graham D., Darby P., Koutoulis, A. 2013. Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry. *BMC Genomics*, 14:360
- McDonald B.A., Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349-379
- McDowell J. M. 2004. Convergent evolution of disease resistance genes. *Trends in Plant Science*, 9:315-317

- McDowell J.M., Simon S.A. 2006. Recent insights into R gene evolution. *Molecular Plant Pathology*, 7: 437-448
- McDowell J.M., Woffenden B.J. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, 21: 178-183
- McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7: 212
- Meyers B.C., Kaushik S., Nandety, R.S. 2005. Evolving disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 129-134
- Meyers B.C., Kozik A., Griego A., Kuang H., Michelmore R.W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15: 809-834
- Michelmore R.W., Meyers B.C. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*, 8: 1113-1130
- Milligan S., Kalita J., Pocock V., Heyerick A., De Cooman L., Rong H., De Keukeleire D. 2002. Oestrogenic activity of the hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*, 123: 235-242
- Milligan S.R., Kalita J.C., Pocock V., Van De Kauter V., Stevens J.F., Deinzer M.L., Rong H., De Keukeleire D. 2000. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85: 4912-4915
- Möbius N., Hertweck C. 2009. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 390-398
- Moir M. 2000. Hops: a millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58: 131-146
- Monaghan J., Zipfel C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 349-357
- Moore J.W., Loake G.J., Spoel S.H. 2011. Transcription dynamics in plant immunity. *The Plant Cell Online* 23: 2809-2820
- Murakami A. 2001. Structural differences in the intergenic spacer of 18S-26S rDNA and molecular phylogeny using partial external transcribed spacer sequence in Hop, *Humulus lupulus*. *Breeding science*, 51: 163-170
- Murakami A., Darby P., Javornik B., Pais M.S.S., Seigner E., Lutz A., Svoboda, P. 2006. Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1553-1562
- Nagaraj S., Gasser R., Ranganathan S., 2006. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Oxford Journals. Life Sciences. Briefings in Bioinformatics*, 8: 6-21
- Nagel J., Culley L.K., Lu Y., Liu E., Matthews P.D., Stevens J.F., Page J.E. 2008. EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *Plant Cell*, 20: 186-200
- Neve R.A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- New England Biolabs. Phusion® High Fidelity DNA Polymerase. 2014.
<https://www.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase#pd-advantages-features> (13. Mar. 2014)
- Novák P., Krofta K., Matoušek J. 2006. Chalcone synthase homologues from *Humulus lupulus*: some enzymatic properties and expression. *Biologia Plantarum*, 50: 48-54
- Novák P., Matoušek J., Bříza J. 2003. Valerophenone synthase-like chalcone synthase homologues in *Humulus lupulus*. *Biologia Plantarum*, 46: 375-381

- Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198: 249-266
- Oberhollenzer K., Seigner E., Lutz A., Eichmann R., Hückelhoven R. 2011. Resistance mechanisms of different hop genotypes to hop powdery mildew. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Lublin, 19.-23. junij 2011. Seigner E. (ur.). Lublin, International Hop Growers Convention: 21-24
- Okada Y., Sano Y., Kaneko T., Abe I., Noguchi H., Ito K. 2004. Enzymatic reactions by five chalcone synthase homologs from hop (*Humulus lupulus* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68: 1142-1145
- Park J.W., Solis-Gracia N., Trevino C., da Silva J.A. 2012. Exploitation of conserved intron scanning as a tool for molecular marker development in the *Saccharum* complex. *Molecular Breeding*, 30: 987-999
- Patzak J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 121: 9-18
- Patzak J., Nesvadba V., Henychová A., Krofta K. 2010a. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 136-145
- Patzak J., Nesvadba V., Krofta K., Henychova A., Marzoev A.I., Richards, K. 2010b. Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular methods. *Genome* 53: 545-557
- Patzak J., Vrba L., Matousek J. 2007. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 50: 15-25
- Pavel A.B., Vasile C.I. 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13: 9
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-9> (5. mar. 2014)
- Pegg G.F., Street P.F.S. 1984. Measurement of *Verticillium albo-atrum* in high and low resistance hop cultivars. *Transactions of the British Mycological Society*, 82: 99-106
- Peredo E.L., Revilla M.Á., Reed B.M., Javornik B., Cires E., Prieto J.A.F., Arroyo-García R. 2010. The influence of European and American wild germplasm in hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57: 575-586
- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8: 785-786
- Pethybridge S.J., Hay F.S., Barbara D.J., Eastwell K.C., Wilson C.R. 2008. Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology, and management. *Plant Disease*, 92: 324-338
- Pflieger S., Lefebvre V., Causse M. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding*, 7: 275-291
- Pieterse C.M., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5: 308-316
- Pillay M., Kenny S.T. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F1 progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 334-339
- Pillay M., Kenny, S.T. 2006. Structural organization of the nuclear ribosomal RNA genes in *Cannabis* and *Humulus* (Cannabaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 258: 97-105

- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 421-426
- Poland J.A., Balint-Kurti P.J., Wisser R.J., Pratt R.C., Nelson R.J. 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14: 21-29
- Polley A., Ganai M.W., Seigner E. 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome*, 40: 357-361
- Qi D., Innes R.W. 2013. Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling. *Frontiers in Immunology*, 4: 348
- Qiu Z., Shi P., Luo H., Bai Y., Yuan T., Yang P., Liu S., Yao B. 2010. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 506-512
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2004a. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease*, 88: 1115-1122
- Radišek S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. 2003. Characterization of *Verticillium albo-atrum* Field Isolates Using Pathogenicity Data and AFLP Analysis. *Plant Disease*, 87:633-638
- Radišek S., Simončič A., Jakše J., Javornik B. 2004b. Outbreaks of the lethal form of hop wilt in Slovenia: monitoring survey and diagnostic research. V: Proceedings of the 1st International *Humulus* Symposium, Corvallis, Oregon, ZDA 1.-7. avgust 2004.
- Hummer K.E. (ur.), Henning J. A. (ur.). Leuven: International Society for Horticultural Science: 117-121
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 301-314
- Rambaldi D., Ciccarelli F.D. 2009. FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics*, 25: 2281-2282
- Reeves P.A., Richards C.M. 2011. Species delimitation under the general lineage concept: an empirical example using wild North American hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). *Systematic Biology*, 60: 45-59
- Robb J. 2007. *Verticillium* tolerance: resistance, susceptibility, or mutualism? *Botany*, 85: 903-910
- Ron M. Avni A. 2004. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant Cell Online*, 16: 1604-1615
- Rossi M., Araujo P.G., Paulet F., Garsmeur O., Dias V.M., Chen H., Van Sluys M.A., D'Hont A. 2003. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. *Molecular Genetics & Genomics*, 269: 406-419
- Roy A. T., Leggett G., Koutoulis A. 2001. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37: 79-83
- Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132: 365-386
- Rygulla W., Snowdon R.J., Friedt W., Happstadius I., Cheung W.Y., Chen D. 2008. Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytopathology*, 98: 215-21
- Sackston W.E. 1981. The Sunflower Crop and Disease: Progress, Problems, and Prospects. *Plant Disease*, 65: 643-648

- Schmidt E.D., Guzzo F., Toonen M.A., De Vries S.C. 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124: 2049-2062
- Schulze-Lefert P., Panstruga R. 2011. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science*, 16: 117-125
- Seefelder S., Ehrmaier H., Schweizer G., Seigner E. 2000a. Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant Breeding*, 119: 257-263
- Seefelder S., Ehrmaier H., Schweizer G., Seigner E. 2000b. Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. *Plant Breeding* 119: 249-255
- Seefelder S., Lutz A., Seigner E. 2005. Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.) V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, George, 20.-25. februar 2005. Seigner E. (ur.). George, International Hop Growers Convention: 31-34
- Seefelder S., Seigner E. 2003. Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Dobrna-Žalec, 24.-27. junij 2003. Seigner E. (ur.). Dobrna-Žalec, International Hop Growers Convention: 97-100
- Seefelder S., Seigner E., Niedermeier E., Radišek S., Javornik B. 2009. Genotyping of *Verticillium* pathotypes in the Hallertau: Basic findings to assess the risk of *Verticillium* infections. V: Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, León, 21.-25. junij 2009. Seigner E. (ur.). León, International Hop Growers Convention: 74-76
- Shah J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 459-464
- Shang W., Zhou R., Jia J., Gao L. 2010. RGA-ILP, a new type of functional molecular markers in bread wheat. *Euphytica*, 172: 263-273
- Simko I., Constanzo S., Haynes K. G., Christ B. J. Jones, R.W. 2004a. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 217-224
- Simko I., Haynes K. G., Ewing E.E., Constanzo S., B. J. Christ B. J., Jones R.W. 2004b. Mapping genes for resistance to *Verticillium albo-atrum* in tetraploid and diploid potato populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 271: 522-531
- Srinivasan V., Goldberg D., Haas G.J. 2004. Contributions to the antimicrobial spectrum of hop constituents. *Economic botany*, 58: S230-S238
- Stahl E.A., Dwyer G., Mauricio R., Kreitman M., Bergelson J. 1999. Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature*, 400: 667-671
- Stergiopoulos I., de Wit P.J. 2009. Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 233-263
- Stevens J.F., Page J.E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65: 1317-1330

- Škof S., Čerenak A., Jakše J., Bohanec B., Javornik B. 2012. Ploidy and sex expression in monoecious hop (*Humulus lupulus*). *Botany*, 90: 617-626
- Štajner N., Jakše J., Kozjak P., Javornik B. 2005. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 168: 1: 213-221
- Štajner N., Šatovič Z., Čerenak A., Javornik B. 2008. Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus* L.) as inferred from microsatellites. *Euphytica*, 161, 301-311
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. 2002. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 51-101
- Šustar-Vozlič J., Javornik B. 1999. Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breeding*, 118: 175-181
- Takken F.L., Albrecht M., Tameling W.I. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 383-390
- Talboys P. W. 1958a. Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 41: 249-260
- Talboys P. W. 1958b. Some mechanisms contributing to *Verticillium* -resistance in the hop root. *Transactions of the British Mycological Society*, 41: 227-241
- Talboys P. W. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 181: 319-332
- Tameling W.I., Joosten M.H. 2007. The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 126-134
- Tamura M., Tachida, H. 2011. Evolution of the number of LRRs in plant disease resistance genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 285: 393-402
- Thomma B.P.H.J., Nürnberger T., Joosten, M.H.A.J. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell Online*, 23: 4-15
- Ting J.P.Y., Willingham S.B., Bergstralh D.T. 2008. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 8: 372-379
- Tör M., Lotze M.T., Holton, N. 2009. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3645-3654
- Toyoda K., Collins N.C., Takahashi A., Shirasu K. 2002. Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Research*, 11: 567-582
- Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hämäläinen J.H., Marczewski W, Watanabe K.N. 2008. Evidence for utility of the same PCRbased markers for selection of extreme resistance to potato virus Y controlled by Rysto of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. *Annals of Applied Biology*, 152: 121-130
- Van Ooijen JW, Voorrips RE. 2001. JoinMap version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International*, Wageningen
- van der Biezen E.A., Jones J.D. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 454-456
- Van der Hoorn R.A., Laurent F., Roth R., De Wit P.J.G.M. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr 9/Cf-9-induced and Avr 4/Cf-4-induced necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 439-446
- van Esse H.P., Fradin E.F., de Groot P.J., de Wit P.J., Thomma B.P.H.J. 2009. Tomato transcriptional responses to a foliar and a vascular fungal pathogen are distinct. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 245-258

- Varshney R.K., Ribaut J.M., Buckler E.S., Tuberosa R., Rafalski J.A., Langridge P. 2012. Can genomics boost productivity of orphan crops? *Nature Biotechnology*, 30: 1172-1176
- Veronese P., Narasimhan M.L., Stevenson R.A., Zhu J.K., Welle, S.C., Subbarao K.V., Bressan R.A. 2003. Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 35: 574-587
- Vining K., Davis T. 2009. Isolation of a Ve homolog, mVe1, and its relationship to verticillium wilt resistance in *Mentha longifolia* (L.) Huds. *Molecular Genetics & Genomics*, 282: 173-184
- Vining K.J., Zhang Q., Smith C.A., Davis T. M. 2007. Identification of resistance gene analogs and *Verticillium* wilt resistance-like sequences in *Mentha longifolia*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132: 541-550
- Voorrips R.E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93: 77-78
- Wang G., Ellendorff U., Kemp B., Mansfield J.W., Forsyth A., Mitchell K., Bastas K., Liu C.-M., Woods-Tör A., Zipfel C., de Wit P.J.G.M., Jones J.D.G., Tör M., Thomma B.P.H.J. 2008a. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147: 503-517
- Wang G., Tian L., Aziz N., Broun P., Dai X., He J., King A., Zhao P.X. and Dixon R.A., 2008b. Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop. *Plant Physiology*, 148: 1254-1266
- Wang Y., Chen J., Francis D.M., Shen H., Wu T., Yang W. 2010a. Discovery of intron polymorphisms in cultivated tomato using both tomato and *Arabidopsis* genomic information. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1199-1207
- Wang Z., Guo J.L., Zhang F., Huang Q.S., Huang L.P., Yang Q. 2010b. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Solanum torvum* upon *Verticillium dahliae* infection. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57: 676-68
- Wei H., Fu Y., Arora R. 2005. Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 1347-1356
- Xu Y., Crouch J.H. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science*, 48: 391-407
- Xu Y., Lu Y., Xie C., Gao S., Wan J., Prasanna B.M. 2012. Whole-genome strategies for marker-assisted plant breeding. *Molecular breeding*, 29: 833-854
- Yadeta K.A. 2012. *Verticillium* wilt resistance in *Arabidopsis* and tomato: identification and functional characterization. Doktorska disertacija. Wageningen, Wageningen University: 147 str.
- Yadeta K.A., Hanemian M., Smit P., Hiemstra J.A., Pereira A., Marco Y., Thomma B.P.H.J. 2011. The *Arabidopsis thaliana* DNA-binding protein AHL19 mediates *Verticillium* wilt resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24: 1582-1591
- Yadeta K.A., Thomma B.P.H.J. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in plant science*, 4: 97
- Yamamoto S., Nakano T., Suzuki K., Shinshi H. 2004. Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1679: 279-287

- Yang C., Guo W.Z., Li G.Y., Gao F., Lin S.S., Zhang T.Z. 2008. QTLs mapping for *Verticillium* wilt resistance at seedling and maturity stages in *Gossypium barbadense* L. *Plant Science*, 174, 290-298
- Yang L., Jin G., Zhao X., Zheng Y., Xu Z., Wu W. 2007. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics*, 23: 2174-2177
- Zebrowska J., Horthyński J., Cholewa T., Honecz K. 2006. Resistance to *Verticillium dahliae* (Kleb.) in the strawberry breeding lines. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 71: 1031-6
- Zhang B., Yang Y., Chen T., Yu W., Liu T., Li H., Fan X., Ren Y., Shen D., and Liu L., Dou D., Chang Y. 2012. Island Cotton Gbve1 Gene Encoding A Receptor-Like Protein Confers Resistance to Both Defoliating and Non-Defoliating Isolates of *Verticillium dahliae*. *PloS One*, 7:e51091
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051091>
- Zhang Y., Wang X., Yang S., Chi J., Zhang G., Ma Z. 2011. Cloning and characterization of a *Verticillium* wilt resistance gene from *Gossypium barbadense* and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 30: 2085-2096
- Zhang Z. 2013. Functional analysis of tomato immune receptor Ve1 and recognition of *Verticillium* effector Ave1. Doktorska disertacija. Wageningen, Wageningen University: 191 str.
- Zhang Z., Wood W.I. 2003. A profile hidden Markov model for signal peptides generated by HMMER. *Bioinformatics*, 19: 307-308
- Zhang Z., Esse H.P., van Damme M., Fradin E.F., Liu C.-M., Thomma B.P.H.J. 2013a. Ve1-mediated resistance against *Verticillium* does not involve a hypersensitive response in *Arabidopsis*. *Molecular plant pathology*, 14: 719-27
- Zhang Z., Fradin E., de Jonge R., van Esse H.P., Smit P., Liu C.-M., Thomma B.P.H.J. 2013b. Optimized agroinfiltration and virus-induced gene silencing to study Ve1-mediated *Verticillium* resistance in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26: 182-190
- Zhou T., Wang Y., Chen J.Q., Araki H., Jing Z., Jiang K., Shen J., Tian D. 2004. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Molecular Genetics & Genomics*, 271: 402-415
- Zipfel C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, 12: 414-420
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G. 2006. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*, 125: 749-760
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G., Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428: 764-767

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Jerneju Jakšetu se zahvaljujem za ideje, debate in spodbude tako pri eksperimentalnem delu, kot tudi pri pisanju člankov in pričujočega dela.

Hvala sodelavcem na Katedri za genetiko za ustvarjanje dobrega delovnega vzdušja v vseh štirih letih eksperimentiranja.

Hvala komisiji za oceno in zagovor za kakovostno, hitro in zanesljivo dajanje pripomb k nastajajoči doktorski nalogi.

Matevžu se zahvaljujem za lektoriranje

Staršema Borisu in Branki ter bratu Roku sem hvaležen za nesebično podporo in potrpljenje tekom dolgotrajnega šolanja.

Juliji se zahvaljujem za vztrajnost in strpnost, še posebej v zadnjem letu, ko me je pestila stalna časovna stiska. Hvala tudi za vesplošno spodbujanje k delu.

PRILOGA A

Pripravljeni pari ZO za pomnoževanje 34 hmeljnih EST-RGA zaporedij. Za vsak par ZO sta prikazani skupna dolžina izvirnega EST in predvidena dolžina pomnožka v PCR. Slednja ne upošteva dolžine predvidenih intronov v pomnožku. Podčrtani ZO so bili uporabljeni za pridobivanje NZ za določanje polimorfizmov iz posameznih amplikonov.

EST-RGA	Imena zač. olig.	Nukleotidno zaporedje zač. olig. v smeri 5' proti 3'	Skupna dolžina NZ izvirnega EST	Predvidena dolžina PCR amplikona
HL54	<u>HL54-218FOR</u>	AGGAATAACCGATGCAGGTG	771 bp	409 bp
	HL54-626REV	CCCACATACCATATCCCCTTG		
HL191	<u>HL191-35FOR</u>	ACCAATGTTCTGCAAAGCTG	244 bp	195 bp
	HL191-229REV	TTTTCTCTTATTTTCATTCCTG		
HL250	HL250-7FOR	GATTGCTCCAGCTCTGCTAA	560 bp	542 bp
	HL250-548REV	AATTCAAATAAGTTTGCCAAGG		
HL428	HL428-230FOR	CCGAACCCATGTCTGAAAAT	967 bp	387 bp
	HL428-616REV	CGGCTGTGGTGGATAAGTGT		
HL643	HL643-182FOR	GAGAAAATCTGAAAGTAGCAACAA	1153 bp	496 bp
	HL643-677REV	GCTATCAGTACCGGACTTTGG		
HL931	<u>HL931-73FOR</u>	CCCAAACCACTCAACTAGGC	752 bp	641 bp
	HL931-713REV	GTACCTCCCTAGCCCTTTGC		
HL1273	<u>HL1273-128FOR</u>	GGCAATGGTAACCCACCTAA	751 bp	300 bp
	HL1273-427REV	AGAAGATGCCCCAGCAGAT		
HL1599*	HL1599-157FOR	GGCCATCGTCAGATTCAGAT	855 bp	596 bp
	HL1599-752REV	AAACCCAGTTAGCTGCCATA		
HL1641	<u>HL1641-15FOR</u>	CCGGGAGGGTTCTCCATA	494 bp	400 bp
	HL1641-414REV	CTCCAAACTCGGAAACAAGTA		
HL2479	HL2479-103FOR	TGGACAGTGCTGATGGTGAG	701 bp	408 bp
	HL2479-675REV	CAAATTCCCCTTCGGTTG		
HL2861	HL2861-2FOR	TCCCTACTGTGGTTTTATCCTTG	756 bp	659 bp
	HL2861-660REV	AGGAGGAGGGCTTCTACGTG		
HL3061	HL3061-118FOR	GCTTCCAACCTCCACGATCTC	712 bp	524 bp
	HL3061-641REV	GCATTGCAGCCACATAAAAT		
HL3080	HL3080-53FOR	ATGTTTCATGGCTTGGTGTA	771 bp	659 bp
	HL3080-711REV	ATCCGCATAAGAAACGGTTG		
HL4443	HL4443-7FOR	TTGACAACTTGGTGAGCTTG	1013 bp	231 bp
	HL4443-237REV	AAATTGTTTTATTCTTGCAAA		
HL5290	<u>HL5290-14FOR</u>	GCCCAATACCCAAAACGATA	405 bp	375 bp
	HL5290-388REV	CGGTCTTAGAATCCCCTCATC		
HL5408	HL5408-247FOR	GCCCCAATAACTCTGGACCT	498 bp	234 bp
	HL5408-480REV	GGACCATTCATCCTCAATG		
HL5623	HL5623-7FOR	AAATAAGATCTCGGCCCAAAA	728 bp	542 bp
	<u>HL5623-548REV</u>	ACCGGAGTCATTCTCAGTG		
HL5637	HL5637-3FOR	CTGTTCTAAGCCGGATGGAG	856 bp	804 bp
	HL5637-806REV	CGACCTTCTTGAGTGCCCTT		
HL5894	HL5894-31FOR	GGTCAATCGGAAACCTTGAG	559 bp	296 bp
	HL5894-326REV	CTTGTGTGCTCTTTCGTGGA		
HL5980	<u>HL5980-6FOR^a</u>	GCCGGGGAACACTACCAAT	766 bp	411 bp
	HL5980-416REV	TCGGGACATTGATGATCCTT		
HL6041	HL6041-336FOR	GGTTGATTTTGTTATTTGGCTTG	820 bp	389 bp
	HL6041-724REV	GTTTGCAAGCTTCCCCAAT		

Se nadaljuje

Nadaljevanje

EST-RGA	Imena zač. olig.	Nukleotidno zaporedje zač. olig. v smeri 5' proti 3'	Skupna dolžina NZ izvornega EST	Predvidena dolžina PCR amplikona
HL6293	HL6293-15FOR HL6293-760REV	GATTCATCAAGAGGGCCAGA GCCTTGACCTACCTTGAAGC	783 bp	746 bp
HL6298	HL6298-491FOR HL6298-719REV	TGGTCTTTGTTATGCATTTTCTG AATTTTCTCTTTGCCGGAGT	794 bp	229 bp
HL6437*	HL6437-14FOR HL6437-384REV	TTGCACGGTTGCACCATC AAGAGGTCAATTGGGGTGTG	693 bp	371 bp
HL7050	HL7050-191FOR <u>HL7050-760REV</u>	AGGTCTACCGGAGCTTGGAT TCTGATGGAGGTCAAGACGA	763 bp	570 bp
HL7319	<u>HL7319-72FOR</u> HL7319-671REV	CAGTAACAGTCACACAACAGCA TGTCGATAACCCATCCAGAA	716 bp	600 bp
HL7418	<u>HL7418-164FOR</u> HL7418-734REV	GGAGTCATGTGCCCTTGTTT TACAAGTCCCGCATCTGTCA	746 bp	571 bp
HL8570	HL8570-6FOR <u>HL8570-599REV</u>	TTGAGCAATCTGTCGAGCTT TCACAGTCCAACCATCAATCA	685 bp	594 bp
HL8710	HL8710-540FOR <u>HL8710-643REV</u>	GGCTTGAAAGGGTCTATCAGTG CCTAACCCATCTGGTAAAGTGC	737 bp	104 bp
HL9060	HL9060-13FOR HL9060-474REV	TCCTCTGTTTCTTGTCACCTGC GGGCTTTGACTTTGCTTTCC	588 bp	462 bp
HL9140*	HL9140-89FOR HL9140-486REV	TCATCATCGTCGTCTTCTCG TTGTGGAAATGAAAACCAGCTA	804 bp	398 bp
HL9399	<u>HL9399-13FOR</u> HL9399-654REV	CGGACTCGTTCGGAGAGTTT TCCATTACAATTCGCTTTACG	684 bp	642 bp
HL9550	HL9550-652FOR <u>HL9550-884REV</u>	GATGTGAACGAGGAGGTGGT GGCAGTGACTCCAAAAGATTAGA	1024 bp	233 bp
HL9840*	HL9840-173FOR HL9840-572REV	TCCTTATATGGGTTGCGATTTT GGGATAGAGCCAGAGAAACCA	585 bp	400 bp

*Brez pomnožitve v PCR

PRILOGA B

Nukleotidno zaporedje hmeljnega EST-RGA HL5290 skupne dolžine 162 bp. Zaporedje je prekratko za vključitev v bazo GenBank.

```
>HL5290
CTGTGCGGCCCAATTCCAGCTGGCTCGCCGTTTGACCACCTTGAAGCGTCGTCGTTTACTTACAATGCTTGTT
TATGTGGAAAGCCTCTAAAAGCATGTTAAATTTGGTAATAGTAGATATAATAGATAATTATAAAAAAAAAATAT
ATGTTTTTTTTTTTTT
```