

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sara JAVORNIK CREGEEN

**DIFERENCIALNO IZRAŽANJE GENOV HMELJA PO OKUŽBI Z
GLIVO *Verticillium albo-atrum***

DIPLOMSKO DELO

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ

**DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN HOP AFTER INFECTION
WITH *Verticillium albo-atrum***

GRADUATION THESIS

UNIVERSITY STUDIES

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete ter na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za biologijo je 13. 5. 2009 za mentorja imenovala doc. dr. Jerneja Jakšeta in 14. 4. 2010 odobrila temo diplomskega dela.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marjana Regvar, recenzentka
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Jernej Jakše, mentor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

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

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sara Javornik Cregeen

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 632.4:582.28:633.791 (043.2) = 163.6
KG analiza diferencialnega izražanja genov, BLAST, cDNA-AFLP, določanje nukleotidnega zaporedja, GeneSnare, hmeljeva uvelost, *Verticillium albo-atrum*
AV JAVORNIK CREGEEN, Sara
SA JAKŠE, Jernej
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN DIFERENCIALNO IZRAŽANJE GENOV HMELJA PO OKUŽBI Z GLIVO *Verticillium albo-atrum*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XVII, 91 str., 11 pregl., 15 sl., 2 pril., 62 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Leta 1997 je bil v Sloveniji prvič zabeležen izbruh letalne oblike hmeljeve uvelosti, ki jo povzročajo glive iz rodu *Verticillium* in je resno ogrozil pridelavo hmelja. Namen raziskave je bil analizirati in karakterizirati gene, ki se diferencialno izrazijo po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum* in preučiti interakcije med gostiteljem in patogenom na ravni transkriptoma. Za raziskavo sta bili izbrani dve sorti hmelja, in sicer občutljiva sorta Celeia ter odporna sorta Wye Target. Mlade rastline hmelja smo okužili z visoko virulentnim izolatom T2 glive *V. albo-atrum*. Okužene in kontrolne rastline smo nato gojili v rastni komori do izolacije RNA. Iz rastlin smo RNA izolirali v treh časovnih točkah (10, 20 in 30) dni po okužbi in sintetizirali cDNA, ki je predstavljala matrico za nadaljnje analize. Z uporabo 1) klasične metode cDNA-AFLP (s *Pst*I-*Mse*I kombinacijami restrikcijskih encimov in začetnih oligonukleotidov z 2–3 selektivnimi bazami) in 2) komercialne metode GeneSnare (z ACP tehnologijo začetnih oligonukleotidov) smo poskušali pridobiti čim večje število diferencialno izraženih fragmentov, ki smo jih reamplificirali, klonirali in jim določili nukleotidno zaporedje. Skupaj smo izvedli 1.030 reakcij za določanje nukleotidnega zaporedja in določili 380.818 bp DNA zaporedij. S programom CodoneCode Aligner smo zaporedja uredili in 554 zaporedij uspešno združili v 121 sosek, ostalo pa je 96 enkratnih zaporedij. Vsem zaporedjem smo podobnost z že znanimi proteini ali DNA zaporedji določili s pomočjo programskega paketa BLAST. Med edinstvenimi zaporedji smo identificirali sedem kandidatnih genov, katerim moramo obrambno vlogo potrditi še s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR). V raziskavi smo uspešno potrdili diferencialno izražanje genov med okuženo in neokuženo rastlino, ter različno izražanje v različnih časovnih točkah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 632.4:582.28:633.791 (043.2) = 163.6
CX analysis of diferential gene expression, BLAST, cDNA-AFLP, GeneSnare, Hop wilt, sequencing, *Verticillium albo-atrum*
AU JAVORNIK CREGEEN, Sara
AA JAKŠE, Jernej
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
PY 2010
TI DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN HOP AFTER INFECTION WITH
Verticillium albo-atrum
DT Graduation thesis (University studies)
NO XVII, 91 p., 11 tab., 15 fig., 2 ann., 62 ref.
LA en
AL sl/en
AB *Verticillium* hop wilt became a serious problem in Slovenian hop production after a lethal *Verticillium* wilt outbreak detected in 1997. The purpose of this study was to analyze and characterize genes expressed during *Verticillium* wilt infection of hop plants and the interaction between plant and pathogen at the transcriptome level. Two hop cultivars were chosen for this experiment, tolerant cultivar 'Wye Target' and susceptible cultivar 'Celeia'. Young hop plants were inoculated with a single spore culture of a highly virulent isolate T2 of *Verticillium albo-atrum* and then grown in a growth chamber. Plant stem tissue was collected from infected and control plants 10, 20 and 30 days after inoculation. Total RNA was isolated and cDNA synthesized, which provided a template for 1) classical AFLP technique using *Pst*I-*Mse*I restriction enzyme combinations and primers with 2-3 selective nucleotides and 2) commercial GeneSnare technique using ACP primer technology. Polymorphic cDNA-AFLP fragments were reamplified, cloned and sequenced. A total of 1,030 sequencing reactions were carried out, producing a total length of 380.818 bp of DNA. Sequences were assembled using the CodoneCode Aligner programme, resulting in 554 sequences assembled into 121 contigs and 96 singletons remained. DNA sequences were searched against public and local protein and DNA databases using BLAST search algorithm. Simple annotations of significant hits were made. We showed that these two approaches can be used to study differentially expressed genes in hop plants infected with *Verticillium albo-atrum*. We confirmed differential gene expression between infected and control plants, as well as differential expression at different points of times after infection. Seven candidate sequences showing similarities to genes known to be responsible for plant-pathogen interactions will be further analyzed using qRT-PCR.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	iii
Key words documentation	iv
Kazalo vsebine.....	v
Kazalo preglednic	ix
Kazalo slik	xi
Seznam prilog	xiii
Okrajšave in simboli.....	xiv
Slovarček	xvii
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HMELJ (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	3
2.1.1 Taksonomija in razširjenost.....	3
2.1.2 Botanični opis hmelja	3
2.1.3 Komercialna uporaba in žlahtnjenje hmelja	4
2.2 GLIVA <i>Verticillium spp.</i>	6
2.2.1 Taksonomija, razširjenost in gostiteljske rastline.....	6
2.2.2 Morfologija glive	7
2.2.3 Razvojni krog glive.....	8
2.2.4 Mehanizem patogenosti	9
2.2.5 Fiziološka specializacija: pojav različno virulentnih sevov, patotipov.....	9
2.2.5.1 Mehanizmi nastanka novih patotipov	10
2.2.6 Sistematičen nadzor, širjenje bolezni in higienski ukrepi	11
2.3 BOLEZENSKA ZNAMENJA	11
2.3.1 Splošno.....	11
2.3.2 Interakcija rastlina–patogen	12
2.3.3 Interakcija rastlina–<i>Verticillium sp.</i>.....	14

2.3.3.1	<i>Ve</i> gen.....	15
2.3.4	Hmeljeva uvelost	15
2.3.4.1	Blaga oblika.....	17
2.3.4.2	Letalna oblika.....	17
2.4	METODE ZA ANALIZO DIFERENCIALNEGA IZRAŽANJA GENOV..	18
2.4.1	cDNA-AFLP – metoda za analizo diferencialnega izražanja genov	18
2.4.1.1	Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP)	19
2.4.1.2	Raziskave interakcije rastlina–patogen z uporabo cDNA-AFLP.....	20
2.4.2	GeneSnare – metoda za analizo diferencialnega izražanja	22
3	MATERIAL IN METODE	24
3.1	RASTLINSKI MATERIAL.....	24
3.2	OKUŽEVANJE.....	24
3.3	REIZOLACIJA	25
3.4	cDNA-AFLP	26
3.4.1	Izolacija celokupne RNA	26
3.4.2	Določevanje koncentracije RNA	26
3.4.3	Izolacija mRNA iz celokupne RNA	27
3.4.4	Sinteza cDNA	28
3.4.5	Določanje koncentracije cDNA	29
3.4.6	Pomnoževanje cDNA-AFLP fragmentov	29
3.4.6.1	Restriksijski razrez fragmentov cDNA in ligacija adapterjev	29
3.4.6.1.1	Priprava dvoverižnih adapterjev PstI in MseI.....	29
3.4.6.1.2	Restrikcija in ligacija adapterjev.....	30
3.4.6.2	Reakcija predamplifikacije.....	31
3.4.6.3	Selektivna amplifikacija.....	32
3.4.7	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza s fluorescentno detekcijo	33
3.4.8	Denaturacijska poliakrilamidna sekvenčna elektroforeza in barvanje s srebrom	34
3.4.9	Izolacija in reamplifikacija diferencialno izraženih cDNA-AFLP fragmentov	36
3.4.10	Agarozna elektroforeza in čiščenje cDNA-AFLP fragmentov	36

3.4.11	Kloniranje cDNA-AFLP fragmentov	37
3.4.12	Pomnoževanje plazmidne DNA v verižni reakciji s polimerazo	38
3.4.13	Določanje nukleotidnega zaporedja kloniranim cDNA-AFLP fragmentom	39
3.4.13.1	Neposredno čiščenje produktov verižne reakcije s polimerazo	39
3.4.13.2	Določanje nukleotidnega zaporedja kloniranim, pomnoženim cDNA-AFLP fragmentom	39
3.4.13.3	Čiščenje produktov reakcije določanja nukleotidnega zaporedja	40
3.5	GeneSnare: METODA ZA DIFERENCIALNI PRIKAZ.....	41
3.5.1	Izolacija RNA.....	41
3.5.2	Določanje koncentracije RNA.....	42
3.5.3	Sinteza cDNA in pomnoževanje fragmentov cDNA.....	43
3.5.3.1	Sinteza prve verige cDNA v reakciji z reverzno transkriptazo	43
3.5.3.2	Pomnoževanje fragmentov cDNA v verižni reakciji s polimerazo.....	43
3.5.4	Agarozna elektroforeza, kloniranje fragmentov cDNA in določanje nukleotidnega zaporedja.....	44
3.6	OBDELAVA REZULTATOV IN ISKANJE PODOBNOSTI V PODATKOVNIH BAZAH	44
3.6.1	Obdelava rezultatov določanja nukleotidnega zaporedja	44
3.6.2	Iskanje podobnosti v podatkovnih bazah.....	45
4	REZULTATI.....	47
4.1	POMNOŽEVANJE IN IZOLACIJA DIFERENCIALNO IZRAŽENIH FRAGMENTOV	47
4.1.1	cDNA-AFLP.....	47
4.1.2	GeneSnare	50
4.2	OBDELAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ IN ISKANJE PODOBNOSTI V PODATKOVNIH BAZAH	52
4.2.1	cDNA-AFLP.....	52
4.2.2	GeneSnare	63
4.3	PRIMERJAVA USPEŠNOSTI METOD cDNA-AFLP IN GeneSnare	76
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	78
6	POVZETEK.....	83

7 VIRI	87
---------------------	-----------

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam vzorcev, uporabljenih v analizi diferencialnega izražanja genov hmelja po okužbi z glivo <i>Verticillium albo-atrum</i> .	25
Preglednica 2: Analiza cDNA-AFLP: uporabljene kombinacije začetnih oligonukleotidov <i>Pst</i> I (P+) s tremi selektivnimi bazami in <i>Mse</i> I (M+) z dvema ali tremi selektivnimi bazami. Znak (+) prikazuje uspešno pomnožitev in ločitev na elektroforezi, znak (-) pa neuspešno pomnožitev ali slab elektroforetski profil.	48
Preglednica 3: cDNA-AFLP: število izbranih diferencialno izraženih fragmentov (DIF), uspešno reamplificiranih fragmentov in skupno število reakcij določevanja nukleotidnega zaporedja (četrti stolpec) na kombinacijo začetnih oligonukleotidov.	49
Preglednica 4: GeneSnare analiza: število določenih in izoliranih diferencialno izraženih fragmentov (DIF), število analiziranih belih bakterijskih kolonij, katerim smo namnožili kloniran DNA fragment v PCR reakciji (BK/fragment) in skupno število reakcij določevanja nukleotidnega zaporedja (število sekvenčnih rkc) na kombinacijo začetnih oligonukleotidov.	51
Preglednica 5: Primerjalna analiza pomembnih zadetkov primerjave cDNA-AFLP fragmentov v treh podatkovnih bazah (S-Prot, TrEMBL in »nr«), opravljena z algoritmom BLASTX. Prikazana je dolžina našega zaporedja v baznih parih, dolžina proteinskega zadetka (s številom aminokislin -AA), vrednost E, odstotek ujemanja in podobnost z znanimi oz. predvidenimi proteini.	55
Preglednica 6: cDNA-AFLP zaporedja, ki kažejo podobnost s proteini z možno funkcijo povezano z obrambo rastlin v stresnih pogojih. Prikazano je tudi, iz katerega vzorca je bilo zaporedje izolirano.	62
Preglednica 7: Prikaz zadetkov BLASTN cDNA-AFLP zaporedij v lokalni bazi EST hmelja.	62
Preglednica 8: Primerjalna analiza pomembnih zadetkov primerjave GeneSnare fragmentov v treh podatkovnih bazah (S-Prot, TrEMBL in "nr"), opravljena z algoritmom BLASTX. Prikazana je dolžina našega zaporedja v baznih parih, dolžina proteinskega zadetka (s številom aminokislin -AA), vrednost E, odstotek ujemanja in podobnost z znanimi oz. predvidenimi proteini.	66
Preglednica 9: GeneSnare zaporedja, ki kažejo podobnost s proteini z možno funkcijo povezano z obrambo rastlin v stresnih pogojih. Prikazano je tudi, iz katerega vzorca je bilo zaporedje izolirano.	73

Preglednica 10: Prikaz zadetkov BLASTN GeneSnare zaporedij v lokalni bazi EST hmelja, iz katerega je razvidno, da kar 46,4 % zaporedij res izvira iz hmelja in da so prepisana v mRNA in ne posledica morebitnih kontaminacij z genomsko DNA. 74

Preglednica 11: Prikaz zadetkov BLASTN GeneSnare zaporedij z zaporedji *Verticillium spp.* v bazi EST («est_others») in zadetka BLASTX v podatkovni bazi »nr«. 75

KAZALO SLIK

Slika 1: Levo: Zrelo žensko socvetje – storžek. Desno: Hmeljne trte v nasadu. (Foto: S. Radišek, 2008).....	4
Slika 2: Konidiofor glive <i>Verticillium albo-atrum</i> (400-kratna povečava). (Foto: T. Svetek, 2010).....	6
Slika 3: Levo: Mikrosklerocij glive <i>Verticillium dahliae</i> (200-kratna povečava). Desno: Trajni micelij glive <i>Verticillium albo-atrum</i> (200-kratna povečava). (Foto: T. Svetek, 2010).....	8
Slika 4: Kronološki pregled širjenja letalne oblike hmeljeve uvelosti v Sloveniji. (Vir: S. Radišek, 2006).....	16
Slika 5: Simptomi hmeljeve uvelosti. A: Rjavenje ksilema. B: Venenje lista. C: Odmrtje celotne rastline. (Foto: S. Radišek, 2009).....	17
Slika 6: Struktura ACP začetnega oligonukleotida (vir: http://www.seegene.co.kr/en/service/acp.php).	22
Slika 7: Kontrolne (levo) in okužene (desno) rastline sorte Celeia v rastni komori. (Foto: S. Radišek, 2010).....	25
Slika 8: Izolirana RNA hmelja – vidita se dva dobro ločena pasova, ki predstavljata 28S in 18S ribosomske RNA.	42
Slika 9: Slika prikazuje pomnožene cDNA-AFLP fragmente, ločene na vertikalni denaturacijski sekvenčni poliakrilamidni elektroforezi. A: Prikaz pomnoženih fragmentov na 8 vzorcih s kombinacijo začetnih oligonukleotidov P-ACA in M-CG: sorti Celeia (C) in Wye Target (W), okužena (+) in neokužena (-), deset (1) oz. dvajset (2) dni po okužbi z glivo. Ob strani je dolžinski standard z lestvico velikosti 10 bp. B: Povečan izsek pomnoženih cDNA-AFLP fragmentov s kombinacijo P-AGA in M-CTG dolžine 100-250 bp. Puščice kažejo na diferencialno izražene cDNA-AFLP fragmente.....	48
Slika 10: Slika 1,2% agaroznega gela vzorcev hmelja po pomnožitvi z začetnima oligonukleotidoma dT-ACP in ACP8 ter prikaz diferencialno izraženih fragmentov (DIF, označeni s puščicami).....	50
Slika 11: Prikaz plazmidov namnoženih v verižni reakciji s polimerazo in ločenih na 1,4% agaroznem gelu. Ob strani je dolžinski standard lestvice 100 bp. A: plazmid, ki vsebuje DIF. B: prazen plazmid (brez vstavljenega DNA fragmenta, pomnoži se samo del vektorske DNA).....	52
Slika 12: Primer kromatograma uspešno določenega nukleotidnega zaporedja fragmenta 1-1_T7 dobljenega s poljubnim začetnim oligonukleotidom ACP1. Zaporedje je bilo	

določeno z začetnim oligonukleotidom T7, na sliki pa je prikazano zaporedje od 1 do 446 bp od celotne dolžine 719 bp..... 63

Slika 13: Primer kromatograma istega zaporedja DNA kot na Sliki 11, kjer nukleotidno zaporedje ni bilo uspešno določeno. Prikazano je zaporedje 1-1_SP6, ki je komplementarno zaporedju 1-1_T7, vendar pa je reakcija določanja nukleotidnega zaporedja v primeru začetnega oligonukleotida SP6 potekala s strani, kjer DIF vsebuje poli-T zaporedje, ki onemogoča uspešno izvedbo sekvenčne reakcije. Homopolimerne regije so znane kot zelo težavne pri določanju nukleotidnega zaporedja. 64

Slika 14: Primerjava analize dolžin (v bp) pomembnih zadetkov med cDNA-AFLP in GeneSnare zaporedji. Na okvirju z ročaji so predstavljene minimalne in maksimalne vrednosti (cDNA-AFLP – 61 in 357 bp ter GeneSnare – 167 in 1342 bp), prvi in tretji kvartil (cDNA-AFLP – 120 in 233,5 bp ter GeneSnare – 374 in 524,4 bp) ter mediana vrednost (cDNA-AFLP – 175 bp in GeneSnare – 507,5 bp). Povprečni vrednosti za oba seta podatkov sta 182,0 bp (cDNA-AFLP) in 524,4 bp (GeneSnare). 76

Slika 15: Primerjava uspešnosti iskanja podobnosti z znanimi proteinskimi oz. nukleotidnimi zaporedji s pomočjo algoritma BLASTX oz. BLASTN v treh podatkovnih bazah proteinov (S-Prot, TrEMBL in »nr«) in lokalni bazi EST hmelja. 77

SEZNAM PRILOG

Priloga A: Seznam 133 edinstvenih cDNA-AFLP zaporedij in podatek o tem, iz katerega vzorca izvirajo.

Priloga B: Seznam 84 edinstvenih GeneSnare zaporedij in podatek o tem, iz katerega vzorca izvirajo.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
ACP	angl. Annealing Control Primer
AMV-RT	reverzna transkriptaza virusa ptičje mieloblastoze (angl. Avian myeloblastic virus reverse transcriptase)
AVR geni	geni, ki kodirajo avirulentne proteine patogenov (angl. Avirulence genes)
BLAST	angl. Basic Local Alignment Tool
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumin)
cDNA	komplementarna DNA (angl. Complementary DNA)
CY5	cianinski tip barvila
DD	diferencialni prikaz (angl. Differential Display)
DIF	diferencialno izraženi fragmenti
dNTP	deoksi nukleotid trifosfat
dT-ACP	ACP sidrni poli-T začetni oligonukleotid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EST	oznake izraženih zaporedij (angl. Expressed sequence tags)
EtBr	etidijev bromid
ETI	imunost, ki jo izzove efektor (angl. effector-triggered immunity)
ETS	občutljivost, ki jo izzove efektor (angl. effector-triggered susceptibility)
HR	preobčutljivostni odgovor celic (angl. hypersensitive response)
IHPS	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
IPTG	izopropil tiogalaktozid
KCl	kalijev klorid
LB	Luria-Bertanijev medij
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
NCBI	Nacionalni center za biotehnoške informacije

NBS-LRR	nukleotidno vezavno mesto s ponavljajočim se levcinskim delom (angl. nucleotide binding site-leucine rich repeat)
MAS	selekcija s pomočjo markerjev (angl. Marker Assisted Selection)
MgCl ₂	magnezijev diklorid
MgSO ₄	magnezijev sulfat
MMLV-RT	angl. Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mRNA	sporočilna RNA (angl. Messenger RNA)
PAL	fenilalanin amonijeva liaza (angl. phenylalanin ammonia-lyase)
PAMP	molekularni vzorci, povezani s patogeni (angl. pathogen-associated molecular patterns)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
PG1	patotip glive <i>Verticillium albo-atrum</i> , ki povzroča blago obliko obolenja
PG2	patotip glive <i>Verticillium albo-atrum</i> , ki povzroča letalno obliko obolenja
PR proteini	proteini, povezani s patogenezo (angl. PR – pathogeneses related proteins)
PRR	receptorji za prepoznavo vzorca okužbe (angl. pattern recognition receptors)
PTI	imunost, ki jo izzove PAMP (angl. PAMP-triggered immunity)
R geni	geni za odpornost (angl. Resistance genes)
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNA (angl. Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
RDA	analiza značilnih razlik (angl. representational difference analysis)
RT	reverzna transkriptaza
SAGE	zaporedna analiza izražanja genov (angl. serial analysis of gene expression)
SA-PMP	magnetni delci, prevlečeni s streptavidinom (angl. Streptavidin-Paramagnetic Particles)
SAR	sistemska pridobljena imunost (angl. Systemic Acquired Resistance)

S-Prot	lokalno zgrajena podatkovna baza z ročno anotiranimi in preverjenimi rastlinskimi proteinskimi zaporedji UniProtKB/Swiss-Prot
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	tris-boratni-EDTA elektroforetski pufer
TE	tris-EDTA pufer
TrEMBL	lokalno zgrajena podatkovna baza z avtomatsko anotiranimi in nepreverjenimi rastlinskimi proteinskimi zaporedji UniProtKB/TrEMBL
UTR	neprevedljiva regija (angl. untranslated region)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil galaktozid
2-ME	2-merkaptoetanol

SLOVARČEK

Netoleranca	Odziv rastline na okužbo s patogenom pri katerem je kolonizacija prevodnega sistema obsežna in so bolezenski znaki intenzivno izraženi.
Odpornost	Odziv rastline na okužbo s patogenom, pri katerem pride do zelo nizke stopnje kolonizacije glive, bolezenski znaki se ne izrazijo.
Patogenost	Sposobnost mikrobne vrste, da na gostitelju izzove bolezensko stanje.
Virulentnost	Stopnja patogenosti seva mikrobne vrste, odvisna tudi od odpornosti gostitelja.
Toleranca	Odziv rastline na okužbo s patogenom, pri katerem je kolonizacija prevodnega sistema sicer obsežna, a ne pride do izražanja bolezenskih znakov.

1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) se v Sloveniji prideluje že več kot sto let in je pomemben kmetijski pridelek, namenjen predvsem izvozu. Rastlina je dvodomna trajna ovijalka, ki se okoli opore ovija s pomočjo stebelnih trihomov. Kmetijsko najbolj pomemben del hmeljne rastline so ženska socvetja sestavljena iz 40 do 60 posameznih cvetov, nanizanih na zbitem, cikcakastem osrednjem vretenu. Zrelo socvetje, ki ga imenujemo storžek, ima povečane predliste in ovršne liste ter podaljšano osrednje vretence. V pivovarstvu komercialno vrednost hmelja predstavljajo lupulinske žleze ženskih storžkov, ki vsebujejo aktivne aromatične snovi hmelja (hmeljne kisline oz. smole, eterična olja in polifenolne spojine – tanine). Te snovi dajejo pivu značilno grenkobo, ga konzervirajo in mu dajejo hmeljno aromo in okus (Jakše, 2003).

Talni glivi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn sta traheomikotični glivi, ki rastlino okužita preko koreninskega sistema in se naselita v ksilemu žilnega sistema. Imata zelo obsežen nabor gostiteljskih rastlin (predvsem dvokaličnic) – okoli 410 različnih vrst iz 80 rodov (Qin in sod., 2006). Razširjeni sta po vsem svetu, predvsem v zmernih in subtropskih območjih. *V. dahliae* se običajno pojavlja v toplejših območjih kot *V. albo-atrum*. Od kmetijsko pomembnih rastlin *V. albo-atrum* parazitira predvsem hmelj, lucerno, krompir, kumare in paradižnik, medtem ko ima *V. dahliae* nekoliko širši spekter gostiteljev, in sicer ogroža artičoke, jajčevce, paprike, krompir, paradižnik, vinsko trto, oljke, jagode, sončnice, bombaž in nekatere lesne vrste. Glivi razlikujemo na podlagi tvorbe trajnih organov, ki jima omogočajo preživetje v tleh tudi po več let in se večinoma tvorijo ob neugodnih razmerah. *V. dahliae* tvori temno rjave do črne mikrosklerocije, *V. albo-atrum* pa temno rjav do črn trajni micelij (Radišek, 2001). Razvojni krog gliv razdelimo na tri faze: dormantno, parazitsko in saprofitsko. Faze prehajajo od klitja trajnih organov in okužbe rastline (dormantna) ter razmnoževanja v rastlini (parazitska) do ponovne tvorbe trajnih organov in prezimovanja v tleh (saprofitska) (Fradin in Thomma, 2006).

Hmeljeva uvelost, ki jo povzročajo glive iz rodu *Verticillium*, je ena najpomembnejših bolezni hmelja. Bolezen se na hmelju pojavlja v dveh oblikah, blagi in letalni. Pojav različnih oblik bolezni je odvisen od več dejavnikov, med katerimi so najpomembnejši ekološke razmere rastišča, občutljivost kultivarja in virulenca patogena. Splošna bolezenska znamenja zajemajo akropetalno venenje in rumenenje listov, pojav klorotičnega in nekrotičnega tkiva na listih, značilno vihanje listnih robov navzgor in rjavenje prevajalnega tkiva (Neve, 1991). Bolezen se je – v blagi obliki – v Sloveniji prvič pojavila leta 1974 in ni povzročila večje gospodarske škode. Pojav blage oblike bolezni je posledica okužbe občutljivih sort z manj virulentnimi patotipi ali okužbe odpornih sort z bolj virulentnimi patotipi. Leta 1997 je bil v Savinjski dolini prvič zabeležen izbruh letalne oblike te bolezni, ki je resno ogrozil pridelek hmelja, predvsem zaradi gostote hmeljevih

nasadov na mestu izbruha in prevlade občutljivih sort. Letalna oblika bolezni kot posledica okužbe občutljivih sort z bolj virulentnimi patotipi pa poleg že omenjenih bolezenskih znakov lahko povzroči odmrtnje celotne rastline (Radišek, 2004). Kakšna bolezenska znamenja se bodo pojavila po okužbi z glivo, je v veliki meri odvisno od interakcije med glivo in gostiteljsko rastlino. Tako med bolezenska znamenja uvrščamo tudi različne obrambne reakcije gostiteljske rastline na patogene.

Ker je hmelj trajnica, lahko okužba celotnega nasada z letalno obliko bolezni resno omeji pridelavo. Do slej so glavni omejevalni ukrepi proti širjenju bolezni kolobar in fitosanitarni ukrepi, saj učinkovitih kemičnih sredstev za zatiranje glive ni. Najučinkovitejša bi sicer bila uporaba odpornih sort hmelja, vendar se tu pojavi splošna težava v samem postopku žlahtnjenja, ki je zelo dolgotrajen. Z uporabo molekularnih markerjev in tehnik lahko bolj natančno preučimo sam odnos med glivo in rastlino, predvsem pa primerjalno preučimo odziv odporne in neodporne sorte na okužbo z glivo (Radišek, 2004).

Glavni namen diplomske naloge je bolj natančno raziskati interakcijo med letalno obliko patogene glive *Verticillium albo-atrum* in njeno gostiteljsko rastlino – hmeljem. Gliva sicer parazitira veliko rastlin, predvsem dvokaličnice. Način okužbe, molekularni mehanizmi patogenosti glive in sama interakcija med glivo in njenim gostiteljem so slabo raziskana področja, čeprav gliva parazitira kmetijsko zelo pomembne rastline, res pa ji v zadnjem času raziskovalne skupine – predvsem na kmetijsko pomembnih področjih – posvečajo vse več pozornosti. V raziskavi smo želeli analizirati in okarakterizirati gene, ki se diferencialno izrazijo po okužbi s patogeno glivo *Verticillium albo-atrum* in preučiti interakcije med gostiteljem in patogenom na ravni transkriptoma. Analizirali smo diferencialno izražanje genov v dveh sortah hmelja, in sicer pri občutljivi sorti Celeia in odporni sorti Wye Target, ki sta bili okuženi z visoko virulentnim izolatom T2 glive *V. albo-atrum* (patotip PV1; genotip PG2), ki povzroča letalno obliko uvelosti. RNA iz rastlin (okužena in kontrolna obravnavanja) smo izolirali v treh časovnih točkah, 10, 20 in 30 dni po okužbi. Poskušali smo pridobiti čim večje število diferencialno izraženih fragmentov (z dvema različnima pristopoma analize RNA, s tehnikama cDNA-AFLP in GeneSnare), ki smo jim nadalje določili nukleotidno zaporedje in podobnost z že znanimi proteini s pomočjo programskega paketa BLAST.

V raziskavi smo predpostavili, da bomo opazili:

- 1) Različno izražanje genov:
 - a. v odporni in neodporni sorti
 - b. med okuženo in kontrolno rastlino
 - c. na različnih časovnih točkah
- 2) Izražanje genov povezanih z odzivom rastlin na patogene

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJ (*Humulus lupulus* L.)

2.1.1 Taksonomija in razširjenost

V rod *Humulus* uvrščamo tri vrste hmelja: *H. lupulus* L., *H. japonicus* Sieb. et Zucc. in *H. yunnanensis* Small. Skupaj z rodом *Cannabis* spada rod *Humulus* v družino konopljevok (*Cannabaceae*), skupaj z družino koprivovok (*Utricaceae*) pa sestavljata red *Utricales*. Divji hmelj, *H. lupulus* je avtohton na večjem delu severne poloble, od približno 35 ° do 70 ° geografske zemljepisne širine. *H. japonicus* je razširjen na območju Kitajske in Japonske. O vrsti *H. yunnanensis* je znano zelo malo, pojavljal pa naj bi se na višjih nadmorskih višinah v južnem predelu Kitajske (Neve, 1991).

Ker so hmeljne rastline dvodomne in je zato možnost samooprašitve izjemno majhna, je genetska raznolikost hmelja zelo velika. Tako je tudi morfološka raznolikost med rastlinami, ki jih najdemo na različnih delih sveta, zelo velika. Zato je bila predlagana razdelitev vrste v pet varietet; evropski hmelj je poznan kot *H. lupulus* var. *lupulus*, hmelj iz Japonske oz. azijski hmelj kot *H. lupulus* var. *cordiflorus*, ameriški hmelj pa naj bi pripadal trem varietetam, in sicer *H. lupulus* var. *neomexicanus*, *H. lupulus* var. *pubescens* in *H. lupulus* var. *lupuloides*. Varietete se med seboj razlikujejo po morfoloških znakih, kot sta število listnih krp in dlakavost trte. Izvor divjega hmelja naj bi bila Kitajska, od koder se je razširil drugod po severni polobli (Neve, 1991). Raziskava molekularne filogenije divjega hmelja je pokazala, da sta se evropska in azijsko-severnoameriška skupina divjega hmelja razdelili pred približno 1,2 milijoni let in da je azijsko-severnoameriška skupina v primerjavi z evropsko genetsko veliko bolj raznolika (Murakami in sod., 2006).

2.1.2 Botanični opis hmelja

Hmelj je dvodomna trajna ovijalka, ki za ovijanje okoli opore ne razvije vitic, ampak se pritrjuje s pomočjo stebelnih trihomov. Iz korenike spomladi odžene nadzemni del rastline in se z ovijanjem vzpenja po opori v smeri urinega kazalca. Rastline lahko zrastejo tudi več kot 7 m v višino, komercialno jih gojijo v posebnih oporah – hmeljnih žičnicah (Slika 1, desno). Koreninski sistem odraslih rastlin zraste do 1,5 m v globino in se lahko razraste 2 do 3 m v vodoravni smeri. Korenine ne tvorijo poganjkov, vsako pomlad rastline poženejo iz poganjkov na podzemnem stebelu, ki tvori zgornji del korenike. Ker lahko spomladi nadzemni poganjki v velikem številu izrastejo iz podzemnega stebela, je v hmeljnem nasadu nujno potrebno njihovo redčenje. Listi se razvijejo paroma v vsakem nodiju in so nasprotno nameščeni. Listni rob je nazobčan, oblika pa od srčaste do 7-krpate, pri odraslih listih pa je najpogostejša 3- do 5-krpata (Čerenak, 2004).

Najbolj izrazite morfološke razlike med moško in žensko rastlino se pojavijo pri socvetjih. Hmelj je tujeprašna vetrocvetka. Moški cvetovi so združeni v grozdasta, racemozna socvetja, z rumenkasto zelenim cvetnim odevalom s petimi venčnimi listi. V petih ožlebljenih prašnikih se proizvedejo velike količine lahkega in suhega cvetnega prahu, ki ga raznaša veter. Žensko socvetje je sestavljeno iz 40 do 60 posameznih cvetov, nanizanih na zbitem cikcakastem osrednjem vretenu. V vsakem nodiju izrašča par ovršnih lističev ali braktej s parom predlistov ali brakteol, ki obdajata vsak cvet. Cvet je sestavljen iz neznatnega perigona čašaste oblike, ki delno obdaja plodnico, in pestiča z razmeroma majhno plodnico, kratkim vratom ter dvema dolgima in dlakavima brazdama. Zrelo socvetje, ki ga imenujemo ga storžek, ima povečane predliste in ovršne liste ter podaljšano osrednje vretence (Slika 1, levo). Oplojene cvetove prepoznamo po izrazitem izdolževanju predlistov in odebeljenim osrednjim vretencem (Ivančič, 2002).



Slika 1: **Levo:** Zrelo žensko socvetje – storžek. **Desno:** Hmeljne trte v nasadu. (Foto: S. Radišek, 2008)

2.1.3 Komercialna uporaba in žlahtnjenje hmelja

Prve omembe o uporabi hmelja pri varjenju piva najdemo že v finskem narodnem epu Kalevala, ki naj bi bil star okoli 3000 let, zapisan pa je bil šele v 19. stoletju. Podatki o gojenju hmelja se prvič pojavijo v zapisih iz 8. stoletja, a ni popolnoma jasno za kaj so ga uporabljali (Neve, 1991).

Hmelj se danes uporablja predvsem v pivovarstvu, vendar postaja v zadnjem času pomemben tudi v farmacevtski industriji. Komercialno vrednost hmelja predstavljajo lupulinske žleze ženskih storžkov, ki vsebujejo aktivne aromatične snovi hmelja. Te so hmeljne kisline oz. smole, eterična olja in polifenolne spojine – tanini. Hmeljne kisline oz. smole delimo na mehke in trde smole. Za pivovarje so pomembne le mehke smole, ki vsebujejo α -kisline kot glavni izvor grenkobe v pivu, in β -kisline, ki pa so manj pomembne. Vsebnost α -kisljin je zelo pomembna lastnost pri vzgoji hmeljnih kultivarjev. Eterična olja dajejo pivu značilen vonj in okus, delimo pa jih v tri glavne skupine: terpene, oksigenirane derivate in spojine, ki vsebujejo žveplo. Te snovi so za pivovarstvo različno

pomembne. Zadnja skupina aktivnih snovi v storžkih so polifenolne snovi. Med varjenjem se vežejo z beljakovinami in jih oborijo ter tako pozitivno vplivajo na okus piva, stabilizirajo grenčico ter povečajo stabilnost piva in pene. Aktivne aromatične snovi hmelja torej dajejo pivu značilno grenkobo, ga konzervirajo in mu dajejo hmeljno aromo in okus (Jakše, 2003).

V katerem obdobju je bil hmelj prvič udomačen, ni natančno znano, vemo pa, da ima žlahtnjenje hmelja relativno dolgo tradicijo. Ta se je začela s klonskim selekcioniranjem divjega hmelja iz katerega so nastale stare sorte hmelja, kot so Fuggle, Goldings, Saazer in druge. Tako so nastale tipične evropske sorte (aromatične sorte), za katere je značilna nizka vsebnost hmeljnih smol in majhen pridelek v primerjavi z nekaterimi visoko produktivnimi hibridi. Nasprotno pa je za ameriške sorte, kot je na primer Cluster (križanec med kultivirano evropsko sorto in divjim ameriškim hmeljem), značilna visoka vsebnost hmeljnih smol, zato take sorte imenujejo »grenki hmelj«. Nadaljnje sorte so žlahtnitelji pridobili s križanjem. Tako je bila omogočena izbira želenih lastnosti, kot je vsebnost snovi, ki dajejo pivu aromo ali grenčico, ali odpornost na bolezni in škodljivce (Štajner in sod., 2008).

O gojenju hmelja na področju Slovenije naj bi obstajala poročila že iz 12. stoletja, zagotovo pa so ga pridelovali od okoli 1160 naprej, vendar je postal komercialno zanimiv šele po letu 1870 (Neve, 1991). Hmelj je v Sloveniji pomemben kmetijski pridelek, ki je večinoma namenjen izvozu. Središče pridelave hmelja v Sloveniji je Savinjska dolina, kjer danes na približno 1.500 ha hmeljišč pridelujejo pretežno slovenske sorte. Vse so bile požlahtnjene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu pod vodstvom dr. Dragice Kralj. Več kot 60 % obdelovalnih površin zaseda sorta Aurora, sledijo ji Savinjski Golding (15 %), Bobek (10 %), Celeia (5 %) in druge. Regionalno žlahtnjenje hmelja je izredno pomembno zaradi prilagoditve sorte na specifične rastne razmere, uvedba tujih kultivarjev v nove rastne razmere pa je pogosto neuspešna. Sedanji žlahtniteljski program je usmerjen k razvoju sort z višjo vsebnostjo α -kislina ter odpornostjo na povzročitelje glivičnih bolezni (*Verticillium* spp., *Pseudoperonospora humuli*) in škodljivce (hmeljna uš). Težava pri žlahtnjenju je njegova dolgotrajnost, zato se klasično žlahtnjenje vedno bolj dopolnjuje s sodobnimi molekulskimi pristopi, kot je na primer izdelava genskih kart za identifikacijo markerjev, genov ali regij genoma za določeno lastnost. Vezani markerji se lahko uporabijo pri t.i. žlahtnjenju s pomočjo markerjev (angl. MAS, marker assisted selection), gene, izolirane s pomočjo pozicijskega kloniranja pa se uporablja pri morebitnih genskih transformacijah (Radišek in sod., 2007 in Pavlovič, 2009).

2.2 GLIVA *Verticillium spp.*

2.2.1 Taksonomija, razširjenost in gostiteljske rastline

Glive iz rodu *Verticillium* Nees 1816 taksonomsko uvrščamo v filogenetsko skupino zaprtotrošnic Ascomycota, razred Ascomycetes, podrazred Sordariomycetidae, red Hypocreales in družino Hypocreaceae. Rod naj bi predstavljal anamorfnu (nespolno) obliko rodu *Hypomyces* (Radišek, 2004; IndexFungorum, 2010).

Glive iz rodu *Verticillium* na podlagi morfoloških značilnosti uvrščamo v štiri sekcije: *Prostrata* (manj razviti konidiofori; predvsem saprofitske, nematopatogene in entomopatogene vrste), *Albo-erecta* (z zelo razvitimi konidiofori), *Verticillium* (oranžno rjava obarvanost micelija, le vrsta *V. tenerum*) in sekcijo *Nigrescentia*, ki vključuje predvsem fitopatogene vrste, za katere so značilni temno obarvani trajni organi. Najpomembnejši vrsti sta *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (Radišek, 2004).

V rodu *Verticillium* je veliko število vrst, ki se glede na življenjski cikel med seboj zelo razlikujejo. Veliko jih je parazitov s širokim spektrom gostiteljev (npr. rastline, žuželke, gliste, druge glive), lahko pa živijo tudi kot talni saprofiti. Ime rodu izvira iz vretenasto (lat. *verticillus* = vretenca) razvejanih konidioforov, kar je razvidno na Sliki 2. Med vrstami razlikujemo večinoma na podlagi morfologije trajnih organov, vendar lahko ta sposobnost v procesu laboratorijskega ohranjanja kultur izgine. Rod spada v skupino gliv pri katerih ne poznamo spolnih oblik (anamorfne glive). Vse to močno otežuje identifikacijo in določanje posameznih vrst, zato se kot orodje za identifikacijo vse pogosteje uporablja molekularne markerje (Radišek, 2004).



Slika 2: Konidiofor glive *Verticillium albo-atrum* (400-kratna povečava). (Foto: T. Svetek, 2010)

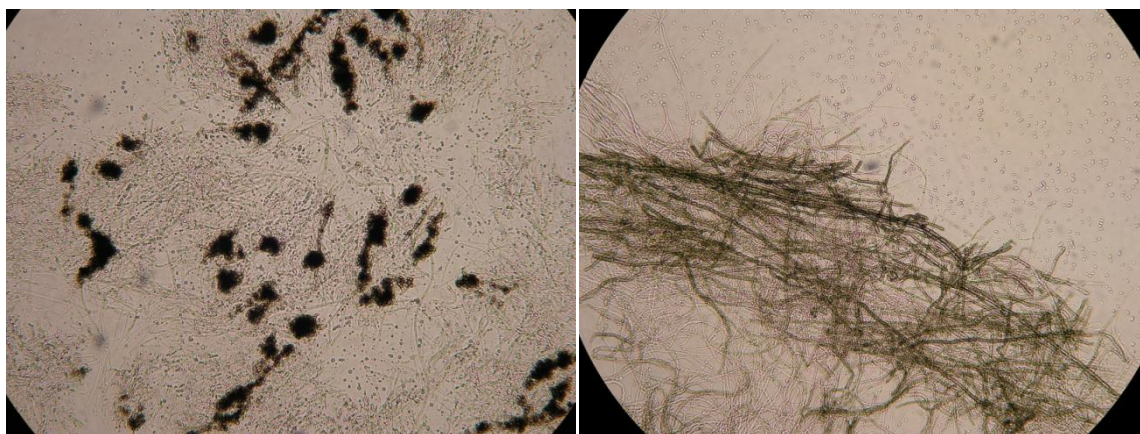
Barbara in Clews (2003) kot prave rastlinske patogene oz fitopatogene navajata šest vrst iz rodu *Verticillium*, *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* in *V. theobromae*. Le prvi dve sta gospodarsko pomembni, saj povzročata venenje in odmiranje

na širokem spektru kmetijsko pomembnih rastlin, ostale štiri pa le redko povzročijo bolezensko stanje. *V. albo-atrum* in *V. dahliae* sta talni, traheomikotični glivi, ki imata zelo velik nabor gostiteljskih rastlin (predvsem dvokaličnic) – okoli 410 različnih vrst iz 80 rodov (Qin in sod., 2006). Razširjeni sta po vsem svetu, predvsem v zmernih in subtropskih območjih. *V. dahliae* se običajno pojavlja v toplejših območjih kot *V. albo-atrum*. Glivi sicer v primerjavi z nekaterimi sorodnimi vrstami kot je *Fusarium oxysporum*, nimata visoke stopnje gostiteljske specializacije (Radišek, 2004), vendar le-ta obstaja pri nekaterih posameznih izolatih (Bhat in Subbarao, 1999). Enokaličnice veljajo za negostiteljske rastline, zato so uporabne pri izvajanju fitosanitarnih ukrepov v okuženih hmeljiščih.

V. albo-atrum od kmetijsko pomembnih rastlin parazitira predvsem hmelj, lucerno, krompir, kumare in paradižnik, *V. dahliae* pa ima nekoliko širši spekter gostitelje, v in sicer ogroža artičoke, jajčevce, paprike, krompir, paradižnik, vinsko trto, oljke, jagode, sončnice, bombaž in tudi nekatere lesne vrste. Tudi nekateri kmetijski pleveli kažejo bolezenska znamenja ali pa so le gostitelji in ne kažejo simptomov uvelosti (Fradin in Thomma, 2006).

2.2.2 Morfologija glive

Glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* so do nedavnega obravnavali kot eno vrsto, oz. so *V. dahliae* obravnavali kot varieteto *V. albo-atrum*, ki naj bi združevala predstavnike, ki tvorijo dve različni obliki trajnih organov. Ti trajni organi obema vrstama omogočajo preživetje v tleh tudi po več let in se večinoma tvorijo ob neugodnih razmerah. Največjo razliko med vrstama predstavlja prav tvorba različnih trajnih organov. *V. dahliae* tvori temno rjave do črne mikrosklerocije (Sliki 3, levo), ki nastanejo z nabrekanjem hif in septiranjem celic, ki se povečajo v sferično obliko in tvorijo lateralne celice. V celične stene in medcelični prostor se naloži melanin (Fradin in Thomma, 2006). *V. albo-atrum* pa tvori temno rjav do črn trajni micelij (Slika 3, desno), ki nastane z združevanjem melaniziranih nabreklih hif, širokih 3 do 7 μm (Radišek, 2001). Zanimivo je, da se pri laboratorijskem gojenju gliv lahko zgodi, da se trajni organi sploh ne tvorijo, kar vodi tudi v popolno izgubo sposobnosti tvorbe pigmenta. Takih oblik ni več mogoče določati le na podlagi morfoloških oblik, temveč so za določitev primerne le molekularne metode (Radišek, 2004).



Slika 3: **Levo:** Mikrosklerocij glive *Verticillium dahliae* (200-kratna povečava). **Desno:** Trajni micelij glive *Verticillium albo-atrum* (200-kratna povečava). (Foto: T. Svetek, 2010)

Micelij obeh gliv je bel in puhast, tvorijo ga hialine ali steklasto obarvane hife, na katerih se tvorijo vretenasti konidiofori s fialidami, na katerih se v sluzastih sferičnih glavica nahajajo konidiji ali trosi. Konidiofori *V. albo-atrum* so pogosto še dodatno razvejani in melanizirani pri osnovi. Nasprotno pa so konidiofori *V. dahliae* običajno krajši in manj razvejani ter ostanejo hialini. Konidiji so hialini ovalne do elipsoidne oblike, so enocelični in so lahko septirani (Fradin in Thomma, 2006; Radišek, 2001).

2.2.3 Razvojni krog glive

V. albo-atrum in *V. dahliae* sta talni glivi, ki rastlino okužita preko koreninskega sistema in nato prodreta v njen prevodni sistem. Sta nespolni obliki gliv, z razvojnim krogom, ki ga delimo na tri faze: dormantno, parazitsko in saprofitsko. Dormantno fazo običajno preživita na odmrlih rastlinskih ostankih gostiteljskih rastlin, v obliki trajnih organov. Ti trajni organi omogočajo preživetje v tleh do štiri leta pri *V. albo-atrum*, pri *V. dahliae* pa celo do 14 let ob upoštevanju odsotnosti gostiteljskih rastlin in specifičnih ekoloških dejavnikov. Glive preidejo iz dormantne v parazitsko fazo v začetku vegetacijske dobe, ko začnejo pod vplivom koreninskih eksudatov rastlin, kliti trajni organi. Penetracijske hife, ki izrastejo iz trajnih organov, prodrejo v rastlino skozi mlade korenine, ki še nimajo dobro razvitega endoderma, saj ta predstavlja največjo oviro pri prodoru v rastlino. Glivne hife preko epidermalne plasti prodrejo v endoderm in naprej preko pericikla v prevodni sistem. Če glivi ne uspe priti do prevodnega sistema, se okužba ne vzpostavi in gliva propade. Do okužbe lahko pride tudi preko poškodb, ki lahko nastanejo zaradi različnih škodljivcev v tleh, na primer ogrčice (Fradin in Thomma, 2006).

V prevodnem sistemu (ksilemu) začneta glivi tvoriti konidije, ki potujejo po rastlini navzgor s pomočjo transpiracijskega toka. Ko se ujamejo v nepopolne perforacije žil, konidiji vzklijejo in tvorijo micelij, ki s pomočjo hif in izločanjem hidrolitičnih encimov predre ovire in se razraste naprej po prevodnem sistemu. Poleg tega micelij tvori nove

konidije, ki s transpiracijskim tokom potujejo naprej po rastlini in infekcijski cikel ponovijo. Z začetkom nekroze tkiv in senescenco rastlin glivi vstopita v saprofitsko fazo, v kateri kolonizirata tudi druge dele rastline, ne le prevodnega tkiva. Začne se tvorba trajnih organov, mikrosklerocijev pri *V. dahliae* oz. trajnega micelija pri *V. albo-atrum*. Glivi tako prezimita v tleh in na odmrlih ostankih rastlin (Radišek, 2001).

2.2.4 Mehanizem patogenosti

Patogenost v terminološkem smislu pomeni sposobnost mikrobne vrste, da na gostitelju izzove bolezensko stanje. Drug izraz, ki se pojavlja v povezavi s povzročanjem bolezni s strani mikrobov, pa je virulenca, ki predstavlja stopnjo patogenosti seva mikrobne vrste in je odvisna tudi od odpornosti gostitelja (Slovensko mikrobiološko društvo, 2002).

O molekularnem mehanizmu in najpomembnejših komponentah patogenosti gliv iz rodu *Verticillium* do zdaj vemo zelo malo. V raziskavah se največ pozornosti posveča proizvodnji toksinov, elicitorjev in encimov za razgradnjo celične stene gostiteljske rastline. Med encimi za razgradnjo celične stene gostiteljske rastline igrajo najpomembnejšo vlogo pektinolitični encimi (npr. poligalakturonaza, pektat-liaza in pektinesteraza). Ti so pomembni, ker mora gliva pri prodoru v prevodni sistem razgraditi pektinske elemente žil, da se lahko uspešno razširi po prevodnem sistemu. Možno je, da ravno ti encimi povzročijo nekroze tkiva, ki so eden od bolezenskih znakov verticilijeve uvelosti (Fradin in Thomma, 2006). Carder in sod. (1987) so raziskovali *in vitro* tvorbo poligalakturonaze, pektat-liaze in celulaze hmeljnih izolatov *V. albo-atrum* in ugotovili, da obstaja korelacija med tvorbo teh encimov ter virulenco patotipa, vsebnostjo hmeljnega tkiva in vira ogljika v gojišču. Novejše proteomske raziskave patotipov *V. albo-atrum* (Mandelc in sod., 2009) in *V. dahliae* (El-Bebany in sod., 2010) kažejo, da so geni, ki prispevajo k virulentnosti in premagovanju obrambnih mehanizmov rastline, pri letalnem patotipu bolj izraženi kot pri neletalnem. Mandelc in sod. (2009) so ugotovili višjo raven izražanja proteinov, vključenih v tvorbo in regulacijo citoskeleta, peroksiredoksin- in askorbat-peroksidaze, ki hidrolizirata reaktivne kisikove spojine (obramba rastline), ter višjo stopnjo proteinov sinteze in energijskega metabolizma v letalnem patotipu glive *V. albo-atrum*.

2.2.5 Fiziološka specializacija: pojav različno virulentnih sevov, patotipov

Večina izolatov *Verticillium* spp. je sposobnih povzročiti uvelost na širokem spektru gostiteljskih rastlin, vendar so na splošno bolezenska znamenja bolj izrazita na primarnih gostiteljih. Kljub temu pa posamezni izolati kažejo določeno specifičnost pri izbiri gostitelja (Bhat in Subbarao, 1999).

Raziskava genetske raznolikosti in virulence med izolati *V. albo-atrum* Radiška in sod. (2006) je potrdila rezultate različnih predhodnih raziskav, da med obema fitopatogenima vrstama (*V. albo-atrum* in *V. dahliae*) obstaja velika genetska raznolikost ter da se izolati *V. albo-atrum* iz lucerne jasno ločijo od izolatov iz drugih gostiteljev. To potrjuje splošno priznana delitev izolatov *V. albo-atrum* v skupini L (izolati, ki prizadenejo lucerno) in NL (izolati iz drugih gostiteljev, ki ne prizadenejo lucerne). Genetska raznolikost znotraj NL skupine pa ni pokazala gostiteljsko specifične specializacije, pač pa so se izolati jasno ločili le glede na virulenco izolata, to je na povzročitelje blage oz. letalne oblike uvelosti.

Do izbruha letalne oblike hmeljeve uvelosti v Sloveniji leta 1997 je bil letalen patotip *V. albo-atrum* poznan le v Angliji. Zaradi velike gospodarske škode (uničenih je bilo približno 180 ha hmeljišč), ki jo je izbruh letalne oblike bolezni povzročil v Sloveniji, je bilo patogen potrebno proučiti. Radišek in sod. (2003) so z molekularnimi analizami in preizkušanjem virulentnosti hmeljnih izolatov *V. albo-atrum*, nabranih na vseh pomembnih hmeljiščih v Sloveniji, potrdili prisotnost dveh patotipov glive, ki so ju poimenovali PG1 (povzročča blago obliko bolezni) in PG2 (povzročča letalno obliko bolezni). Že v predhodni raziskavi je Radišek (2001) z umetnimi okužbami glavnih sort, ki se pridelujejo v Sloveniji, potrdil, da so vse sorte občutljive na tip PG2. Ob pojavu patotipa PG2 v Sloveniji se poraja tudi vprašanje o njegovem izvoru. Slovenski patotip PG2 izraža enako stopnjo virulence kot angleški letalni patotip PV1, zato je bilo mogoče sklepati, da se je slovenski patotip razvil iz angleškega s prenosom sadilnega materiala, a je analiza z AFLP molekularnimi markerji dala nasprotno rezultate, in sicer da se je PG2 razvil neodvisno. Razlaga za samostojen nastanek letalnega patotipa se skriva v samem časovnem poteku pojava hmeljeve uvelosti v Sloveniji (ki je, zanimivo, podoben poteku pojava bolezni v Angliji). Prvič se je bolezen, v blagi obliki, pojavila leta 1974, ko so bile gojene sorte na bolezen odporne. Več kot 30 let selekcijskega pritiska pa je sprožilo razvoj novega, letalnega patotipa glive, na katero nobena od danes gojenih slovenskih sort ni odporna.

2.2.5.1 Mehanizmi nastanka novih patotipov

Pri glivah kot sta *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, kjer spolni stadij še ni bil odkrit, lahko novi patotipi nastajajo z nesporno genetsko rekombinacijo, mutacijami, kot so delecije, insercije, inverzije, translokacije in večje spremembe med kromosomi. Večina izolatov *Verticillium spp.* je haploidnih, zato se zelo hitro izrazijo tudi recesivne mutacije. Nastanek novih genotipov je posledica selekcijskega pritiska v monokulturnih nasadih rastlin, saj je to pomemben način nastanka različno virulentnih patotipov. Eden od mehanizmov nastanka teh patotipov in njihove raznolikosti je paraseksualni cikel kot način nespodne genetske rekombinacije (Radišek, 2004). To je proces, kjer ob nastanku anastomoz (združitve dveh somatsko kompatibilnih hif z različnim komplementarnim genotipom) pride do migracije jeder in nastanka heterokariontskih celic, v katerih pride do združitve jeder in nastanka heterozigotnega diploidnega jedra. Taka jedra se normalno mitotično

delijo, pri čemer lahko pride do nepravilnosti in posledično do genskih rekombinacij. Z delitvami diploidnih jeder pride do procesa haploidizacije, saj jedra izgubljajo kromosome in se vračajo v haploidno obliko (Heale, 1988).

2.2.6 Sistematičen nadzor, širjenje bolezní in higienski ukrepi

Bolezen hmeljeve uvelosti je tako nevarna, ker se talni glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* lahko v tleh ohranita več let, poleg tega njun infekcijski potencial hitro narašča in počasi upada, zaradi česar se lahko hitro širita znotraj nasada in med njimi. Vir širjenja bolezní predstavljajo tako ostanki okuženih trt kot tudi prst in plevel v okolici okuženih rastlin. Bolezen se med hmeljišči lahko prenaša z nerazkuženim obdelovalnim materialom ali okuženo hmeljevino, pomemben vir okužbe pa lahko predstavlja tudi okužen sadilni material. Fitofarmaceutvska sredstva so pri odpravljanju hmeljeve uvelosti popolnoma neučinkovita. Edini učinkoviti ukrepi v primeru okužbe hmeljišča so fitosanitarni in higienski ukrepi (na primer uničevanje obolelih rastlin tako, da se rastline cele izkoplje in uniči s sežigom, razkuževanje strojne opreme in termična obdelava hmeljevine), prilagojen kolobar (tako znižamo infekcijski potencial v tleh s sajenjem negostiteljskih rastlin, na primer žit in trav) ter sajenje odpornih sort, kar je najuspešnejši ukrep v boju s povzročiteljicama hmeljeve uvelosti, vendar je težava v dolgotrajnosti postopka žlahtnjenja. Od izbruha leta 1997 smeri pri žlahtnjenju narekuje letalna oblika bolezní, saj nove sorte poleg drugih lastnosti zahtevajo tudi vključitev odpornosti na *Verticillium* (Radišek, 2006).

2.3 BOLEZENSKA ZNAMENJA

2.3.1 Splošno

Glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* imata zelo širok spekter gostiteljskih rastlin. Iz tega razloga je bolezenska znamenja težko natančno določiti, saj se lahko pri različnih gostiteljskih rastlinah v veliki meri razlikujejo. Čeprav se bolezen imenuje verticilijska uvelost, sama uvelost celotne rastline ni vedno simptom okužbe z glivo. Uvelost se sprva pokaže kot odmiranje polovice lista, običajno na starejših poganjkih, saj je glivna kolonizacija rastline akropetalna (od baze proti apeksu). Sčasoma ovne ves list, ki naposled odpade. Na listih se lahko pojavijo tudi kloroze in nekroze, predvsem na robovih in med žilami. K razvoju bolezenskih znamenj in pojavu simptomov lahko pomembno prispevajo tudi suša in drugo okoljski dejavniki, ki zmanjšajo vitalnost rastline. Enoletnice lahko preživijo sezono, vendar je pogosto nazadovanje v rasti, pojav kloroz in zmanjšan pridelek. Značilna je tudi rjava obarvanost prevodnega tkiva v prečnem prerezu stebela. Pogosto je okužbo z glivo *Verticillium* težko dokazati le na podlagi bolezenskih znamenj, saj so simptomi okužbe zelo podobni okužbi z glivami iz rodu *Fusarium* (Fradin in Thomma, 2006). Kakšna bolezenska znamenja se bodo pojavila po okužbi z glivo, je v

veliki meri odvisno od interakcije med glivo in gostiteljsko rastlino. Tako med bolezenska znamenja uvrščamo tudi različne obrambne reakcije gostiteljske rastline na patogen.

2.3.2 Interakcija rastlina–patogen

Na interakcijo med rastlinami in njihovimi patogeni lahko gledamo kot na oboroževalno tekmo v njihovi konvergentni evoluciji. Rastline poskušajo najti vedno nove načine, kako se izogniti napadu patogenih mikrobov, nasprotno pa fitopatogeni mikrobi razvijajo nove načine za uspešno kolonizacijo svojih gostiteljev. Rezultat posameznega boja je bodisi okužba rastline s patogenom bodisi preprečitev okužbe, torej razvoj odpornosti rastline.

Najbolj pogosta oblika odpornosti rastlin je tako imenovana ne-gostiteljska odpornost, ki jo ob okužbi z najrazličnejšimi patogeni izkazuje večina rastlin. Rastline za razliko od večine živali, ne morejo aktivno izbirati okolja, v katerem živijo, in se tudi ne morejo umakniti potencialnim patogenom, zato so bile primorane razviti mehanizme za obrambo pred širokim spektrom škodljivcev. Odpornost, ki jo opazimo pri vseh predstavnikih določene vrste ali celo širše taksonomske kategorije, na večino patogenov v okolju imenujemo ne-gostiteljska odpornost, patogene, ki niso sposobni povzročiti bolezenskega stanja taki skupini organizmov oz. ne-gostiteljskim rastlinam pa ne-gostiteljski patogeni. Ločimo tip I ne-gostiteljske odpornosti, pri katerem ni opaziti vidnih simptomov, in tip II ne-gostiteljske odpornosti, pri katerem rastlina ustavi širitev patogena s preobčutljivostnim odgovorom celic in lokalizirano celično smrtjo. Obstajajo podobnosti med ne-gostiteljsko in gostiteljsko odpornostjo, a še ni povsem jasno ali so za obe odpornosti odgovorni isti mehanizmi (Mysore in Ryu, 2004).

Rastline so razvile preobilje obrambnih mehanizmov za obrambo pred najrazličnejšimi patogeni. Te mehanizme lahko delimo na že obstoječe in izzvane. Prvi predstavljajo same gradbene lastnosti rastlinske celice, kjer sta prva obrambna linija kutikula in celična stena, ki ju rastlina ob okužbi običajno še dodatno okrepi. Celična stena ne predstavlja le fizične prepreke za vstop patogenov v celico, ampak tudi vir signalov, ki jih uporabljajo bodisi patogeni za vzpostavitev patogenosti bodisi rastline, ki lahko s pomočjo signalov s celične stene aktivirajo druge obrambne mehanizme. Poleg teh strukturnih preprek pa med že obstoječe mehanizme prištevamo še morfološke in kemične prepreke. Rastline običajno proizvajajo veliko število različnih sekundarnih metabolitov, kot so fenoli, saponini, terpenoidi in steroidi, poleg različnih mehanizmov že obstoječe obrambe pa je zelo pomembna tudi sposobnost rastlin, da ob okužbi aktivirajo svoj obrambni mehanizem. To pomeni aktivacijo energetske potratnih mehanizmov, ki so sposobni prepoznati posamezne patogene in lahko na podlagi te prepoznave sintetizirajo primerne antimikrobne snovi za obrambo rastline (Ferreira et al., 2007). Ti mehanizmi so npr. programirana celična smrt oz. tako imenovan preobčutljivostni odgovor celic (angl. hypersensitive response, HR), povečano izražanje obrambnih genov za sintezo obrambnih proteinov (angl. PR –

pathogeneses related proteins) in oksidativni izbruh (angl. oxidative burst) (Mysore in Ryu, 2004). Ti lokalni odzivi lahko vzpostavijo dolgotrajno sistemsko odpornost rastline (SAR – systemic acquired resistance), ki rastlino naredi odporno na širok spekter patogenov (McDowell in Woffenden, 2003). Še ena pomembna oblika izzvane obrambe je tvorba fitoaleksinov – kemično raznolike skupine sekundarnih metabolitov z močno antimikrobno aktivnostjo. Te snovi rastline sintetizirajo *de novo* in jih akumulirajo okoli mesta okužbe (Taiz in Zeiger, 2006).

V osnovi lahko rastlinski obrambni sistem delimo na dve stopnji. Prva je prepoznavna okužbe s pomočjo transmembranskih receptorjev, ki prepoznajo specifične vzorce okužbe (angl. PRR – pattern recognition receptors). Ti receptorji prepoznajo molekularne vzorce povezane s patogeni (angl. PAMPs – pathogen-associated molecular patterns). Druga stopnja je prepoznavna okužbe s pomočjo z receptorskih proteinov, (angl. NBS-LRR proteins – nucleotide binding site-leucine rich repeat), ki jih kodirajo *R* geni. Ti proteini prepoznajo efektorske molekule patogenov – virulentne faktorje ali avirulentne proteine. Obrambo rastline lahko povzamemo v štirih glavnih točkah:

1. Rastlina s pomočjo PRR prepozna specifične PAMP in sproži se imunost, ki jo izzove PAMP (angl. PTI – PAMP-triggered immunity). Nadaljnja kolonizacija patogena se lahko na tej stopnji ustavi.
2. Če mu kolonizacija uspe, patogen sprosti efektorske molekule, ki prispevajo k njegovi virulenci. Le-te lahko presežejo PTI in povzročijo občutljivost, ki jo izzove efektor (angl. ETS – effector-triggered susceptibility).
3. NBS-LRR proteini efektorsko molekulo »prepoznajo« in sprožijo imunost, ki jo izzove efektor (angl. ETI – effector-triggered immunity). To je pospešena in ojačena oblika PTI odziva, ki se izrazi kot odpornost rastline, običajno preko preobčutljivostnega odziva celic na mestu okužbe.
4. Patogen skozi naravno selekcijo razvije nove mehanizme (na primer sprememba gena za sintezo efektorske molekule ali sinteza popolnoma novih molekul), s katerimi prepreči ETI odziv. Rastlina mora tako prilagoditi svoje *R* gene in njihove produkte, da lahko ETI odziv ponovno vzpostavi (Jones in Dangl, 2006).

Efektorske molekule iz točke 2, ki jih patogen sprosti pri okužbi rastline, kodirajo *Avr* geni in jih imenujemo avirulentni proteini. Večina rastlin, preko *R* genov, kodira receptorje, ki se odzovejo na produkte *Avr* genov in na ta način lahko ustavijo okužbo. V primeru, da rastlina nima primernih *R* genov, se okužba ne ustavi in skupen učinek vseh avirulentnih proteinov se pokaže kot bolezensko stanje (McDowell in Woffenden, 2003).

Cilj patogenov, ko napadejo gostiteljsko rastlino, je vzpostaviti okužbo – kar pomeni, da morajo uspešno premagati vse obrambne mehanizme rastline in se namnožiti v sami rastlini, kjer morajo preživeti del ali ves življenjski cikel. Nasprotno pa je cilj rastlin, da

tako kolonizacijo preprečijo ali da vsaj do največje možne mere zmanjšajo škodo, ki jo lahko povzročijo patogeni toksini.

2.3.3 Interakcija rastlina–*Verticillium* sp.

Pri interakciji različnih rastlin s fitopatogenimi glivami iz rodu *Verticillium* so možne tri različne vrste odzivov rastlin na okužbo. V rastlinah, ki jih označimo kot odporne, pride do zelo nizke stopnje kolonizacije glive in se bolezenski znaki ne izrazijo. Nasprotno pa pri tolerantnih in netolerantnih rastlinah pride do obsežne kolonizacije prevodnega sistema, razlika med omenjenima skupinama rastlin pa je, da pri tolerantnih rastlinah ne pride do izražanja bolezenskih znakov, pri netolerantnih pa so le-ti izraziti (Robb, 2007). Odpornost zmanjšuje populacijo patogena, medtem ko tolerantnost le zmanjša izgubo fitnesa rastline brez zmanjšanja populacije patogena.

Izražanje bolezenskih znakov je v veliki meri odvisno od same interakcije med rastlino in patogenom. Z drugimi besedami je vprašanje, v kakšni meri se bolezenski znaki izrazijo, odvisno tako od odpornosti rastline kot od virulentnosti patogena. Odporne rastline ustavijo okužbo, še preden gliva prodre v prevodno tkivo. V tej, začetni fazi okužbe lahko metabolično aktivne epidermalne celice korenin okužbo zaustavijo z utrjevanjem celičnih sten z ligninom in podobnimi snovmi. Na ta način okoli penetracijskih hif nastanejo ligninski gomoljčki, v katerih izolirana hifa propade ali pa se njena rast upočasni, endodermalne celice – razen mlajših, ki reagirajo podobno kot epidermalne celice – pa imajo celično steno že normalno razvito in jo naravno utrjujejo z nalaganjem suberina in kaloz ter tako predstavljajo že obstoječo prepreko za vdor glive (Radišek, 2004).

Če gliva zaobide prvo obrambno linijo rastline in prodre v prevodni sistem, se začne naslednja faza okužbe in rast glive v rastlini s pomočjo konidijev, ki se širijo po prevodnem sistemu navzgor. Konidiji se ujamejo v slabo prepustnih lamelah med žilami in rastlina ima tako dovolj časa, da sproži obrambne mehanizme. Opazna je tvorba gelov, sestavljenih iz pektinskih in hemiceluloznih snovi, ki preprečijo vertikalno širjenje glive. Sosednje parenhimatske celice tvorijo balonom podobne izrastke oz. tile, ki dodatno zaprejo žile in preprečijo horizontalno penetracijo lamel s hifami (Robb, 2007). Posledica tvorbe til in gelov je delna ali popolna blokada žil, kar lahko zaustavi napredovanje glive, povzroči pa tudi motnje v transpiracijskem toku, ki jih rastlina reši s hiperplazijo. Na zunaj to opazimo kot nenormalno odebeljena stebela rastlin. Netolerantne rastline pogosto blokiranega prevodnega tkiva niso sposobne dovolj hitro nadomestiti, kar lahko vodi v propad rastline. Poleg tega je v teh rastlinah gliva zmožna zaustaviti tvorjenje suberina in se tako lahko širi v sosednje žile. Poleg tega lahko celo razgradi celične stene, ki so že bile okrepljene (Fradin in Thomma, 2006).

Okužene rastline, poleg histoloških reakcij inducirajo še mnoge biokemične reakcije, ki povzročijo pospešeno tvorjenje potencialno antimikrobnih snovi, kot so fitoaleksini, inhibitorji fitotoksinov in fenolne substance ter PR proteinov (Ferreira in sod., 2007). Razlika med proizvodnjo teh snovi pri tolerantnih in netolerantnih rastlinah je v količini proizvedenih snovi. Pomembni PR proteini so predvsem encimi za razgradnjo glivne celične stene (npr. glukanaze in hitinaze). Zelo pomemben encim pri obrambi rastlin, ki je še posebej izražen pri odpornih rastlinah, je fenilalanin-amonijeva-liaza (angl. PAL, phenylalanin ammonia-lyase), ki sodeluje pri sintezi lignina in suberina in je tudi ključni regulatorni encim za sintezo salicilne kisline ter vzpostavitev SAR (Fradin in Thomma, 2006).

Namen sproščanja antimikrobnih snovi in PR proteinov je inhibitorno delovanje na hidrolitične in proteolitične encime, ki jih proizvaja gliva, in s tem zaustavitev širjenja in delovanja le-te. Posledica delovanja teh snovi so različni bolezenski znaki, kot je na primer rjavenje ksilema.

2.3.3.1 *Ve* gen

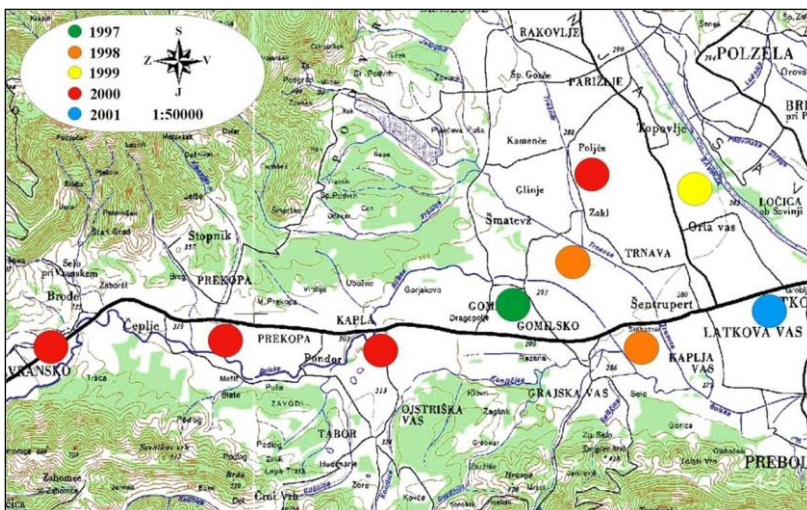
Poligenska odpornost na glive iz rodu *Verticillium* je bila do zdaj potrjena pri mnogih rastlinskih vrstah, kot so na primer lucerna, bombaž, krompir in jagode. Poleg tega so pri krompirju, sončnici in paradižniku potrdili dominantne gene za odpornost (Fradin in Thomma, 2006). V paradižniku so s pozicijskim kloniranjem uspeli okarakterizirati *Ve* gen, ki kodira odpornost na okužbo z *V. dahliae*. Na lokusu, ki se nahaja na kratkem kraku kromosoma 9, se nahajata dva tesno povezana gena, *Ve1* in *Ve2*. Oba gena kodirata proteine z zunajceličnim delom z visoko vsebnostjo levcina (angl. LRR, leucine-rich repeats) in znotrajceličnim motivom, ki ima vlogo pri receptorsko posredovani endocitozi in interakciji protein-protein (Kawchuk in sod., 2001). *Ve* lokus je vnesen v večino kultivarjev paradižnika, s pomočjo tega lokusa pa tudi poskušajo najti homologne sekvence v kultivarjih drugih kulturnih rastlin, ki izkazujejo vsaj delno toleranco. Izolati gliv *V. dahliae* in *V. albo-atrum*, na katere so rastline z *Ve* genom odporne, pripadajo rasi 1, ostali pa rasi 2 (Fradin in Thomma, 2006). Funkcijska analiza genov *Ve1* in *Ve2*, izoliranih iz odpornih in občutljivih sort paradižnika, je pokazala, da je za odpornost na glivo ključen samo gen *Ve1* in ne tudi *Ve2* (Fradin in sod., 2009).

2.3.4 Hmeljeva uvelost

Prvi pojav hmeljeve uvelosti kot posledice okužbe z glivo *V. albo-atrum* so zabeležili v Angliji leta 1924, nato se bolezen do leta 1930 ni več pojavila. Od tega leta naprej pa so se bolj resni izbruhi začeli pojavljati redno in se hitro širiti med hmeljišči. Opaženo je bilo, da se bolezen pojavlja v dveh oblikah, blagi (patotip M) in letalni (patotip PV1, PV2 in PV3).

Kasnejši izbruhi so bili vedno bolj letalni in izkazalo se je, da gre za virulentnejše patotipe glive, na katere takrat prevladujoči kultivar Fuggle ni bil odporen. Za ohranitev hmeljarske proizvodnje je bilo tako potrebno zamenjati občutljive kultivarje z odpornejšimi kakršni je na primer kultivar Wye Target, ki velja za enega najbolj odpornih in je bil zasajen na več kot 50 % hmeljarskih površin v Angliji. (Neve, 1991).

Dolgo je bil pojav letalne oblike hmeljeve uvelosti omejen le na Anglijo, v drugih hmeljarskih državah, kot so: Nemčija, Poljska, ZDA, Češka, Slovaška, Nova Zelandija, Belgija in Bolgarija pa se pojavlja le v blagi obliki. V Sloveniji se je v blagi obliki bolezen prvič pojavila leta 1974 in ni povzročila večje gospodarske škode. Več kot 30 let kasneje, leta 1997, pa je prišlo do prvega izbruha letalne oblike bolezni, in sicer na področju Gomilskega v Savinjski dolini. Bolezen se je hitro razširila in hmeljišča okužila ne glede na posajeno sorto hmelja. Do leta 1999 je bila omejena na območje Gomilskega, od leta 2000 naprej pa so se žarišča razširila tudi na ostala glavna območja hmeljarstva v Savinjski dolini (Radišek, 2004). Kronološki pregled širjenja letalne oblike bolezni in prizadeta območja so prikazana na Sliki 4.



Slika 4: Kronološki pregled širjenja letalne oblike hmeljeve uvelosti v Sloveniji. (Vir: S. Radišek, 2006)

Pojav različnih oblik bolezni je odvisen od več dejavnikov, med katerimi so najpomembnejši ekološke razmere rastišča, občutljivost kultivarja in virulenca patogena. Kot rečeno, se na hmelju pojavljata dve obliki obolenja, blaga in letalna. Patotipi glive *V. albo-atrum* lahko inducirajo obe obliki obolenja, medtem ko so patotipi *V. dahliae* večinoma povezani le z blago obliko bolezni. Splošna bolezenska znamenja zajemajo akropetalno venenje in rumenenje listov, pojav klorotičnega in nekrotičnega tkiva na listih ter značilno vihanje listnih robov navzgor. Taki listi običajno odpadejo že ob rahlem dotiku. Zelo značilno bolezensko znamenje je porjavelo prevajalno tkivo, ki ga opazimo ob prerezu trte, predvsem v spodnjem delu. Glavni simptomi hmeljeve uvelosti so prikazani

na Sliki 5. V splošnem je blaga oblika veliko bolj odvisna od okoljskih dejavnikov kot letalna (Neve, 1991).



Slika 5: Simptomi hmeljeve uvelosti. **A:** Rjavenje ksilema. **B:** Venenje lista. **C:** Odmrtje celotne rastline.
 (Foto: S. Radišek, 2009)

2.3.4.1 Blaga oblika

Bolezenska znamenja, značilna za blago obliko hmeljeve uvelosti, so posledica okužbe občutljivih sort z manj virulentnimi patotipi ali okužbe odpornih sort z bolj virulentnimi patotipi. Bolezenska znamenja se najprej pokažejo v juniju in se nadaljujejo skozi rastno sezono, vse do obiranja hmelja. Bolezen se običajno ne razširi na vse trte v nasadu, temveč prizadene le eno ali dve trti. Simptomi se pokažejo kot venenje spodnjih listov, ki se tekom rastne sezone širi proti vrhu rastline. Lateralni poganjki, ki izraščajo iz listnih pazduh prizadetih listov, običajno ostanejo neprizadeti. Značilno bolezensko znamenje blage oblike je nenormalno debeljenje trte, imenovano hiperplazija, s hrapavostjo in pokanjem skorje. Prečni prerez take trte razkrije nekrotično prevajalno tkivo, ki je proti zunanemu delu neprizadeto. Rastline, obolele za blago obliko hmeljeve uvelosti, praviloma ne odmrejo in naslednjo rastno sezono normalno odženejo (Radišek, 2006).

2.3.4.2 Letalna oblika

Okužba občutljivih sort z virulentnejšimi patotipi se izrazi kot letalna oblika hmeljeve uvelosti. Ta oblika okužbe se širi veliko hitreje od blage in prizadene vse trte v hmeljevem nasadu. Na prizadetih rastlinah se hitro pokažejo kloroze in nekroze tkiva, okužba pa prizadene tudi stranske poganjke, kar vodi v sušenje rastline z odpadanjem listov. Nekrotično prevajalno tkivo, ki ga opazimo ob prerezu stebela, zajema celotno tkivo. Rastline, ki so bile okužene konec prejšnjega vegetacijskega obdobja in so preživele kot korenika, v naslednji vegetacijski sezoni slabo odženejo in zelo hitro odmrejo. Na tistih

rastlinah, ki so pred okužbo že formirale storžke, se le-ti posušijo tako kot listi, a za razliko od njih ne odpadejo (Radišek, 2006).

2.4 METODE ZA ANALIZO DIFERENCIALNEGA IZRAŽANJA GENOV

Različnih molekularnih metod za izolacijo in analizo diferencialno izraženih genov v različnih celicah in pri spremenjenih pogojih je veliko. Sem spadajo metode kot so analiza značilnih razlik (angl. representational difference analysis, RDA), zaporedna analiza izražanja genov (angl. serial analysis of gene expression, SAGE), cDNA mikromreža (ang. cDNA microarray), diferencialni prikaz (angl. differential display, DD) ter mnoge druge (Xiao in sod., 2008). Večinoma temeljijo na selektivnem pomnoževanju komplementarne DNA (cDNA) z verižno reakcijo s polimerazo (ang. polymerase chain reaction, PCR), torej na analizi DNA fragmentov, prepisanih iz RNA (Liang in sod., 1994). Metoda diferencialnega prikaza iz leta 1992 temelji na pretvorbi mRNA v prvo verigo cDNA s pomočjo reverzne transkripcije in pomnoževanjem dobljene cDNA v verižni reakciji s polimerazo. Reverzno transkripcijo omogočijo oligo(dT)-sidrni začetni oligonukleotidi, ki se vežejo na poli-A rep mRNA in tako tvorijo začetek za sintezo prve verige cDNA. Tej reakciji sledi verižna reakcija s polimerazo za sintezo druge verige cDNA in pomnoževanje fragmentov, v kateri uporabimo kombinacijo sidrnega začetnega oligonukleotida s poljubnim začetnim oligonukleotidom (Lowe, 2000).

Čeprav se zgoraj navedene metode uporabljajo pogosto, imajo nekatere pomembne pomankljivosti, med drugim težave s ponovljivostjo ter prikazovanjem redkih in lažno pozitivnih zadetkov, ki niso preverljivi. Te težave so predvsem posledica uporabe naključnih začetnih oligonukleotidov v reakciji PCR in relativno nizke temperature prileganja, ki je potrebna za pomnoževanje zelenih produktov (Bachem in sod., 1998).

2.4.1 cDNA-AFLP – metoda za analizo diferencialnega izražanja genov

Da bi premostili te težave, so Bachem in sod. (1996) uporabili predhodno razvito metodo AFLP (polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov) za določanje polimorfizma genske DNA, kjer so namesto slednje kot matrico uporabili cDNA. Razvili so zanesljivo in robustno metodo iskanja prstnih odtisov RNA (angl. RNA fingerprinting), ki omogoča podrobno določanje lastnosti diferencialnega genskega izražanja v velikem številu bioloških procesov. Prednosti metode cDNA-AFLP pred ostalimi metodami iskanja prstnih odtisov RNA je predvsem velika ponovljivost in možnost sistematičnega pregledovanja skoraj vseh transkriptov celo z majhno koncentracijo začetnega materiala. Bachem in sod. (1996) so metodo preizkusili z analizo tvorbe gomoljev pri krompirju. Analizirali so izražanje dveh genov, za katera je znano, da se izražata pri tvorbi gomoljev, in pokazali, da so izraženi fragmenti, opaženi s cDNA-AFLP analizo, razkrili vzorec

izražanja, ki je zelo podoben tistemu pridobljenemu s klasičnimi metodami. Poleg tega so preučili tudi izražanje dveh homolognih genov, ki sta diferencialno izražena med tvorbo gomoljev. Metoda cDNA-AFLP je – tako kot klasična AFLP metoda – sestavljena iz petih korakov, ki so natančneje opisani v naslednjem poglavju.

2.4.1.1 Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP)

Metoda polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP, angl. amplified fragment length polymorphism) je bila razvita kot alternativa drugim metodam iskanja prstnih odtisov DNA (angl. DNA fingerprinting), saj so bile do tedaj razvite metode (npr. RAPD oz. naključno pomnožena polimorfna DNA) slabo ponovljive, zelo občutljive na reakcijske pogoje, kakovost vzorca DNA in temperaturne profile v reakciji PCR. Metoda AFLP temelji na odkrivanju selektivno namnoženih restrikcijskih fragmentov v reakciji PCR. Fragmenti so produkt razreza genomske DNA z restrikcijskimi endonukleazami, pomnožimo pa jih lahko brez predhodnega poznavanja zaporedja fragmenta, in sicer s pomočjo nabora splošnih začetnih oligonukleotidov, poleg tega lahko uporabimo DNA kateregakoli izvora. Število odkritih fragmentov lahko prilagajamo z izbiro začetnih oligonukleotidov in specifičnih restrikcijskih endonukleaz. Metoda je zelo zanesljiva in robustna zaradi strogih reakcijskih pogojev pri PCR, ki so pomembni za prileganje začetnih oligonukleotidov, in predstavlja kombinacijo klasičnih hibridizacijskih tehnik kot je polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in pomnoževanja DNA v PCR (Vos in sod., 1995).

Metodo AFLP lahko razdelimo na pet osnovnih korakov (Vuylsteke in sod., 2007):

1. Razrez genomske DNA z restrikcijskima endonukleazama (restrikcija): uporabimo dve restrikcijski endonukleazi, ki prepoznata sebi palindromično sekvenco ter tako ustvarita enoverižne (lepljive) konce. Uporabljeni encima se razlikujeta v pogostosti prepoznavne restrikcijske mesta. Eden reže DNA pogosteje in prepozna zaporedja štirih nukleotidov, drugi pa reže redkeje in prepozna zaporedja šestih ali več nukleotidov. Uporaba dveh encimov z različno pogostostjo rezanja omogoča večjo prožnost pri uravnavanju števila namnoženih fragmentov. Encim, ki reže pogosteje proizvede več manjših fragmentov, ki se dobro ločijo na denaturacijskem gelu. Drugi encim, ki reže redkeje, pa zmanjša število namnoženih fragmentov in s tem omogoča uravnavanje števila namnoženih fragmentov.
2. Ligacija adapterjev na restrikcijske fragmente: na lepljive konce restrikcijskih fragmentov ligiramo dvovertižne fragmente z lepljivim koncem. Adapterji so sestavljeni iz glavnega in encimsko-specifičnega nukleotidnega zaporedja, ki se ligira na lepljivi konec fragmenta, ne da bi pri tem vzpostavil restrikcijsko mesto. Na ta način adapterji pripravijo primerno tarčno mesto za začetne oligonukleotide, ki jih uporabimo v naslednjih korakih.

3. Predamplifikacija: prva reakcija PCR, v kateri pomnožujemo fragmente z ligiranimi adapterji. Uporabimo dva začetna oligonukleotida, ki imata začetno in encimsko–specifično zaporedje komplementarno nukleotidnemu zaporedju adapterjev. Začetna oligonukleotida sta lahko – posebej pri večjih genomih – na 3' koncu podaljšana za eno selektivno bazo. Tako lahko naredimo prvo selekcijo in zmanjšamo število namnoženih fragmentov.
4. Selektivna amplifikacija: zadnja reakcija PCR, v kateri z začetnimi oligonukleotidi, z enakim zaporedjem kot pri predamplifikaciji pomnožujemo fragmente iz prve reakcije PCR. Začetni oligonukleotidi se od tistih v predamplifikaciji razlikujejo po tem, da vsebujejo 1–3 selektivne nukleotide. Ti nukleotidi omogočajo selekcijo med restrikcijskimi fragmenti, nastalimi po razrezu DNA, saj se začetni oligonukleotidi priležejo le na restrikcijske fragmente, ki so komplementarni selektivnim nukleotidom.
5. Elektroforeza namnoženih fragmentov in vizualizacija fragmentov: Za detekcijo polimorfizmov je primerna poliakrilamidna denuracijska elektroforeza, saj omogoča dovolj dobro ločitev fragmentov in majhno možnost zakrivanja polimorfizmov, ki so si zelo blizu (Vos in sod., 1995). Za vizualizacijo fragmentov se najpogosteje uporablja radioaktivna vizualizacija, možni pa sta še fluorescentna vizualizacija in barvanje s srebrom.

2.4.1.2 Raziskave interakcije rastlina–patogen z uporabo cDNA-AFLP

Metoda cDNA-AFLP je bila doslej uspešno uporabljena v raziskavah mnogih interakcij med rastlino in njenim patogenom, saj občutljiva tehnologija omogoča natančno karakterizacijo genskega izražanja pri širokem spektru bioloških procesov, osredotoča se predvsem na razlike, zaznane na ravni transkriptoma. Predhodno znanje o tem, kateri geni bodo bodisi izraženi bodisi utišani, ni potrebno. Metoda omogoča vzporedno analizo izražanja vzorcev v časovnih točkah in pokaže spremembe na ravni izražana tako za redke kot pogoste fragmente cDNA.

Steiner in sod. (2009) so cDNA-AFLP uporabili za analizo diferencialnega izražanja genov pri okužbi pšenice s fitopatogeno glivo *Fusarium graminearum*. Poskušali so najti gene, ki sodelujejo pri odpornosti rastline na glivo, tako da so primerjali izražanje genov pri odporni in neodporni rastlini v šestih časovnih točkah po okužbi. Od 5.000 pregledanih izraženih fragmentih, so diferencialno izražanje opazili pri 164, pri 14 fragmentih pa so potrdili izražanje zaradi okužbe z glivo. Fragmentom so določili zaporedje in poiskali znana zaporedja v bazah ter tako potrdili izražanje proteinov, povezanih z obrambo rastline, ki bodo omogočili nadaljnje raziskave.

Wang in sod. (2009) so preučevali interakcijo med pšenico in drugo fitopatogeno glivo, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. S cDNA-AFLP so poskušali določiti gene, ki se izražajo

med okužbo pšenice z glivo, in ovrednotiti vzorce izražanja za nekatere regulirane gene s pomočjo PCR v realnem času. S 64 kombinacijami začetnih oligonukleotidov so dobili 54.912 izraženih fragmentov, med katerimi so diferencialno izražanje opazili pri 2.306 fragmentih, od tega je bilo 966 takih s povečano stopnjo izražanja, 1.340 pa z zmanjšano stopnjo izražanja. 208 fragmentom so določili nukleotidno zaporedje – od tega je bilo 186 uporabnih zaporedij, med katerimi je bilo 74 mogoče najti znano funkcijo v bazi GenBank. Z metodo cDNA-AFLP so uspeli določiti gene, ki kodirajo proteine s funkcijo pri obrambi rastline pred fitopatogeno glivo.

Pšenico ogroža še ena fitopatogena gliva, to je *Oculimacula acufiformis*. Kultivar Cappelle Despereux (CD) vsebuje zelo močen gen za odpornost – *Pch2I*, ki leži na dolgem kraku kromosoma 7A. Chapman in sod. (2008) so želeli s pomočjo analize cDNA-AFLP preučiti diferencialno izražanje genov med občutljivim kultivarjem Chinese Spring (CS) in linijo, ki vsebuje CS kromosomsko substitucijo, Cappelle Despereux 7A (CS/CD7A) z genom *Pch2*. Opazovali so inducirano in že obstoječe izražanje genov med okuženimi in neokuženimi rastlinami. Pregledali so okoli 4.700 cDNA-AFLP fragmentov, od katerih je bilo le 34 diferencialno izraženih med CS in CS/CD7A. Klonirali so 29 fragmentov in štirim uspeli določiti homologije z obrambnimi proteini.

Raziskave interakcije rastlina–patogen so bile opravljene tudi na drugih rastlinah. Eckey in sod. (2004) so se posvetili interakciji med ječmenom (*Hordeum vulgare* L.) in fitopatogeno glivo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*. S cDNA-AFLP so pregledali 16.500 fragmentov, od katerih je bilo 615 (3,7 %) diferencialno izraženih. Zaporedje so določili 120 diferencialno izraženim fragmentom, 28 od 29 analiziranim pa so s PCR v realnem času potrdili, da se inducirajo po okužbi. Večina izraženih fragmentov ni pokazala homologije z znanimi proteini, ostali pa so kazali homologijo s proteini, povezanimi s primarnim in sekundarnim metabolizmom, odzivom na patogene, redoks regulacijo in signalno transdukcijo.

Tudi Durrant in sod. (2000) so s pomočjo metode cDNA-AFLP preučevali interakcijo med rastlino in patogenom, in sicer odziv paradižnika na fitopatogeno glivo *Cladosporium fulvum*. Paradižnikov gen *Cf-9* vzpostavlja odpornost proti efektorjem, ki jih kodira glivin gen *Avr9*. V raziskavi so preučevali transkripte, katerih izražanje se zelo spremeni med *Avr9* in *Cf9*-posredovano obrambo, v kulturah celic tobaka. Od skupno 30.000 pregledanih fragmentov, je bilo 290 diferencialno izraženih.

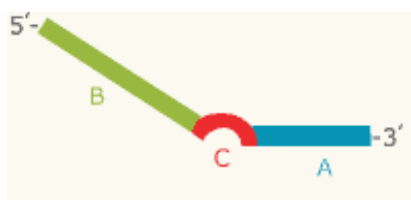
Kot je bilo že omenjeno, je metoda cDNA-AFLP uporabna za preučevanje diferencialnega izražanja genov v velikem številu različnih bioloških procesov. Hsu in sod. (2008) so na primer primerjali izražanje genov med cvetnimi popki divjega tipa *Phalenopsis* Hsiang Fei cv. H. F., ki ima bronasto obarvane cvetove, in somaklonsko različico, ki ima mozaično rumeno obarvane cvetove različnih oblik. Od 2.269 izraženih fragmentov, ki so jih dobili s

128 kombinacijami začetnih oligonukleotidov, jih je bilo 25 diferencialno izraženih med divjim tipom rastline in njenim somaklonom.

2.4.2 GeneSnare – metoda za analizo diferencialnega izražanja

GeneSnare je ena od komercialnih metod (tudi GeneFishing, Seegene) za diferencialni prikaz fragmentov cDNA, pridobljenih z reverzno transkripcijo iz mRNA, ki temelji na uporabi posebnih ACP (angl. Annealing Control Primer) začetnih oligonukleotidov, ki povečajo specifičnost prileganja na cDNA.

Ključni del komercialnega kompleta GeneSnare Differential Expression Kit (Sigma) so začetni oligonukleotidi ACP, ki so jih razvili v laboratoriju Seegene (Južna Koreja). Hwang in sod. (2003) so novi tip začetnih oligonukleotidov razvili z namenom povečanja specifičnosti prileganja in posledično pomnoževanja v verižni reakciji s polimerazo. Ti začetni oligonukleotidi imajo edinstveno tridelno strukturo s posebnim zaporedjem na 3' in 5' koncu, ki ju povezuje regulatorno zaporedje. Vsako zaporedje ima svojo specifično vlogo v dvostopenjskem pomnoževanju v verižni reakciji s polimerazo. Tridelna struktura je prikazana na Sliki 6. Osrednje zaporedje na 3' koncu (A) je tarčni del, ki je sestavljen iz zaporedja, ki se prileže na komplementarno mesto nukleinske kisline (odvisno od stopnje reakcije na mRNA oz. cDNA). 5' konec (B) pa predstavlja univerzalno zaporedje, katerega nespecifično prileganje onemogoča regulatorno (C) zaporedje – polideoksiinozinsko zaporedje. V reakcijah uporabljamo dva tipa začetnih oligonukleotidov ACP: 1) sidrni poli-T začetni oligonukleotid ACP (dT-ACP), ki ima za tarčno zaporedje oligodeoksitimin, in 2) poljubne začetne oligonukleotide ACP, ki imajo za tarčno zaporedje poljubnih 10 nukleotidov.



Slika 6: Struktura ACP začetnega oligonukleotida (vir: <http://www.seegene.co.kr/en/service/acp.php>).

Diferencialno izražene fragmente sintetiziramo in pomnožimo v treh korakih. Prvo verigo cDNA sintetiziramo iz celokupne RNA v reakciji z reverzno transkriptazo in uporabo začetnega oligonukleotida dT-ACP pri 42 °C. Oligo-dT zaporedje začetnega oligonukleotida dT-ACP je komplementarno poli-A regiji mRNA in s prileganjem na poli-A mesta celokupne RNA omogoča sintezo prve verige cDNA, ki je komplementarna mRNA. Reakcijski pogoji v tej reakciji so takšni, da ne spodbujajo prileganja regulatornega zaporedja. S tem je onemogočeno tudi prileganje univerzalnega zaporedja na 5' koncu, kar poveča specifičnost prileganja 3' konca začetnega oligonukleotida.

Sintetizirana prva veriga cDNA ima tako na svojem 5' koncu univerzalno zaporedje začetnega oligonukleotida dT-ACP.

Drugi korak je dvostopenjsko pomnoževanje cDNA v verižni reakciji s polimerazo. V reakciji uporabimo tako začetne oligonukleotide dT-ACP kot tudi poljubne začetne oligonukleotide ACP. V prvi stopnji sintetiziramo drugo verigo cDNA pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 50 °C. Temperaturni pogoji onemogočajo dodatno prileganje začetnih oligonukleotidov dT-ACP in omogočajo specifično sintezo druge verige cDNA, ki je komplementarna le tistim prvim verigam, ki že imajo začetni oligonukleotid dT-ACP iz prvega koraka. Tarčno zaporedje poljubnih začetnih oligonukleotidov ACP je sestavljeno iz poljubnih desetih nukleotidov, ki se naključno prilegajo na dele prve verige cDNA in tako omogočajo sintezo druge verige. Dobimo dvoverižno cDNA, ki ima na 3' koncu komplementarno univerzalno zaporedje začetnega oligonukleotida dT-ACP in na 5' koncu komplementarno univerzalno zaporedje poljubnega začetnega oligonukleotida ACP. Sledi 30 ciklov verižne reakcije s polimeraz, pri kateri je temperatura prileganja 65 °C. Ti pogoji omogočajo prileganje univerzalnih zaporedij obeh začetnih oligonukleotidov na že prisotna komplementarna zaporedja, kar omogoča pomnoževanje le tistih fragmentov cDNA, pri katerih je ujemanje začetnih oligonukleotidov popolno. Produkta pomnoževanja nato ločimo na 1,2 % agaroznem gelu in jih lahko izrežemo za nadaljnjo analizo.

Kim in sod. (2009) so z uporabo komercialnega kompleta GeneFishing, ki uporablja tehnologijo ACP (tako kot GeneSnare), uspešno izolirali 26 diferencialno izraženih genov v zgodnjih fazah razvoja semena soje.

Lee in sod. (2009) so z uporabo tehnologije ACP preučevali diferencialno izražanje genov, izzvano pod vplivom povečane slanosti, v listih ječmena. Uporabili so 120 različnih začetnih oligonukleotidov ACP in identificirali ter določili zaporedje 11 genov s povečano stopnjo izražanja.

Park in sod. (2006) so raziskovali gene za razvoj bodic na ovojnicah semen (botanično plodovih) korenja, za kar so uporabili tehnologijo ACP. Uspeli so pridobiti 11 oznak izraženih zaporedij (angl. expressed sequence tags, EST) za kloniranje in določanje zaporedja diferencialno izraženih genov med divjim tipom korenja in mutantom s plodovi brez bodic. Sedem fragmentov cDNA je izražalo podobnost že znanim genom iz drugih rastlin, štirje pa niso kazali statistično značilne podobnosti z znanimi geni.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V analizo smo vključili dve sorti hmelja, in sicer odporno sorto Wye Target, ki je bila žlahtnjena v Angliji, in občutljivo sorto Celeia, žlahtnjeno v Sloveniji. Rastline smo pridobili v sortimentu IHPS (Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije) in jih 1 leto pred izvedbo poskusa vegetativno razmnožili v rastlinjaku, da so razvile dovolj obsežen koreninski sistem.

3.2 OKUŽEVANJE

Za okuževanje smo uporabili visoko virulenten izolat T2 glive *V. albo-atrum* (patotip PV1; genotip PG2), ki povzroča letalno obliko bolezni.

Inokulum smo pripravili s 6-dnevnim gojenjem kultur izolata v tekočem gojišču (General fungal medium; Weising in sod., 1995) na rotacijskem stresalniku (50 obr./min) pri sobni temperaturi in v temi. Spore smo nato s filtracijo ločili od biomase in v sterilni destilirani vodi umerili na koncentracijo 5×10^6 konidijev/ml inokuluma. Rastline smo pred inokulacijo odstranili iz lončkov in jim s sterilno destilirano vodo oprali koreninski sistem, čemur je sledilo 10 minutno namakanje korenin v inokulumu. Kontrolne rastline smo inokulirali na enak način s sterilno bidestilirano vodo.

Po inokulaciji smo rastline posadili v 4 l lonce ter jih vzgajali na opori z 1,5 m visoko trstiko pod 12-urno fotoperiodo fluorescentne svetlobe (L 58W/77; Fluora, Osram). Pri tem smo v času osvetlitve temperaturo komore naravnali na 22° C ob 65% relativni zračni vlažnosti, v temni fazi pa na temperaturo 20 °C s 70% relativno zračno vlažnostjo (Slika 7).

Vzorčenja smo izvajali 10, 20 in 30 dni po inokulaciji oz. v času inkubacijske dobe. Pri tem smo del bazalnega dela uporabili za reizolacijo izolata oz. potrditev prisotnosti glive v prevodnem tkivu.



Slika 7: Kontrolne (levo) in okužene (desno) rastline sorte Celeia v rastni komori. (Foto: S. Radišek, 2010)

3.3 REIZOLACIJA

Z namenom zmanjšanja okužb z neželenimi organizmi smo dele rastlin omočili z etanolom in jih toplotno obdelali z ognjem (2–3 s). Kot gojišče smo uporabili krompirjev dekstrozni agar, umerjen na pH 4,8, z dodatkom streptomycin-sulfata (Sigma-Aldrich, Nemčija). Na omenjeno gojišče smo nato nanegli koščke obolelega prevajalnega tkiva rastlin. Po 3–5 dnevni inkubaciji na sobni temperaturi smo lahko s pomočjo svetlobnega mikroskopa na osnovi značilnih konidioforov določili prisotnost glive.

Nato smo iz spodnjega dela stebela okuženih in kontrolnih rastlin 10, 20 in 30 dni po okužbi z glivo izolirali RNA (seznam vzorcev je skupaj z njihovimi okrajšavami prikazan v Preglednici 1). Nadaljnji postopki se razlikujejo glede na uporabljeno metodo diferencialnega prikaza (cDNA-AFLP oziroma GeneSnare).

Preglednica 1: Seznam vzorcev, uporabljenih v analizi diferencialnega izražanja genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*.

Sorta	dni po okužbi/vzgoji v rastni komori		
	10	20	30
Celeia – okužena	1C+	2C+	3C+
Celeia – kontrola	1C-	2C-	3C-
Wye Target – okužen	1W+	2W+	3W+
Wye Target – neokužen	1W-	2W-	3W-

3.4 cDNA-AFLP

3.4.1 Izolacija celokupne RNA

Za izolacijo celokupne RNA iz okuženih in neokuženih rastlin hmelja smo uporabili prilagojen protokol TRIzol (Life Technologies, Invitrogen). Pri vseh postopkih, ki so povezani z izolacijo in uporabo RNA, je potrebno zelo paziti, da je ves delovni material steril in ne vsebuje ribonukleaz (RNaz) ter da ves čas nosimo rokavice, saj je molekula RNA zelo občutljiva na delovanje RNaz in lahko hitro razpade.

Postopek:

1. 1 g tkiva (spodnji del stebela nad koreninskim sistemom) smo razrezali na koščke in ga dali v terilnico, v katero smo takoj dodali 1 ml TRIzol reagenta (Invitrogen; monofazna raztopina fenola in gvanidin izotiocianata), ki med homogenizacijo tkiva stabilizira RNA. Vse skupaj smo nato prelili s tekočim dušikom in homogenizirali s pestičem. Dodali smo še 6 ml TRIzol reagenta (1 ml na 143 mg tkiva), da smo dobili tekočo homogenizirano raztopino.
2. Tekočino smo razdelili v šest 1,5 ml mikrocentrifugirk in suspenziji dodali 0,3 ml kloroforma na 1 ml raztopine (0,3 ml). Vzorce smo dobro pretresli in inkubirali na sobni temperaturi 15 do 30 minut.
3. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali (Centrifuga Beckmann J2-HS) 15 minut pri 12.000 obr./min pri 4 °C.
4. Dobili smo tri faze (spodnjo fenolno-kloroformno fazo, v kateri se nahaja DNA, vmesno fazo s proteini in vrhnjo, vodno fazo, v kateri je raztopljena RNA). Zgornjo, vodno fazo prenesemo v sveže mikrocentrifugirke.
5. Supernatantu smo dodali 1 volumen 2-propanola in 0,1 volumna 3M natrijevega acetata (pH 5,2) ter inkubirali 1 h v zamrzovalniku (-20 °C).
6. Sledilo je ponovno centrifugiranje pri enakih pogojih kot v točki 3 in spiranje oborjene RNA s 70-odstotnim (v/v) etanolom.
7. Oborjeno RNA smo raztopili v vodi, ki ni vsebovala RNaz (RNase free), in jo shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.4.2 Določanje koncentracije RNA

Koncentracijo izolirane RNA in uspešnost izolacije smo izmerili s pomočjo spektrofotometrije (BioPhotometer, Eppendorf, Nemčija).

Napravo smo pred vsakim merjenjem umerili z uporabo vode brez RNaz. V kiveto za enkratno uporabo smo dodali 100 µl vode in umerili napravo na vrednost 0. Nato smo v kiveto dodali še 2 µl vzorca RNA in izmerili njegovo koncentracijo. Odčitani smo tudi

vrednost razmerja med absorpcijsko vrednostjo vrha za nukleinske kisline in proteine (A260/A280), ki nam je služila kot pokazatelj čistosti vzorca.

3.4.3 Izolacija mRNA iz celokupne RNA

Za izolacijo mRNA smo uporabili komercialni komplet PolyATtract mRNA Isolation System proizvajalca Promega (Wisconsin, ZDA).

Postopek:

1. V 1,5 ml smo v vodi brez RNaz pripravili 0,1–1 mg celokupne RNA v skupnem volumnu 500 μ l. Mikrocentrifugirke smo nato dali v kopel na 65 °C za 10 min.
2. Po inkubaciji smo dodali 3 μ l biotinskega poli-T začetnega oligonukleotida (50 pmol/ μ l) in 13 μ l 20x SCC pufra [3M NaCl, 0,3 M Na-citrat, pH 7,0]. Rahlo smo premešali in inkubirali na sobni temperaturi dokler se raztopina ni ohladila (približno 20 min).
3. Vmes smo pripravili 0,5x (zmešali smo 30 μ l 20x SSC in 1170 μ l vode brez RNaz) in 0,1x (zmešali smo 7 μ l 20x SSC in 1393 μ l vode brez RNaz) raztopini SSC.
4. Priprava s streptavidinom prevlečenih magnetnih delcev (angl. Streptavidin-Paramagnetic Particles, SA-PMP): SA-PMP delci so v kompletu shranjeni v pufu, ki je potreben za njihovo stabilizacijo. Pred uporabo jih je bilo potrebno sprati z 0,5x SSC raztopino in uporabiti v roku 30 min po spiranju. Potrebno jih je bilo popolnoma raztopiti in odstraniti delce, ki se niso raztopili. SA-PMP delcev ne smemo zamrzniti ali pustiti, da se izsušijo.
 - a. Pred uporabo smo tubico s SA-PMP delci narahlo premešali, da so se popolnoma razpršili, in jih nato ulovili na magnetnem stojalu (približno 30 s).
 - b. Previdno smo odstranili supernatant.
 - c. Delce smo trikrat sprali z 0,5x raztopino SSC in jih vsakič ulovili z magnetnim stojalom ter odstranili supernatant.
 - d. Sprane SA-PMP delce smo resuspendirali v 100 μ l 0,5x SSC.
5. V tubico s SA-PMP delci smo dodali celotni volumen reakcije iz točke 2 (prileganje biotinskega začetnega oligonukleotida) in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Vsake 1–2 min smo rahlo premešali. mRNA z biotinskim začetnim oligonukleotidom se je v tej fazi vezala na SA-PMP delce.
6. Delce smo nato ulovili z magnetnim stojalom in odlili supernatant.
7. Sledilo je štirikratno spiranje delcev s 300 μ l 0,1x SSC. Pri vsakem spiranju smo morali delce popolnoma resuspendirati. Po zadnjem spiranju je bilo potrebno odstraniti čim več SSC.
8. Elucija: SA-PMP delce smo z rahlim mešanjem popolnoma resuspendirali v 100 μ l vodi brez RNaz. Magnetne delce smo nato ulovili na magnetnem stojalu in supernatant prenesli v sterilno tubico. Korak smo ponovili s 150 μ l vode, da smo dobili končni volumen 250 μ l mRNA.

9. Koncentriranje: Za nadaljnje analize je bilo potrebno ulovljeno mRNA koncentrirati, saj je bila izolirana mRNA preveč razredčena za prepis v cDNA.
 - a. Sprani mRNA smo dodali 0,1 volumna 3M natrijevega acetata (pH 5,2) in 1 volumen izopropanola ter inkubirali pri -20 °C čez noč.
 - b. Potem smo vzorec centrifugirali 10 min pri 12.000 obr./min. Odstranili smo supernatant in raztopili usedlino v 1 ml 75% (v/v) etanolu, nakar smo še enkrat centrifugirali pri enakih pogojih.
 - c. Odstranili smo supernatant, raztopili usedlino v vodi brez RNaz in shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

Uspešnost izolacije in koncentracijo mRNA smo določili spektrofotometrično, enako kot v pod poglavju 3.4.2 (Določanje koncentracije RNA).

3.4.4 Sinteza cDNA

mRNA smo v cDNA prepisali s pomočjo komercialnega kompleta Universal RiboClone cDNA Synthesis System (Promega).

Postopek:

A. Sinteza prve verige:

1. Priprava vzorca mRNA: v sterilno mikrocentrifugirko brez RNaz, smo dodali 2 µg mRNA, 2 µl Oligo(dT)₁₅ začetnega oligonukleotida (0,5 µg/1 µg mRNA) in sterilne vode brez RNaz, do skupnega volumna 15 µl.
2. Vzorce smo segreli na 70 °C za 5–10 min. Ohladili smo na ledu za 5 min in rahlo centrifugirali, da smo zbrali raztopino na dnu mikrocentrifugirke.
3. V mikrocentrifugirke z vzorci smo dodali 5 µl pufra First Strand 5x Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 pri 43 °C), 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2,5 mM spermidina, 50 mM DTT in 5 mM (vsakega od dNTP) dATP, dCTP, dGTP, dTTP] in 40 enot RNazin zaviralca ribonukleaz (RNasin Ribonuclease Inhibitor). Vzorce smo segreli na 42 °C za 3–5 min in dodali 2,5 µl natrijevega pirofosfata (40 mM), 30 enot reverzne transkriptaze AMV (angl. Avian myeloblastic virus) ter vodo brez RNaz do skupnega volumna 25 µl.
4. Rahlo smo pomešali in inkubirali reakcije na 42 °C za 60 min. Po inkubaciji smo jih prenesli na led.

B. Sinteza druge verige:

1. Vzorcem smo dodali mešanico reakcijskih komponent: 40 µl pufra Second Strand 2,5x Buffer [100mM Tris-HCl (pH 7,2), 225 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂ in 7,5 mM DTT], 5 µl acetiliranega BSA (angl. Bovine Serum Albumin, goveji serumski albumin, 1mg/ml), 8 enot DNA polimeraze I, 1,5 enot RNaze H in vodo brez nukleaz do končnega volumna 100 µl.
2. Sledila je 4-urna inkubacija pri 14 °C.

3. Nato smo vzorce cDNA segreti na 70 °C za 10 min, rahlo centrifugirali, da smo zbrali vsebino mikrocentrifugirke na dnu in dali na led.
4. Vzorcem smo dodali 4 enote T4 DNA polimeraze in 10 min inkubirali na 37 °C.
5. Na tej stopnji smo reakcijo prekinili z dodatkom 4 µl 500 mM EDTA-e (etilendiamintetraocetna kislina) in vzorce shranili v zamrzovalniku na -80 °C ter postopek nadaljevali naslednji dan.
6. Čiščenje in obarjanje cDNA: vzorce smo prenesli v sveže 1,5 ml mikrocentrifugirke, jim dodali 100 µl vode brez nukleaz in 200 µl mešanice fenola, kloroforma in izoamilalkohola (razmerje 25 : 24 : 1), vzorec dobro premšali in centrifugirali v namizni centrifugi 5 min pri najvišji hitrosti.
7. Supernatant smo nato previdno prenesli v svežo 1,5 ml tubico ter dodali 0,1 volumna 2,5 M natrijevega acetata in 2 volumna ledeno hladnega 100% (v/v) etanola. Vzorce smo nato dali za eno uro v zamrzovalnik na -80 °C. Po inkubaciji smo ponovno centrifugirali pri najvišji hitrosti 5 min.
8. Odlili smo supernatant in usedlino sprali s 500 µl ledeno hladnega 70% (v/v) etanola. Ponovno smo centrifugirali pri najvišji hitrosti 2 min.
9. Previdno smo odstranili supernatant, osušili usedli vzorec cDNA in ga raztopili v 25 µl TE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8) in 1 mM EDTA]. Vzorce smo shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

3.4.5 Določanje koncentracije cDNA

Koncentracije vzorcev cDNA smo izmerili s pomočjo spektrofotometrije, po enakem postopku kot v podpoglavju 3.4.2 (Določanje koncentracije RNA). Vzorce smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.6 Pomnoževanje cDNA-AFLP fragmentov

Za analizo diferencialnega izražanja fragmentov cDNA hmelja smo uporabili prvotni AFLP protokol (Vos in sod., 1992), s to razliko, da smo namesto restrikcijskega encima *EcoRI* uporabili restrikcijski encim *PstI*.

3.4.6.1 Restrikcijski razrez fragmentov cDNA in ligacija adapterjev

3.4.6.1.1 Priprava dvoverižnih adapterjev *PstI* in *MseI*

Oligonukleotide *PstI*-linker1 in linker2 ter *MseI*-linker1 in linker2, sintetizirane in liofilizirane pri podjetju MGW Biotech (Ebersberg, Nemčija), smo v TdE puftru [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)] razredčili na delovno koncentracijo 1 µg/µl.

Nato smo pripravili adapter *PstI* s končno koncentracijo 5 pmol/μl in adapter *MseI* s končno koncentracijo 50 pmol/μl. Reakcijska mešanica v skupnem volumnu 40 μl je bila sestavljena iz 5 pmol/μl oligonukleotida *PstI*-linker1, 5 pmol/μl oligonukleotida *PstI*-linker2 in 4 μl 100mM Tris-HCl (pH 7,7) ter dvakrat destilirane vode. Mešanica za adapter *MseI* je bila pripravljena na podoben način, le da je bila koncentracija linkerjev 50 pmol/μl.

Reakcijski mešanici smo inkubirali v napravi za ciklično termostatanje, ki je s postopnim hlajenjem omogočila reakcijo z naslednjim temperaturnim profilom:

- 5 min pri temperaturi 95 °C.
- 91 ciklov, začetna temperatura 95 °C, zniževanje za 1 °C/cikel, 1 min/cikel, končna temperatura 4 °C.

Adapterje smo do uporabe shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

Spodaj je prikazano nukleotidno zaporedje in oblika izdelanih dvoverižnih adapterjev s konci, komplementarnimi mestom restrikcijskih encimov, in na drugi strani enoverižni ostanek, ki preprečuje nastanek dimerov:

Adapter *PstI*: 5' – CTCGTAGACTGCGTACATGCA – 3'
 3' – CATCTGACGCATGT – 5'

Adapter *MseI* 5' – GACGATGAGTCCTGAG – 3'
 3' – TACTCAGGACTCAT – 5'

3.4.6.1.2 Restrikcija in ligacija adapterjev

cDNA smo razrezali z dvema restrikcijskima endonukleazama, in sicer s *PstI*, ki prepozna in cepi zaporedje 5' – CTGCA[^]G – 3', in *MseI*, ki prepozna in cepi zaporedje 5' – T[^]TAA – 3' (New England, Biolabs, Nemčija). Nato smo na lepljive konce komplementarnih restrikcijskih fragmentov ligirali pripravljene dvoverižne adapterje.

Postopek:

1. V restrikcijsko mešanico smo 500 ng cDNA in 2,5 enotam posameznih restrikcijskih encimov dodali še: pufer 1x NEBuffer [50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ in 1 mM ditiotritol (pH 7,9 pri 25 °C)] in 100 µg/ml BSA v končnem volumnu 40 µl. Reakcijo smo inkubirali 2 uri pri 37 °C.
2. Sledila je ligacija adapterjev. V restrikcijsko reakcijo smo dodali: 5 pmol adapterja *Pst*I, 50 pmol adapterja *Mse*I, 1x T4 DNA ligazni pufer [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol, 1 mM ATP in 25 µg/ml BSA (pH 7,8)] in 1 Weissovo enoto T4-DNA ligaze. Končni volumen reakcije je bil 50 µl. Reakcijo smo inkubirali dve uri pri 37 °C, nato smo vzorce do uporabe shranili pri -20 °C.

3.4.6.2 Reakcija predamplifikacije

Ta reakcija predstavlja prvo pomnoževanje restrikcijskih fragmentov v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Na tej stopnji smo dodali začetne oligonukleotide z enim selektivnim nukleotidom na 3' koncu. Tako smo naredili prvo selekcijo med razrezanimi fragmenti cDNA in pomnoževanje omejili na tiste fragmente, ki se končajo z nukleotidom, ki je komplementaren selekcijskemu nukleotidu.

Spodaj je prikazano nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov z enim selektivnim nukleotidom (osrednje zaporedje + selektivni nukleotid):

*Pst*I+A: 5' -GACTGCGTACATGCAG**A**-3'

*Mse*I+C: 5' -GATGAGTCCTGAGTA**A**C-3'

Postopek:

1. Pripravili smo 50 µl reakcijske mešanice: 1x PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3)], 0,2 mM posameznega deoksinukleotida (dNTP) (Sigma-Aldrich, Nemčija), 50 ng začetnega oligonukleotida *Pst*I+A, 50 ng začetnega oligonukleotida *Mse*I+C, 1,25 enote *Taq* DNA polimeraze (Promega, ZDA) in 5 µl restrikcijsko-ligacijske mešanice.
2. Pomnoževanje fragmentov cDNA je potekalo v napravi za ciklično termostatanje po naslednjem temperaturnem profilu:
 20 ciklov s ponavljanjem:
 - 30 sekund pri 94 °C,
 - 60 sekund pri 56 °C,
 - 60 sekund pri 72 °C.
3. Vzorce smo pred nadaljnjo uporabo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.6.3 Selektivna amplifikacija

V reakciji selektivne amplifikacije smo fragmente cDNA, dobljene v preamplifikacijski reakciji, pomnoževali z različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov *PstI* (P) in *MseI* (M) s tremi ali – v primeru *MseI* začetnih oligonukleotidov – dvema selektivnima nukleotidoma. S selektivnimi nukleotidi smo dosegli še dodatno selektivnost pri pomnoževanju cDNA-AFLP fragmentov. V analizi cDNA-AFLP fragmentov smo uporabili dve metodi detekcije pomnoženih fragmentov, ki zahtevata uporabo različnih začetnih oligonukleotidov:

- Za denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo s fluorescentno detekcijo smo uporabili začetne oligonukleotide *PstI*, ki so na 5' koncu označeni s fluorescentnim barvilom CY5. Uporabili smo 24 kombinacij začetnih oligonukleotidov (P – ACA, AGA, AAC in M – CG, CT, CTG, CAG, CTA, CA, CC, CTC, kjer P ali M označujeta osnovno zaporedje *PstI* ali *MseI*, sledita dve ali tri selektivne baze).
- Za denaturacijsko poliakrilamidno sekvenčno elektroforezo z detekcijo s srebrom smo uporabili navadne začetne oligonukleotide *PstI* brez fluorescentnega barvila. Uporabili smo 22 kombinacij začetnih oligonukleotidov, ki so predstavljeni v Preglednici 2.

Spodaj je prikazano nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov z dvema oz. tremi selektivnimi nukleotidi (osrednje zaporedje + selektivni nukleotidi):

PstI+3: 5' –GACTGCGTACATGCAG**ANN**–3'

MseI+2/3: 5' –GATGAGTCCTGAGTAA**CN/CNN**–3'

Postopek:

1. Predamplifikacijsko reakcijo smo v razmerju 1 : 10 razredčili z dvakrat destilirano sterilno vodo in 2 µl razredčene mešanice uporabili kot matrico v nadaljnji reakciji pomnoževanja.
2. V reakcijsko mešanico selektivne amplifikacije s končnim volumnom 10 µl smo poleg 2 µl razredčene predamplifikacijske reakcije dodali: 1x PCR pufer, 15 ng začetnega oligonukleotida *PstI* in 15 ng začetnega oligonukleotida *MseI*, 0,3 enote *Taq* DNA polimeraze in 0,2 mM posameznega deoksinukleotida (dNTP).
3. Pomnoževanje je potekalo v napravi za ciklično termostatanje po protokolu z začetnim spuščanjem temperature (angl. touch down), ki obsega:
 - 13 ciklov (s spuščanjem temperature prileganja za 0,7 °C v vsakem ciklu):
 - 30 sekund pri 94 °C,
 - 30 sekund pri 65 °C (-0,7 °C na cikel do – 56 °C),

- 60 sekund pri 72 °C; in
 - 23 ciklov:
 - 30 sekund pri 94 °C,
 - 30 sekund pri 56 °C,
 - 60 sekund pri 72 °C.
4. Vzorce smo pred nadaljnjo uporabo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.7 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza s fluorescentno detekcijo

Z uporabo 24 kombinacij začetnih oligonukleotidov, od katerih je bil začetni oligonukleotid *PstI* označen s fluorescentnim barvilom CY5, smo pomnožili vseh dvanajst vzorcev fragmentov cDNA, s čimer smo želeli preizkusiti, katere kombinacije začetnih oligonukleotidov so naprimernejše za nadaljnjo analizo. Pomnožene cDNA-AFLP fragmente smo ločevali v denaturacijskih poliakrilamidnih gelih z debelino 0,5 mm na elektroforetski napravi ALFexpress II DNA Analysis System (Amersham Biosciences, ZDA), ki fragmente zaznava s pomočjo laserskega spodbujanja molekul.

Postopek:

1. Najprej smo s 96% (v/v) etanolom temeljito očistili termoploščo, zgornjo stekleno ploščo gelske kasete in distančnike. Na zgornji del (2–4 cm) termoplošče smo nanесли 0,5 ml raztopine bind silan [0,3% (v/v) γ -metakriloksiopropil-trimetoksisilan, pripravljen v raztopini 95% (v/v) etanola in 2,5% (v/v) očetne kisline] in pustili, da se posuši. Bind silan prilepi gel na ploščo, da se žepki gela ne sesedejo. Očiščeni, suhi plošči in distančnike smo sestavili v gelsko kaseto.
2. Medtem smo 35 ml pripravljene gelske raztopine [5% akrilamid-bisakrilamid 19 : 1, 1x TBE (44,5 mM Tris, 44,5 mM borova kislina in 1 mM EDTA) pufer in 7 M urea] prefiltrirali skozi 0,22 μ m filter in 10 min vakuumirali.
3. Preden smo gelsko raztopino vbrizgali v pripravljeno gelsko kaseto, smo raztopini dodali 700 μ l UV iniciatorja [100 mM 1-hidroksi-cikloheksil-fenil-ke-ton, raztopljen v etilen glikolu]. Vstavili smo glavnik in inducirali polimerizacijo gela z 12 minutnim obsevanjem z UV svetlobo (Repro-Set, Amersham Biosciences). Po polimerizaciji smo odstranili glavnik ter skrbno očistili žepke za nanos vzorcev in vstopno mesto laserskega žarka.
4. Kasete s polimeriziranim gelom smo postavili na nosilce v sekvenčni napravi ter v katodno in anodno pufrsko posodo nalili 1x TBE pufer.
5. Amplificirane cDNA-AFLP vzorce smo pripravili za nanos tako, da smo jim dodali enak volumen (10 μ l) formamidnega nanašalnega pufra [5 mg dekstran modro, raztopljen v 1 ml formamida], jih 4 min denaturirali pri temperaturi 94 °C ter takoj prenesli na led.
6. Na gel smo nanесли 5 μ l vsakega vzorca. V skrajne žepke smo nanесли še eksterni dolžinski standard velikostnega razreda 50–500 baznih parov (ALFexpress SizerTM

50–500, Amersham Biosciences, ZDA). Pripravili smo ga tako, da smo 1 μ l standarda dodali 5 μ l formamidnega nanašalnega pufra.

7. Elektroforeza je potekala 300 min pri naslednjih parametrih: konstantna moč 15 W, temperatura 55 °C, napetost 1.500 V, tok 60 mA in interval zajemanja signala fluorescence 1 s.

3.4.8 Denaturacijska poliakrilamidna sekvenčna elektroforeza in barvanje s srebrom

Za izolacijo diferencialno označenih cDNA-AFLP fragmentov smo uporabili vertikalno denaturacijsko sekvenčno elektroforezo modela S2 z velikostjo gela 31 x 38,5 cm (Life Technologies, Paisley, Velika Britanija) in barvanje s srebrom, ki za razliko od fluorescentne detekcije omogoča izolacijo ciljnih cDNA-AFLP fragmentov iz poliakrilamidnih gelov. Izmed vseh kombinacij začetnih oligonukleotidov, ki smo jih preizkusili na gelski elektroforezi s fluorescentno detekcijo, smo jih za pomnoževanje fragmentov cDNA, pri katerem uporabili fluorescentno neoznačene začetne oligonukleotide *Pst*I, izbrali 22.

Postopek:

- A. Selektivna amplifikacija fragmentov cDNA– glej podpoglavje 3.4.6.3, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide brez fluorescentne molekule (tj. neoznačene).
- B. Elektroforeza:
 1. Priprava steklenih plošč: veliko in malo stekleno ploščo smo najprej temeljito očistili s 96% (v/v) etanolom. Pri nadaljnjem delu s ploščama je bilo potrebno paziti, da ni prišlo do kontaminacije steklenih plošč, zato smo po zaključku dela s prvo ploščo morali zamenjati rokavice, preden smo začeli pripravljati naslednjo ploščo.
 - a. Mala steklena plošča: tretirali smo jo s 3–4 ml 0,00225% (v/v) raztopine bind silana v 95% (v/v) etanolu in 0,5% (v/v) led očetni kislini. Tako smo zagotovili dobro oprijemljivost gela.
 - b. Velika steklena plošča: premazali smo jo z 1–2 ml avtokozmetičnega pripravka Rain-X, s čimer smo ustvarili tanek silikonski sloj za odboj vode in s tem tudi gela.

Po tretiranju smo ob rob velike steklene plošče položili distančnika in nanju položili malo stekleno ploščo, nakar smo plošči spojili s pomočjo gumijastega kalupa in ščipalk.

2. 60 ml pripravljene gelske raztopine [1x TBE, 5,5% (v/v) akrilamid-bisakrilamid 19 : 1, 8 M urea] smo prefiltrirali in vakuimirali ter dodali 1,2 ml raztopine UV iniciatorja. Potem smo z injekcijo s konstantnim tokom vlili gel v pripravljen kalup in vstavili glavnik z ravnim delom navzdol. Gelsko kaseto smo izpostavili 12 min obsevanju z dolgovalovno UV svetlobo, da je gel

- polimeriziral. Po polimerizaciji smo odstranili glavnik in vrhnji del gela očistili z deionizirano vodo.
3. Gelsko kaseto smo vstavili v elektroforetsko enoto. V zgornjo pufersko posodo smo vlili 450 ml 1x TBE pufra, v spodnjo pa 450 ml 0,66x TBE pufra in 1 M natrijevega acetata. Tako smo dosegli učinek klinastega gela. Sledila je 45 minutna predelektroforeza pri konstantni moči 60 W. S tem smo dosegli konstantno temperaturo gela 50 °C, ki prepreči tvorbo sekundarnih struktur DNA.
 4. Vzorce smo pripravili za nanos tako, da smo amplifikacijskemu produktu dodali enako količino nanašalnega sekvenčnega barvila [10 mM NaOH, 95% (v/v) formamid, 0,05% (w/v) bromofenolmodro, 0,05% (w/v) ksilen cianol] in ga 4 min denaturirali pri 94 °C ter takoj prenesli na led.
 5. Pred nanosom vzorcev smo na vrh gela vstavili glavnik z zobci navzdol, tako da so le-ti rahlo predrli gel in s pufrom sprali nanašalne žepke. Vanje smo nanесли po 4 µl vsakega vzorca, pri čemer smo vsak vzorec nanесли v dva žepka. V skrajna dva žepka smo nanесли še dolžinski standard z lestvico velikosti 10 bp DNA (10 bp DNA Ladder, Invitrogen). Elektroforeza je potekala 140 min pri konstantni moči 60 W.
- C. Barvanje s srebrom po protokolu Silver Sequence DNA (DNA Sequencing System Technical Manual, Promega, ZDA) z manjšimi modifikacijami (Echt in sod., 1996):
1. Med potekom elektroforeze smo pripravili potrebne raztopine za barvanje, in sicer po 2 l posamezne raztopine. Vsi koraki so potekali na orbitalnem stresalniku (Gyrotwister, Labnet International, ZDA). Po koncu elektroforeze smo stekleni plošči razklenili in sledilo je barvanje gela, pritrjenega na mali stekleni plošči.
 2. Malo ploščo smo 20 min inkubirali v raztopini FIX/STOP [7,5% (v/v) led očetna kislina], nato smo jo trikrat po dve minuti spirali v treh litrih destilirane vode. Raztopino FIX/STOP smo shranili v hladilniku pri 4 °C za zadnji korak barvanja.
 3. Sledilo je 30 min barvanja v raztopini za barvanje [0,1% (w/v) srebrov nitrat in 3 ml 37% (v/v) formaldehida] in nato kratko 5–10 s spiranje gela v destilirani vodi.
 4. Gel smo nato prenesli v ohlajeno raztopino razvijalca [3% (w/v) natrijev karbonat, 0,15% (v/v) formaldehid in 2 mg/l natrijev tiosulfat] in ga stresali, dokler se fragmenti niso obarvali do zelene intenzitete. Takrat smo proces razvijanja ustavili s hladno raztopino FIX/STOP in stresali še nekaj minut, nazadnje pa smo gel sprali z destilirano vodo.
 5. Obarvani gel smo čez noč posušili v sušilniku pri 30 °C.

3.4.9 Izolacija in reamplifikacija diferencialno izraženih cDNA-AFLP fragmentov

Izbrane diferencialno izražene cDNA-AFLP fragmente smo izolirali in reamplificirali po postopku, ki so ga razvili Weaver in sod. (1994).

Postopek:

1. Posušeni gel na stekleni plošči smo prenesli na transiluminator in vizualno, s pomočjo dolžinskega standarda izbrali diferencialno izražene cDNA-AFLP fragmente za nadaljnjo analizo.
2. S sterilnim pipetnim nastavkom smo postrgali zeleni fragment v 50 µl vnaprej pripravljene amplifikacijske mešanice z enakimi komponentami kot v poglavju 3.4.6.3, le da smo glede na večjo prostornino reamplifikacijske reakcije količino *Taq* polimeraze povečali na 1,2 enote. Vsak fragment smo razdelili v dve tubici z reakcijsko mešanico.
3. Temperaturni profil pomnoževanja fragmentov v verižni reakciji s polimerazo je bil enak kot v podpoglavju 3.4.6.3 (Selektivna amplifikacija).

3.4.10 Agarozna elektroforeza in čiščenje cDNA-AFLP fragmentov

Pomnožene cDNA-AFLP fragmente smo nanесли na agarozni gel (SeaKem, BMA Products, ZDA), kar nam je omogočilo vizualizacijo in izolacijo reamplificiranih fragmentov za nadaljnje postopke.

Postopek:

1. 1,4% agarozni gel smo pripravili z 1x TBE pufrom in ga za nadaljnjo vizualizacijo obarvali z 0,5 µg/ml [iz založne raztopine v koncentraciji 10 mg/ml] koncentracijo etidijevega bromida.
2. Ločevanje vzorcev je potekalo v horizontalni elektroforetski napravi SubCell Model 192 (Bio-Rad, ZDA), in sicer pri konstantni napetosti 130 V proti pozitivno nabiti anodi v 0,5x TBE elektroforetskem pufu.
3. Vzorce pomnoženih cDNA-AFLP fragmentov smo pred nanašanjem na agarozni gel zmešali z nanašalnim barvilom [12,5% (w/v) Ficoll tip 400, 0,2% (w/v) brom fenol modro] v razmerju 1 : 5. Poleg 18 µl vzorca smo v skrajne žepke na agaroznem gelu nanесли še 100 ng DNA markerja (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva).
4. Ko smo ocenili, da so se vzorci dovolj ločili, smo gel prenesli na transiluminator TFM-30 (UVP Inc., Anglija), opremljen z virom dolgovalovne UV svetlobe (312 nm), in gel fotografirali z digitalnim fotoaparatom (Nikon CoolPix, Japonska).

Fragmente smo s sterilnim skalpelom izrezali iz agaroznega gela in jih shranili v 1,5 ml tubicah.

Izrezane fragmente je bilo nato potrebno izolirati iz agaroznega gela, kar smo naredili s pomočjo komercialnega kompleta za ekstrakcijo DNA (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit #K0513, Fermentas LifeScience, Litva), ki uporablja prirejeno metodo izolacije s steklenim mlekom oz. silicijevim prahom po Vogelstein in Gillespie (1979).

Postopek:

1. Fragmentom smo dodali 1 ml raztopine za vezanje [angl. Binding Solution, 6 M natrijev jodid] in 111 μ l pufra za pretvorbo TBE (angl. TBE Conversion Buffer), saj lahko boratni ioni negativno vplivajo na vezavo DNA na steklene delce. Vzorce smo inkubirali na 55 °C 5 min oz. dokler se ni rezina agaroznega gela popolnoma raztopila.
2. Raztopljenim vzorcem smo dodali 8 μ l suspenzije silicijevega prahu (angl. Silica Powder Suspension) in ponovno inkubirali 5 min na 55 °C z vmesnim mešanjem na vorteks mešalniku (Vortex-Genie2, Scientific Industries, ZDA), da smo silicij ohranjali v suspenziji.
3. Po inkubaciji smo kompleks silicija z vezano cDNA 5 sekund centrifugirali (Centrifuge 5415, eppendorf, Nemčija) pri najvišji hitrosti in nato odstranili supernanant.
4. Sledilo je trikratno spiranje usedline s 500 μ l ledeno mrzlega pufra za spiranje [15 ml koncentrirane raztopine (ang. Concentrated Washing Buffer) Tris, NaCl in EDTA (proizvajalec ne navaja koncentracije), ki smo ji pred uporabo dodali 285 ml destilirane vode in 300 ml 95% (v/v) etanola]. Vzorce smo dobro premešali, centrifugirali 5 sekund in odstranili supernanant. Po zadnjem spiranju smo pazili, da smo odstranili oz. posušili ves pufer.
5. Usedlino smo nato resuspendirali v 30 μ l TE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0) in 1 mM EDTA (pH 8,0)], da je cDNA spet prešla v vodno fazo, in s centrifugiranjem odstranili silicijeve delce. Raztopljeno cDNA smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in vzorce shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.11 Kloniranje cDNA-AFLP fragmentov

Za pomnožitev zadostnega števila cDNA-AFLP fragmentov smo uporabili komercialni komplet za kloniranje pGEM-T Easy Vector System (Promega, Velika Britanija).

Postopek:

1. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1,5 μ l cDNA-AFLP fragmentov izoliranih iz agaroznega gela.
2. Dodali smo še ligacijsko mešanico za standardno reakcijo, ki je vsebovala 2,5 μ l 2x hitrega ligacijskega pufra (angl. 2x Rapid Ligation Buffer, proizvajalec ne navaja sestavin), 0,5 μ l vektorja pGEM-T Easy (25 ng) in 0,5 μ l T4 DNA ligaze (3 Weisssove enote/ μ l).

3. Vzorce smo preko noči inkubirali v hladilniku pri 4 °C in nato shranili pri -20 °C.

Plazmidno DNA smo s toplotnim šokom vnesli v kompetentne celice *Escherichia coli* genotipa XL-Gold, čemur je sledila belo-modra selekcija uspešno transformiranih kolonij na trdem LB gojišču v prisotnosti antibiotika karbenicilina.

Kompetentne celice so bile izdelane po metodi SEM (Inoue in sod., 1990) z dodajanjem glicina v gojitveni medij, kar dodatno poveča permeabilnost bakterijske membrane (Akhtar in sod., 2000). Celice so bile vnaprej pripravljene v laboratoriju katedre in shranjene pri -80 °C.

Postopek:

1. V mikrocentrifugirke, ohlajene na ledu, smo odpipetirali po 50 µl kompetentnih celic in v vsako dodali še 2 µl ligacijske mešanice, rahlo premešali ter 20 min inkubirali na ledu.
2. Po inkubaciji smo vzorce izpostavili kratkemu (45–50 s) temperaturnemu šoku v vodni kopeli, segreti na 42 °C, in jih po tem prestavili nazaj na led za 2 min.
3. Transformiranim celicam smo dodali 950 µl SOC gojišča [2% (w/v) tripton, 5% (w/v) kvasni ekstrakt, 20 mM (w/v) glukoza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ in 10 mM MgSO₄ (pH 6,8–7)] in jih 1,5 ure stresali pri 37 °C, da se je na plazmidu uspešno vzpostavila ampicilinska odpornost.
4. Bakterijske celice smo v dveh redčitvah (10 in 100 µl) razmazali po trdnem LB gojišču [1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) tripton, 0,5% (w/v) kvasni ekstrakt, 2% (w/v) Difco agar (Becton Dickinson)], ki smo mu dodali selekcijski antibiotik karbenicilin [150 mg/l], induktor promotorja gena *lacZ* IPTG (Duchefa) [0,2 mM iz založne raztopine s koncentracijo 0,1 M] in X-gal (Duchefa) [40 µg/ml, iz založne raztopine s koncentracijo 20 mg/ml v dimetil formamidu] za modro-belo selekcijo. Petrijevke z razmazanimi bakterijami smo preko noči inkubirali pri 37 °C.

3.4.12 Pomnoževanje plazmidne DNA v verižni reakciji s polimerazo

Zaradi velike količine kloniranih fragmentov cDNA-AFLP smo se namesto za izoliranje plazmidne DNA iz celic s pomočjo komercialnega kompleta odločili za pomnožitev vstavljenega cDNA-AFLP fragmenta v plazmidno DNA v verižni reakciji s polimerazo, saj je tak postopek veliko hitrejši in bolj učinkovit.

Postopek:

1. Na osnovi belo-modre selekcije smo uspešno transformirane (bele) bakterijske kolonije s sterilnim pipetnim nastavkom prenesli v 50 µl TdE pufru in jih 8 min inkubirali pri 94 °C, da so celice počile in so se plazmidi sprostil v raztopino.

2. Nato smo 5 μ l plazmidne DNA dodali v reakcijsko mešanico, pripravljeno za verižno reakcijo s polimerazo, ki je vsebovala naslednje komponente: 1x PCR puffer, 0,5 μ M začetnega oligonukleotida T7 (5' - GTAATACGACTCACTATAGGGC - 3'), 0,5 μ M začetnega oligonukleotida SP6 (5' - CATACGATTTAGGTGACACTATAG - 3'), 0,75 enote *Taq* DNA polimeraze in 0,2 mM posameznega deoksinukleotida (dNTP) v končnem volumnu 25 μ l.
3. Pomnoževanje je potekalo v napravi za ciklično termostatiranje po naslednjem temperaturnem profilu:
 32 ciklov:
 - 3 min pri 94 °C,
 - 30 s pri 94 °C,
 - 30 s pri 55 °C,
 - 1 min pri 72 °C.
4. Vzorce smo pred nadaljnjo uporabo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.13 Določanje nukleotidnega zaporedja kloniranim cDNA-AFLP fragmentom

3.4.13.1 Neposredno čiščenje produktov verižne reakcij s polimerazo

Produkte, dobljene v verižni reakciji s polimerazo, smo morali pred uporabo v sekvenčni reakciji očistiti, saj lahko začetna oligonukleotida in deoksinukleotidi reakcije PCR motijo nadaljnje postopke. Odvečne začetne nukleotide in deoksinukleotide smo razgradili s pomočjo komercialnega kompleta ExoSAP-IT (USB Biochemicals, Nemičija), ki je mešanica encimov eksonukleaze in alkalne fosfataze.

V reakcijske PCR tubice smo odpipetirali 5 μ l posameznega vzorca pomnoženih plazmidov z vstavljenimi cDNA-AFLP fragmenti in jim dodali 1 μ l encima ExoSAP-IT in 1 μ l 5x PCR pufra. Vzorce smo nato inkubirali 45 min pri 37 °C, da je encim razgradil odvečne začetne oligonukleotide in deoksinukleotide, ter 15 min pri 80 °C, da smo encim inaktivirali.

3.4.13.2 Določanje nukleotidnega zaporedja kloniranim, pomnoženim cDNA-AFLP fragmentom

Nukleotidno zaporedje fragmentov cDNA smo določili z modifikacijo verižne deoksi metode, ki so jo razvili Sanger in sod. (1977). Metoda temelji na cikličnem določanju nukleotidnega zaporedja s termostabilno polimerazo in fluorescentno obarvanimi dideoksi terminatorji. V reakciji smo uporabili komercialni komplet BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ZDA), ki vsebuje vse potrebne reakcijske

komponente za pripravo reakcije, razen začetnega oligonukleotida. Reakcija je potekala po prirejenem protokolu Biotehnološkega centra Univerze v Wisconsinu, ZDA.

Postopek:

1. Iz reakcijske mešanice neposrednega čiščenja produktov verižne reakcije s polimerazo (iz točke 3.4.12.1) smo v vsako od dveh ločenih reakcijskih PCR tubic odpipetirali 3,5 μ l vzorca. Nukleotidno zaporedje fragmentov smo določili z obeh strani.
2. Nato smo pripravili dve reakcijski mešanici (po eno za vsak začetni oligonukleotid), ki sta vsebovali: 2 μ l 5x BigDye pufra (proizvajalec ne navaja sestave), začetni nukleotid T7 oz. SP6, specifičen za vektor pGEM-T easy (0,2 μ l 10 μ M koncentracije), 0,5 μ l sekvenčne mešanice BigDye 3.1 (proizvajalec ne navaja sestave) in 3,8 μ l vode.
3. V tubice za PCR s plazmidno DNA smo dodali po 6,5 μ l reakcijske mešanice, da smo dobili končni volumen 10 μ l.
4. Reakcija določevanja nukleotidnega zaporedja je potekala v napravi za ciklično termostatiranje po naslednjem temperaturnem profilu:
 - 3 min pri 95 °C, nato 50 ciklov:
 - 10 s pri 96 °C,
 - 10 s pri 50 °C,
 - 4 min pri 60 °C,
 - in nazadnje še 7 min pri 72 °C.
5. Vzorce smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.13.3 Čiščenje produktov reakcije določanja nukleotidnega zaporedja

Nevgrajene, fluorescenčne terminatorje smo iz reakcije odstranili s pomočjo čiščenja s precipitacijo z etanolom in EDTA-o.

Postopek:

1. Produkta reakcije za določevanje nukleotidnega zaporedja smo odpipetirali v z ABI kompatibilno mikrotitrsko ploščo in jih kratko centrifugirali (centrifuga Eppendorf 5810R, 3.00 obr./min).
2. Nato smo jim dodali 2,5 μ l 125 mM EDTA (pH 8,0) in kratko centrifugirali, da je EDTA prišla v stik z vzorci, in vsaki reakciji dodali še 30 μ l absolutnega etanola.
3. Ploščo smo prekrili s PCR folijo in premešali z obračanjem plošče. Nato smo jo 15 min inkubirali pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo.
4. Po inkubaciji smo ploščo 55 min centrifugirali pri hitrosti 3.700 obr./min in 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili etanol in ploščo, obrnjeno navzdol na papirnati brisači, ponovno centrifugirali, tokrat pri hitrosti 190x g oz. 1075 obr./min (rotor A-2-DWP, Eppendorf), 2 min.

5. Ploščo smo inkubirali 5 min pri sobni temperaturi in nato oborjeno sekvenčno reakcijo raztopili v 12 μ l formamida.

Očiščene vzorce smo poslali v laboratorij Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živinorejo in konjerejo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Tam so na avtomatski kapilarni napravi ABI3130XL določili nukleotidno zaporedje in nam rezultate poslali po elektronski pošti v obliki kromatogramskih datotek zaporedij v formatu AB1.

3.5 GeneSnare: METODA ZA DIFERENCIALNE PRIKAZ

Uporabljeni rastlinski material, postopek okuževanja in potrditev okužbe z glivo z reizolacijo so bili popolnoma enaki, kot je opisano v poglavjih 3.1, 3.2 in 3.3.

3.5.1 Izolacija RNA

Za izolacijo celokupne RNA iz hmelja smo uporabili komercialni komplet Spectrum Plant Total RNA Kit, ki omogoča izolacijo zelo čiste RNA v velikih koncentracijah. Tudi pri tem postopku izolacije celokupne RNA smo morali paziti na okužbo z zunanjimi RNazami, ki so prisotne povsod. Delovno površino in rokavice smo pred začetkom dela in tudi med delom razkuževali s komercialnim pripravkom RNaseZap (Sigma), ves uporabljen laboratorijski material pa je bil steril.

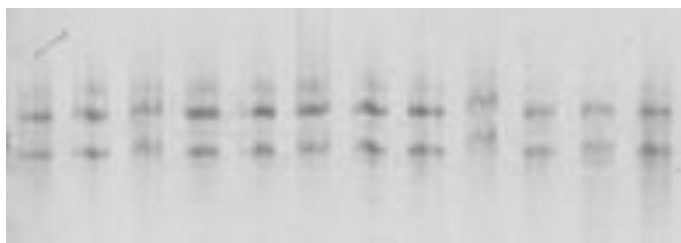
Postopek:

1. Priprava materiala:
 - a. Približno 100 mg rastlinskega tkiva smo s pomočjo tekočega dušika strli v terilnici ter ga do naslednjega koraka shranili v 1,5 ml tubici na suhem ledu ali v zamrzovalniku pri -80°C . Naenkrat smo na tak način pripravili 12 rastlinskih vzorcev.
 - b. Pred uporabo je bilo raztopini za liziranje (angl. Lysis Solution, proizvajalec ne navaja sestave) potrebno dodati 2-merkaptotanol (2-ME). Vsakemu ml raztopine za liziranje smo dodali 10 μ l 2-ME in rahlo premešali. Na 100 mg tkiva smo nato dodali 500 μ l mešanice raztopine za liziranje z dodanim merkaptotanolom. Vzorce smo takoj zmešali na vorteks mešalniku (Vorteks-Genie2, Scientific Industries, ZDA) ter jih 5 min inkubirali v vodni kopeli pri 56°C .
2. Po inkubaciji smo vzorce 3 min centrifugirali v namizni centrifugi pri sobni temperaturi in najvišji hitrosti (13.000 obr./min).

3. Supernatant smo previdno odpipetirali na filtracijske kolone, vstavljene v 2 ml tubice, zaprli pokrovček in tubice 1 min centrifugirali pri najvišji hitrosti. Kolono smo zavrgli in shranili lizat (tekočino).
4. V tubico z lizatomo smo dodali 750 μ l raztopine za vezavo (angl. Binding Solution, proizvajalec ne navaja sestave) in takoj dobro premešali. Nato smo 700 μ l mešanice odpipetirali na kolone za vezavo, vstavljene v 2 ml tubice, zaprli pokrovček in tubice 1 min centrifugirali pri najvišji hitrosti. Tekočino smo zavrgli in postopek ponovili s preostankom mešanice lizata z raztopino za vezavo.
5. Sledilo je spiranje RNA na vezavne kolone. 500 μ l raztopine za spiranje 1 (angl. Wash Solution 1, proizvajalec ne navaja sestave) smo odpipetirali na kolone, centrifugirali 1 min pri najvišji hitrosti ter zavrgli tekočino.
6. Nato smo dvakrat ponovili spiranje z raztopino za spiranje 2 (angl. Wash Solution 2, proizvajalec ne navaja sestave), ki smo ji ob prvi uporabi dodali 100% (v/v) etanol po navodilih proizvajalca. 500 μ l raztopine smo odpipetirali na kolone, 30 s centrifugirali pri najvišji hitrosti ter zavrgli tekočino.
7. Kolono v tubici smo ponovno centrifugirali 1 min, da smo jo posušili. Kolono smo nato prestavili v novo 1,5 ml tubico.
8. Na sredino kolone smo odpipetirali 50 μ l raztopine za elucijo (angl. Elution Solution, proizvajalec ne navaja sestave), zaprli pokrovček in inkubirali na sobni temperaturi 1 min. Nato smo ponovno 1 min centrifugirali pri najvišji hitrosti in kolono zavrgli.
9. Vzorce smo shranili v zamrzovalniku pri -80°C .

3.5.2 Določanje koncentracije RNA

Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili po enakem postopku, kot je navedeno v poglavju 3.4.2. Uspešnost izolacije smo preverili na 1,2% agaroznem gelu (glej Sliko 8 in poglavje 3.4.10).



Slika 8: Izolirana RNA hmelja – vidita se dva dobro ločena pasova, ki predstavljata 28S in 18S ribosomske RNA.

3.5.3 Sinteza cDNA in pomnoževanje fragmentov cDNA

cDNA smo sintetizirali iz celokupne RNA in tako dobljene fragmente cDNA pomnožili s pomočjo komercialnega kompleta GeneSnare Differential Expression Kit (Sigma, Missouri, ZDA). Komplet temelji na sintezi prve verige cDNA v reakciji z reverzno transkriptazo in dvostopenjskem diferencialnem pomnoževanju fragmentov cDNA v verižni reakciji s polimerazo (sinteza druge verige cDNA v prvi stopnji in pomnoževanje v drugi stopnji).

3.5.3.1 Sinteza prve verige cDNA v reakciji z reverzno transkriptazo

Postopek:

1. Prvi korak:
 - a. V tubici za PCR smo zmešali: 4 µg celokupne RNA, 20 µM ACP sidrni poli-T začetni oligonukleotid (dT-ACP) in vodo (brez RNaz) v skupnem volumnu 30 µl. Dobro smo premešali in hitro centrifugirali.
 - b. Sestavine smo 10 min inkubirali v napravi za ciklično termostatiranje pri 76 °C ter takoj ohladili na ledu.
2. Drugi korak:
 - a. V vsako tubico (ki je že vsebovala 30 µl) smo dodali 1x pufer za MMLV-RT (proizvajalec ne navaja sestave), 400 µM vsakega deoksinukleotida (dNTP), 0,4 enote/µl zaviralca RNaz (angl. RNase Inhibitor, proizvajalec ne navaja sestave), 4 enote/µl MMLV-RT in vodo (brez RNaz) do skupnega volumna 50 µl. Dobro smo premešali in hitro centrifugirali.
 - b. Tubice smo 50 min inkubirali v napravi za ciklično termostatiranje pri 42 °C, nato pa jih za 3 min segreli na 94 °C (s tem smo deaktivirali MMLV-RT in denaturirali RNA/DNA hibride) ter takoj ohladili na ledu.

3.5.3.2 Pomnoževanje fragmentov cDNA v verižni reakciji s polimerazo

Postopek:

1. Pripravili smo mešanico sestavin za PCR: 1x PCR pufer, 3,3 mM MgCl₂, 250 µM posameznega dNTP, 500 nM začetnega oligonukleotida dT-ACP, 500 nM poljubnega začetnega oligonukleotida ACP in dvojno destilirano vodo v skupnem volumnu 19 µl ter jim dodali 1 µl cDNA iz koraka 3.5.3.1.
2. Pomnoževanje je potekalo v dveh stopnjah po naslednjem temperaturnem profilu:
 - 1 cikel:
 - 3 min pri 94 °C,
 - 3 min pri 50 °C,
 - 1 min pri 72 °C;
 - in 30 ciklov:

- 15 s pri 94 °C,
 - 30 s pri 65 °C,
 - 1 min pri 72 °C.
- Sledilo je končno podaljševanje 10 min pri 72 °C.

3.5.4 Agarozna elektroforeza, kloniranje fragmentov cDNA in določanje nukleotidnega zaporedja

Produkte verižne reakcije s polimerazo smo ločili na 1,2% agaroznem gelu, diferencialno izražene fragmente izrezali in s pomočjo komercialnega kompleta izolirali iz gela. Nato smo jih klonirali z uporabo pGEM-T easy vektorja in jim določili nukleotidno zaporedje. Postopki so enaki kot v poglavjih 3.4.10–3.4.13.

3.6 OBDELAVA REZULTATOV IN ISKANJE PODOBNOSTI V PODATKOVNIH BAZAH

3.6.1 Obdelava rezultatov določanja nukleotidnega zaporedja

Rezultate določevanja nukleotidnega zaporedja smo obdelali z računalniškim programom CodonCode Aligner različice 2.0.6 (CodoneCode Corporation, Massachusetts, ZDA), namenjenim naprednemu urejanju in zlaganju zaporedij.

Kromatogramske datoteke, ki smo jih prejeli po elektronski pošti (glej poglavje 3.4.13), smo uvozili v računalniški program, jih pregledali ter tiste s slabo kakovostjo zaporedja in tiste, katerih zaporedje je bilo krajše od 70 bp, izločili. Kromatograme pri katerih je bil slabe kakovosti le majhen del zaporedja, smo ročno popravili. Sledilo je odstranjevanje ostankov vektorskega zaporedja; v primeru cDNA-AFLP zaporedij je bilo potrebno odstraniti še AFLP adapterje, v primeru metode GeneSnare pa zaporedja začetnih oligonukleotidov.

Očiščene sekvence smo nato na osnovi podobnosti oz. različnosti razvrstili v soseske (angl. Contig). Uporabili smo kriterij 90% podobnosti in 35 baz prekrivanja. Zaporedja, ki se niso razvrstila v nobeno sosesko, so ostala v mapi »Nerazporejeni vzorci«. Soseske smo še ročno pregledali in popravili morebitne napake oz. neujemanja zaradi slabe kakovosti zaporedja.

Zaporedja sosesk in nerazporejenih (enkratnih) zaporedij smo nato izvozili v besedilno datoteko formata FASTA. Nukleotidna zaporedja smo poimenovali po naslednjem sistemu:

- cDNA-AFLP: zaporedna številka fragmenta – ime vzorca – predvidena dolžina – datum določitve nukleotidnega zaporedja. Fragment 38 iz kultivarja Wye target, ki se je izrazil v 20. dnevu po okužbi, smo na primer poimenovali 38-IIWT+270-9sep.

Ime soseske združenih vzorcev pa vsebuje zaporedno številko, dolžino in ime vzorca vseh vsebovanih fragmentov ter datum določitve nukleotidnega zaporedja. Če je soseska vsebovala preveč vzorcev je ime ostalo Contig+zaporedna številka, ki jo je določil program CodonCode Aligner. V sosesko 27-IICEL+_36IIWT+305-9sep sta se na primer združila zaporedje 27 iz kultivarja Celeia in 36 iz kultivarja Wye Target, oba izražena 20 dni po okužbi.

- GeneSnare: zaporedna številka fragmenta – dekamerni začetni oligonukleotid – predvidena dolžina – ime vzorca. Fragment 7 iz kultivarja Wye target, ki se je pri pomnoževanju z začetnim oligonukleotidom ACP1 izrazil 20. dan po okužbi, smo na primer poimenovali 7-ACP1-900_20WK. V nadaljnji obdelavi smo ime skrajšali na številko fragmenta – zaporedno številko plazmida – uporabljeni začetni oligonukleotid v reakciji določanja nukleotidnega zaporedja (npr. 7-x-T7/SP6). Soseske smo poimenovali Contig1–31.
- Pri obeh metodah smo imenu vzorca, ki smo mu določali nukleotidno zaporedje, dodali še številko, ki je označevala zaporedno številko plazmida z vstavljenim DIF.

3.6.2 Iskanje podobnosti v podatkovnih bazah

Urejena in združena nukleotidna zaporedja smo primerjali s pomočjo lokalno nameščenega programa NetBLAST različice 2.2.19, ki omogoča različne primerjave zaporedij z znanimi zaporedji različnih podsekcij podatkovnih baz pri Nacionalnem centru za biotehnoške informacije (NCBI, Bethesda, ZDA) (Altschul in sod., 1997), za primerjave z lokalno izdelanimi podatkovnimi bazami, ki smo jih pripravili iz zelenega nabora zaporedij, pa smo uporabili lokalni program BLAST. Primerjave smo opravili s tekstovnimi datotekami naših zaporedij v formatu FASTA. Rezultate primerjav, ki so bile v obliki besedilne datoteke, smo za lažji pregled rezultatov s pomočjo PERL skripte BLAST-parser, ki jo uporablja BIOPERL modul, pretvorili v tabularično obliko.

A. Program BLAST

Da bi lahko uporabili program BLAST, smo izdelali dve lokalni bazi rastlinskih proteinskih zaporedij, in lokalno bazo oznak izraženih zaporedij (EST) hmelja. Proteinski podatki zaporedij so bili preneseni iz dveh sekcij podatkovne baze UniProt KB, in sicer Swiss-Prot, ki je ročno anotirana in preverjena, ter TrEMBL, ki se anotira samodejno in se je ne preverja. Podatki združenih EST hmelja so bili preneseni s strežnika Plant Genome Database – PlantGDB Assemblies *Humulus lupulus* (podatki iz različice 168a). S programom FORMATDB (del programskega paketa BLAST) smo izdelali lokalne podatkovne baze, dve za proteinski nabor podatkov (Swiss-Prot in TrEMBL) in tretjo za nabor nukleotidnih zaporedij hmeljnih DNA.

Za primerjavo zaporedij DNA s proteinskimi zaporedji smo uporabili algoritem BLASTX in izbrali lokalno podatkovno bazo proteinov (Swiss-Prot oz. TrEMBL). Za primerjavo

zaporedij DNA z drugimi zaporedij DNA pa smo uporabili algoritem BLASTN in izbrali lokalno podatkovno bazo EST hmelja. Analizo smo opravili s programom BLASTALL z ustreznimi parametri (izbrani algoritem primerjave, podatkovna baza ter vhodna in izhodna datoteka).

B. Program NetBLAST

Primerjavo naših zaporedij s znanimi zaporedji iz podatkovnih baz NCBI (GenBank) smo opravili s programom BLASTCL3, ki je del paketa NetBLAST. Za primerjavo DNA z DNA smo uporabili algoritem BLASTN in izbrali podatkovno bazo »nr« (angl. non-redundant) ali podatkovno bazo EST, v katero niso vključena EST človeka in miši (»est others«), primerjavo na ravni DNA – proteini pa smo izvedli z algoritmom BLASTX, pri čemer smo izbrali podatkovno bazo »nr«.

S pomočjo algoritma BLASTN smo z naborom zaporedij, pridobljenih z metodo GeneSnare, primerjali še nabor zaporedij, pridobljenih z metodo cDNA-AFLP. S primerjavo smo želeli preveriti, ali smo z omenjenima metodama morda našli kakšna enaka zaporedja.

Nukleotidna zaporedja smo predložili v podatkovno bazo oznak izraženih zaporedij (dbEST), ki je del podatkovne baze GenBank, kjer so jim dodelili akcesijske številke HO059058-HO059274.

4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo za analizo diferencialnega izražanja genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum* uporabili dve različni tehniki za pomnoževanje in izolacijo diferencialno izraženih fragmentov, in sicer metodo cDNA-AFLP in komercialno tehniko GeneSnare. Metodi odkrivata različne polimorfizme cDNA – metoda AFLP odkriva restrikcijske polimorfizme, medtem ko GeneSnare odkriva polimorfizme s pomočjo naključnih dekamernih začetnih oligonukleotidov z izboljšano specifičnostjo pomnoževanja v PCR, ki je dosežena s t. i. začetnimi oligonukleotidi ACP (razloženo v poglavju 2.4.2 in na Sliki 6). Zaradi preglednosti bodo v vsakem poglavju najprej predstavljeni rezultati analize z metodo cDNA-AFLP, nato rezultati analize GeneSnare, nazadnje pa še primerjava uspešnosti obeh metod.

Pri obeh metodah smo kot vhodni vzorec uporabili iz mRNA prepisano cDNA, ki smo jo v časovnih točkah 10, 20 in 30 dni po okužbi z glivo oziroma (v primeru neokuženih rastlin) vzgoji v rastni komori izolirali iz okuženih (+) in neokuženih (-) rastlin netolerantne sorte Celeia (kratica C) ter iz tolerantne sorte Wye Target (kratica WT), (glej Preglednico 1 v poglavju 3.3).

4.1 POMNOŽEVANJE IN IZOLACIJA DIFERENCIALNO IZRAŽENIH FRAGMENTOV

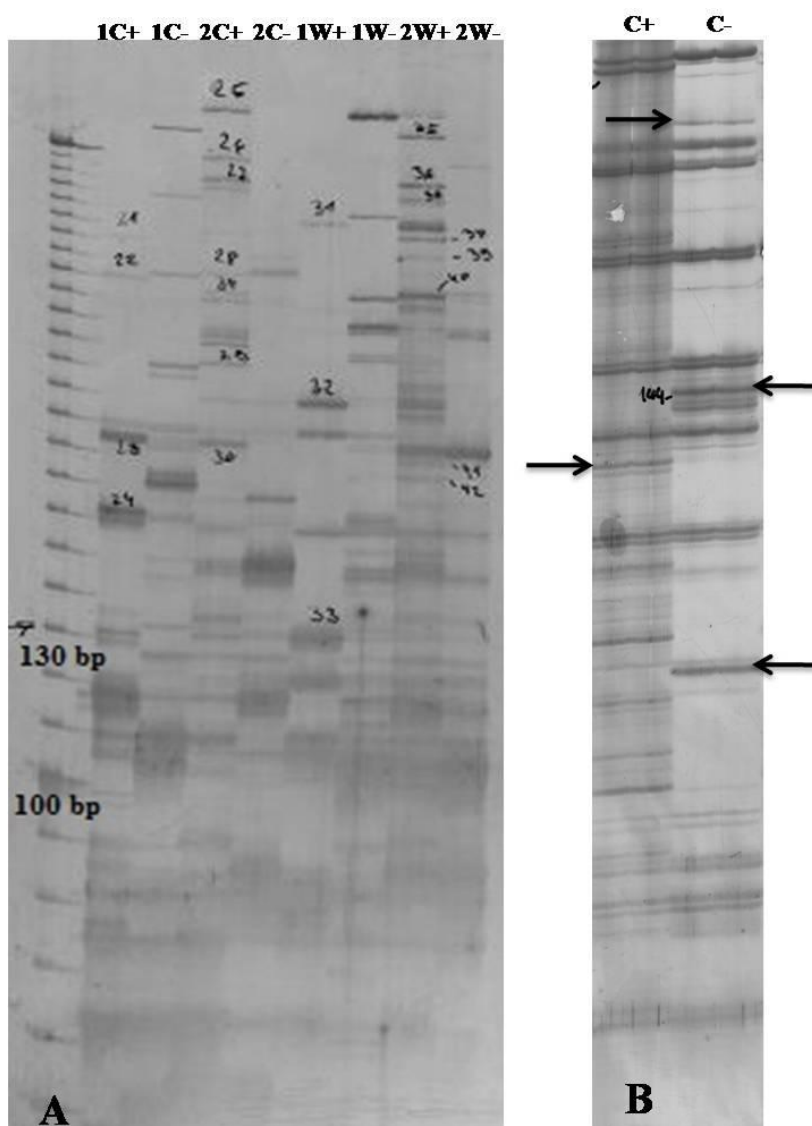
4.1.1 cDNA-AFLP

Za pomnoževanje restrikcijsko razrezanih molekul cDNA (glej poglavje 3.4.6), smo uporabili 22 kombinacij začetnih oligonukleotidov (Preglednica 2) *Pst*I in *Mse*I z dvema oz. tremi selektivnimi bazami. Produkta pomnoževanja v verižni reakciji s polimerazo smo ločili na vertikalni denaturacijski sekvenčni elektroforezi (Slika 9), kjer smo za detekcijo pomnoženih fragmentov uporabili barvanje s srebrom, kot je opisano v poglavju 3.4.8.

Kot je razvidno iz Preglednice 2, smo restrikcijske fragmente cDNA uspešno pomnožili in jih ločili na elektroforezi le pri desetih od dvaindvajsetih kombinacij. Dolžino fragmentov na elektroforezi smo določili z dolžinskim standardom z lestvico velikosti 10 bp. V nadaljnjih postopkih izolacije in analize smo uporabili le fragmente, ki so bili dolgi več kot 100 bp, saj na ta način dobimo okrog 60 bp hmeljevega zaporedja cDNA. Krajši fragmenti bi bili namreč – po kloniranju v vektor in določitvi nukleotidnega zaporedja ter odstranjevanju zaporedij vektorja in začetnih oligonukleotidov – prekratki za iskanje podobnosti v nukleotidnih in proteinskih bazah.

Preglednica 2: Analiza cDNA-AFLP: uporabljene kombinacije začetnih oligonukleotidov *PsI* (P+) s tremi selektivnimi bazami in *MseI* (M+) z dvema ali tremi selektivnimi bazami. Znak (+) prikazuje uspešno pomnožitev in ločitev na elektroforezi, znak (-) pa neuspešno pomnožitev ali slab elektroforetski profil.

P+	M+										
	CTG	CG	CA	CAC	CT	CAT	CTC	CTT	CAA	CTA	CAG
AAC	-	+		-	+						-
ACA	-	+	-		+		-	-	-	+	
AGA	+	-	+		+	-	+		-	+	-



Slika 9: Slika prikazuje pomnožene cDNA-AFLP fragmente, ločene na vertikalni denaturacijski sekvenčni poliakrilamidni elektroforezi. **A:** Prikaz pomnoženih fragmentov na 8 vzorcih s kombinacijo začetnih oligonukleotidov P-ACA in M-CG: sorti Celeia (C) in Wye Target (W), okužena (+) in neokužena (-), deset (1) oz. dvajset (2) dni po okužbi z glivo. Ob strani je dolžinski standard z lestvico velikosti 10 bp. **B:** Povečan izsek pomnoženih cDNA-AFLP fragmentov s kombinacijo P-AGA in M-CTG dolžine 100-250 bp. Puščice kažejo na diferencialno izražene cDNA-AFLP fragmente.

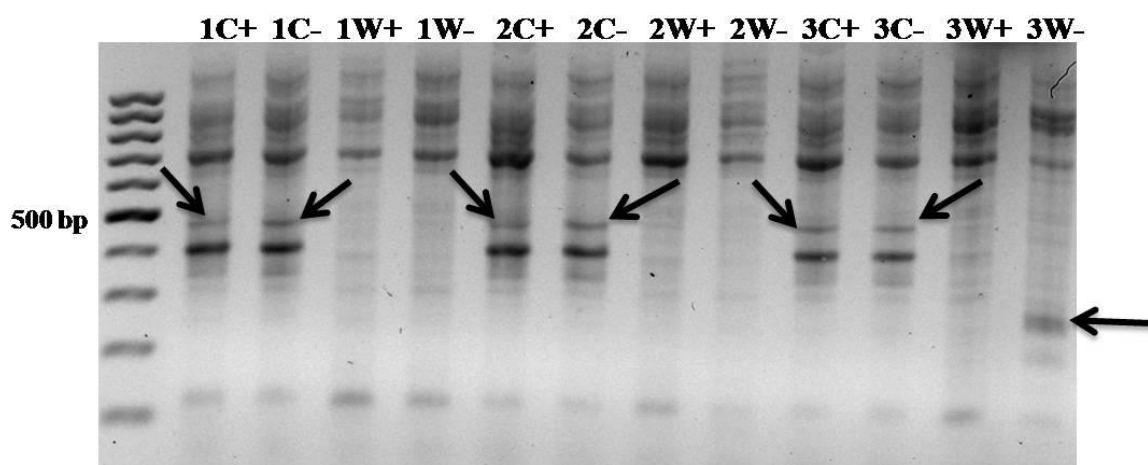
Izbrane diferencialno izražene fragmente (DIF), ki so kazali različno izražanje med okuženim in neokuženim vzorcem iste sorte bodisi v enaki bodisi različni časovni točki, ter fragmente, ki so kazali diferencialno izražanje med obema sortama, smo izolirali iz sekvenčnega gela, jih reamplificirali, klonirali in jim z metodami, opisanimi v poglavjih 3.4.9–3.4.13, določili nukleotidno zaporedje. Skupaj smo z desetimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov, izolirali 257 DIF, ki smo jih nato reamplificirali in preverili uspešnost reamplifikacije na 1,4% agaroznem gelu (Slika 11). Uspešno se je reamplificiralo 117 DIF (45,5 % izbranih DIF), ki smo jih ligirali v pGEM-T easy plazmide in transformirali v kompetentne bakterijske celice. Na podlagi belo-modre selekcije smo za vsak fragment izbrali po tri bele (vsebujejo plazmid z DIF) bakterijske kolonije in v verižni reakciji s polimerazo namnožili v plazmid vstavljeni fragment DNA (glej poglavje 3.4.12). Rezultate namnoževanja smo preverili na 1,4% agaroznem gelu in uspešno namnoženim plazmidom, za katere smo na podlagi dolžine ugotovili, da vsebujejo DIF (Slika 11, A), tudi določili nukleotidno zaporedje vstavljenega DIF, z uporabo vektorsko specifičnih začetnih oligonukleotidov T7 ali SP6. Preglednica 3 podrobno prikazuje število izbranih DIF, število uspešno reamplificiranih fragmentov in število reakcij določanja nukleotidnega zaporedja, ki smo jih izvedli na plazmidih, ki so vsebovali DIF, za vse kombinacije začetnih oligonukleotidov.

Preglednica 3: cDNA-AFLP: število izbranih diferencialno izraženih fragmentov (DIF), uspešno reamplificiranih fragmentov in skupno število reakcij določevanja nukleotidnega zaporedja (četrti stolpec) na kombinacijo začetnih oligonukleotidov.

Kombinacija začetnih oligonukleotidov	Število		
	Število izbranih DIF	Število reamplificiranih fragmentov	Število sekvenčnih rkc
P-AGA + M-CTA	48	46	138
P-AGA + M-CTG	69	38	162
P-AGA+ M-CTC	6	5	15
P-AGA + M-CA	14	1	3
P-AGA+ M-CT	16	8	30
P-ACA + M-CTA	20	11	33
P-ACA+ M-CT	9	9	36
P-ACA+ M-CG	59	50	173
P-AAC+ M-CG	5	3	9
P-AAC + M-CT	11	6	24
Skupaj	257	117	623

4.1.2 GeneSnare

V primeru uporabe komercialnega kompleta GeneSnare smo za pomnožitev molekul cDNA uporabili 24 kombinacij začetnih oligonukleotidov (začetni oligonukleotid dT-ACP in 24 različnih začetnih oligonukleotidov ACP s poljubnim dekamernim tarčnim zaporedjem z oznakami ACP1–ACP24). Naključno pomnožene molekule cDNA smo ločili na 1,2% agaroznem gelu (Slika 10). DIF smo izrezali iz gela, jih klonirali in določili njihovo nukleotidno zaporedje (glej poglavja 3.5.3 in 3.4.10–3.4.13).

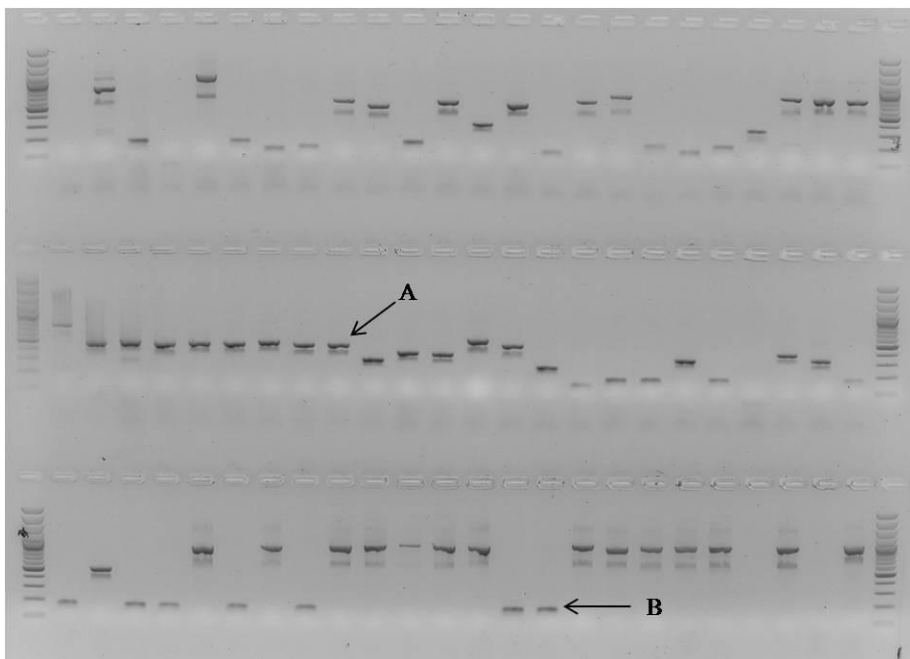


Slika 10: Slika 1,2% agaroznega gela vzorcev hmelja po pomnožitvi z začetnima oligonukleotidoma dT-ACP in ACP8 ter prikaz diferencialno izraženih fragmentov (DIF, označeni s puščicami).

Kot je razvidno iz Preglednice 4, smo z 12 od 24 kombinacij začetnih oligonukleotidov ACP uspešno pomnožili DIF, ki smo jih izrezali iz gela in jim določili nukleotidno zaporedje. Preglednica 4 podrobno prikazuje število izrezanih DIF na posamezno kombinacijo začetnih oligonukleotidov, število analiziranih bakterijskih kolonij in število reakcij določanja nukleotidnega zaporedja. Kot DIF smo izbrali take fragmente, ki so se različno izražali med okuženim in neokuženim vzorcem iste sorte v enaki ali različnih časovnih točkah, ali pa so se pojavili samo pri tolerantni ali netolerantni sorti. DIF smo izbirali tudi na podlagi intenzitete pomnoževanja fragmenta DNA. Pri nekaterih fragmentih smo imeli težave s kloniranjem in nismo dobili zadovoljivega števila belih kolonij, zato se število izbranih kolonij med kombinacijami razlikuje. V kolikor je bilo možno, smo jih izbrali 5–8 (v enem primeru 10), sicer pa smo izbrali vse bele kolonije po transformaciji. Izbranim bakterijam smo v verižni reakciji s polimerazo namnožili v plazmid vstavljen fragment DNA in preverili uspešnost namnoževanja na 1,4% agaroznem gelu (Slika 11).

Preglednica 4: GeneSnare analiza: število določenih in izoliranih diferencialno izraženih fragmentov (DIF), število analiziranih belih bakterijskih kolonij, katerim smo namnožili kloniran DNA fragment v PCR reakciji (BK/fragment) in skupno število reakcij določevanja nukleotidnega zaporedja (število sekvenčnih rkc) na kombinacijo začetnih oligonukleotidov.

Kombinacija začetnih oligonukleotid ov (dT-ACP +)	Število izrezanih		Število sekvenčnih
	DIF	BK/fragment	rkc
ACP1	14	3–8	45
ACP2	8	5–8	26
ACP3	1	5	1
ACP4	2	2–5	5
ACP5	1	5	4
ACP6	3	5	6
ACP7	3	5	0
ACP8	5	4–8	15
ACP9	0	0	0
ACP10	1	5	0
ACP11	3	8	4
ACP12	0	0	0
ACP13	5	1–8	10
ACP14	0	0	0
ACP15	0	0	0
ACP16	13	1–10	68
ACP17	0	0	0
ACP18	0	0	0
ACP19	0	0	0
ACP20	1	6	4
ACP21	6	6	20
ACP22	0	0	0
ACP23	0	0	0
ACP24	0	0	0
Skupaj	66		208 (416)



Slika 11: Prikaz plazmidov namnoženih v verižni reakciji s polimerazo in ločenih na 1,4% agaroznem gelu. Ob strani je dolžinski standard lestvice 100 bp. A: plazmid, ki vsebuje DIF. B: prazen plazmid (brez vstavljenega DNA fragmenta, pomnoži se samo del vektorske DNA).

Nukleotidno zaporedje smo določili le tistim plazmidom, za katere smo na podlagi dolžine določili, da vsebujejo DIF. Reakcijo določanja nukleotidnega zaporedja smo izvedli z uporabo obeh vektorsko specifičnih začetnih oligonukleotidov, T7 in SP6. Pomnoževanje molekul cDNA je pri metodi GeneSnare izvedeno tako, da se na koncu ohrani poli-A oz. poli-T rep. Polinukleotidni deli DNA v procesu določanja nukleotidnega zaporedja motijo reakcijo na način, da se reakcija zaustavi, rezultat pa je neuspešna določitev nukleotidnega zaporedja. Ker nismo mogli predvidevati, v kateri smeri se je DIF vključil v uporabljeni T plazmid, smo morali nukleotidno zaporedje določiti z obeh strani (torej z obema začetnima oligonukleotidoma). V večini primerov je tako uspela le ena od sekvenčnih reakcij, kar razloži večje število izločenih zaporedij pri obdelavi s programom CodoneCode Aligner. Skupaj smo nukleotidno zaporedje poskušali določiti 208 v plazmide vstavljenim DIF (skupaj 416 reakcij določanja nukleotidnega zaporedja).

4.2 OBDELAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ IN ISKANJE PODOBNOSTI V PODATKOVNIH BAZAH

4.2.1 cDNA-AFLP

Nukleotidno zaporedje smo tako določili 623 plazmidom z diferencialno izraženimi fragmenti. Kromatogramske datoteke z rezultati določevanja nukleotidnega zaporedja smo pregledali in obdelali s programom CodoneCode Aligner različice 2.0.6 (glej poglavje

3.6.2). Pred začetkom obdelovanja smo 4 zaporedja zaradi izredno slabe kakovosti izločili (niso upoštevana v nadaljnjih rezultatih). Tako je v obdelavo šlo 619 nukleotidnih zaporedij, v skupni dolžini 158.488 bp in povprečne dolžine 256 bp.

Vsa zaporedja smo najprej pregledali in izločili tiste, ki so bili krajši od 70 bp (73 zaporedij, 11,7 %). Nato smo preostalim zaporedjem odstranili ostanke vektorja in AFLP adapterjev ter ponovno pregledali njihovo dolžino in kakovost. Odstranili smo še 91 zaporedij (14,7 %), ki so bila slabe kakovosti ali zelo kratka. Skupaj smo iz analize izločili 164 zaporedij (26,5 %).

Po odstranjevanju slabih zaporedij nam je ostalo še 455 nukleotidnih zaporedij v skupni dolžini 67.157 bp in povprečne dolžine 148 bp. Ta zaporedja smo nato – pod pogoji, zapisanimi v poglavju 3.6.1 – poskusili združiti v soseske. Uspešno smo združili 412 zaporedij (90,5 % vseh dobrih zaporedij) v 90 sosesk. Ostalih 43 zaporedij pa je bilo enkratnih. Tako smo za nadaljnjo analizo dobili 133 zaporedij v skupni dolžini 18.935 bp (skupna dolžina sosesk je znašala 14.243 bp, skupna dolžina enkratnih zaporedij pa 4.692 bp) ter povprečne dolžine 142 bp (povprečna dolžina sosesk je bila 158 bp, povprečna dolžina enkratnih zaporedij pa 109 bp). Zaporedja smo predložili v GenBank, kjer so jim bile dodeljene akcesijske številke HO059058 do HO059190.

Vseh 133 nukleotidnih zaporedij smo s pomočjo programskih orodij NetBLAST in BLAST po postopku, opisanem v poglavju 3.6.2, primerjali z znanimi nukleotidnimi oziroma proteinskimi zaporedji. Največ pozornosti smo posvetili pregledu zadetkov, ki smo jih s pomočjo algoritma BLASTX pridobili v podatkovnih bazah UniProtKB/Swiss-Prot (S-Prot), UniProtKB/TrEMBL (TrEMBL) in »nr«. Na dan, ko smo izvedli iskanje podobnosti je baza S-Prot vsebovala 30.465 zaporedij, TrEMBL pa 728.456 zaporedij.

Preglednica 5 prikazuje primerjalno analizo zadetkov, dobljenih z vsemi tremi podatkovnimi bazami, in vsebuje le zadetke z rastlinskimi zaporedji, ki so imela E vrednost manjšo ali enako 10^{-5} . Pri rezultatih v bazi »nr« smo dobili tudi nekaj nerastlinskih zadetkov, saj ta baza vsebuje tudi zaporedja drugih organizmov. Takih zadetkov je bilo 10 (7,5 % vseh izbranih zaporedij) in jih v nadaljnji analizi ne glede na E vrednost nismo upoštevali. Pomembnih zadetkov med vsemi podatkovnimi bazami (pomemben zadek v vsaj eni od treh baz) je bilo skupaj 43oz. 32,3 % zadetkov med 133 zaporedji. Povprečna dolžina pomembnih zadetkov je bila 182 bp s standardno deviacijo 75,9 bp.

S primerjanjem v bazi S-Prot smo dobili 14 (10,5 % med 133 zaporedji) pomembnih zadetkov, v TrEMBL je bilo pomembnih zadetkov 40 (30,1 %), v bazi »nr« pa smo dobili 34 (25,6 %) pomembnih zadetkov.

V Preglednici 5 so posebej označena tri zaporedja, ki kažejo možno funkcijo v povezavi z obrambo rastline pred stresom. Zaporedja so predstavljena v Preglednici 6, kjer je opisana tudi njihova funkcija in iz katerega vzorca so bila izolirana. Preostala zaporedja kažejo podobnost s proteini, ki imajo različne vloge – od metaboličnih encimov, strukturnih proteinov, encimov, ki sodelujejo pri mitozii, in proteinov, ki še niso bili okarakterizirani.

Poleg zgoraj navedenih iskanj podobnosti smo uporabili tudi algoritem BLASTN za primerjavo naših zaporedij DNA z zaporedji DNA v podatkovnih bazah. S strežnika Plant Genome Database smo prenesli bazo 9.789 EST hmelja in z njimi primerjali naša zaporedja. EST so zaporedja prepisanih cDNA, katerim so nukleotidno zaporedje določili z eno samo sekvenčno reakcijo (angl. single pass sequences) in običajno predstavljajo dele genov, ki se dejansko izražajo v tkivu, iz katerega so bila izolirana. Z zadetki z EST hmelja smo potrdili, da smo izolirali zaporedja DIF, ki se izražajo in prepišejo v protein, in da leta dejansko izvirajo iz hmelja. Izmed 133 pregledanih zaporedij jih je 5 (3,8 %) kazalo pomembno podobnost z že znanimi EST hmelja. Prikazani so v Preglednici 7.

Z algoritmom BLASTN smo opravili tudi iskanje podobnost v bazah »nr« in EST ('est_others'). Prva vsebuje vsa nepresežna zaporedja DNA razen EST, druga pa vsebuje vsa EST razen EST miši in človeka. Namen te primerjave je bil odkritje morebitnih zaporedij, ki bi bila npr. glivnega izvora, ali genomskih kontaminacij nekodirajoče DNA. Med 133 zaporedji cDNA-AFLP fragmentov nismo našli zaporedij, ki bi izhajala iz glive *Verticillium spp.*

Preglednica v Prilogi A prikazuje, iz katerega vzorca je bil posamezen cDNA-AFLP fragment izoliran. V primeru sosesk so lahko združeni fragmenti iz več vzorcev.

Preglednica 5: Primerjalna analiza pomembnih zadetkov primerjave cDNA-AFLP fragmentov v treh podatkovnih bazah (S-Prot, TrEMBL in »nr«), opravljena z algoritmom BLASTX. Prikazana je dolžina našega zaporedja v baznih parih, dolžina proteinskega zadetka (s številom aminokislin -AA), vrednost E, odstotek ujemanja in podobnost z znanimi oz. predvidenimi proteini.

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
100-ICEL+295-17feb09	262	1C+	61	84	84	2,00E-10	8,00E-27	1E-25	40%	77%	77%	Sekologanin sintaza, C72A1_CATRO	Ogrodje 19 kromosoma 15, A7PK66_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002270018
102-ICEL+245-17feb09	209	1C+		52	52		4,00E-17	6E-16		84%	84%		Homneven neokarakteriziran protein, A5ATV6_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002270158
105-ICEL+208_114-IICEL+210-17feb09	173	1C+ in 2C+	58	57	57	3,00E-09	2,00E-27	3E-26	41%	100%	100%	S cisteinom bogata receptorju podobna protein-kinaza, CRK10_ARATH	Ogrodje 16 kromosoma 17, A7PGV6_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002278538
108-ICEL-160-17feb09	124	1C-	22	22	22	3,00E-05	5,00E-06	6,00 E-05	77%	95%	95%	Heparanazi podoben protein 3, HPSE3_ARATH	Heparanaza, domnevna, B9RP09_RICCO	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002263173
111-IICEL+350-17feb09	333	1C+		110	110		3,00E-57	2,00 E-37		100%	100%		Ogrodje 44 kromosoma 17, A7Q1F1_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002265367
114-IICEL+210-17feb09	133	2C+	26	26	26	3,00E-04	2,00E-05	3,00 E-04	69%	92%	92%	Neokarakteriziran protein At4g01050, Y4105_ARATH	Ogrodje 40 kromosoma 15, A7PZU0_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CAO39741

Se nadaljuje

Javornik Cregeen S. Diferencialno izražanje genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*
Dipl.delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
115-ICEL+_23- ICEL+_30- ICEL+_41- IIWT+	150	1C+, 2C+ in2W+	29	29	49	6,00E-09	1,00E-08	2,00 E-08	86%	100%	67%	Coatomer subunit beta'-2, COB22_ARATH	Ogrodje 7 kromosoma 9, A7P7E9_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002284773
117-ICEL+370- 17feb09	357	2C+	51	51	51	6,00E-08	5,00E-11	6,00 E-10	54%	64%	64%	Sintaksin-22, SYP22_ARATH	Ogrodje 11 kromosoma 2, whole genome shotgun sequence, A5BYQ4_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002278649
122-ICEL+280- 17feb_31- IWT+275-9sep	250	2C+ in 1W+	83	83	83	3,00E-33	5,00E-44	7,00 E-43	73%	97%	97%	Oligopeptidni prenašalec 6, OPT6_ARATH	Prenašalec peptidov/glutaciona OPT1, Q84V29_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002275134
12-ICEL+260- 9sep	209	1C+		45	45		7,00E-20	9,00 E-19			100%	100%	Ogrodje 7 kromosoma 9, A7P7T1_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002281742
16-ICEL+150- 9sep	61	1C+		20	20		2,00E-04	2,00 E-03			95%	95%	Ogrodje 342 nedoločenega kromosoma, A7R196_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002269491
1-ICEL+152-9sep	119	1C+		32	17		4,00E-10	0.52			100%	100%	Ogrodje 1 kromosoma 18, A7NT28_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002280787
21-ICEL+-270- 9sep	236	1C+	60	60	60	9,00E-23	3,00E-25	4,00E-24	65%	76%	76%	Osnovni modri protein, BABL_CUCSA	Basic blue copper protein, Q9ZRV5_CICAR	Basic blue copper protein [Cicer arietinum], CAA10134

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
24-ICEL+160-9sep	127	1C+	26	29	29	1,00E-08	2,00E-10	3,00E-09	84%	89%	89%	Transkripcijski faktor WRI1 odziven na etilen, WRI1_ARATH	Transkripcijski faktor z AP2 domeno, B9HV97_POPTR	Transkripcijski faktor z domeno AP2 [Populus trichocarpa], XP_002315794
27-IIICEL+_36IIWT+305-9sep	270	2C+ in 2W+		39	39		1,00E-13	2,00E-12		84%	71%		Ogrodje 42 kromosoma 7, A7Q097_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002267192
2-ICEL+205-9sep	169	1C+		53			1,00E-18			77%			Podenota kompleksa za preoblikovanje kromatina, B9HM77_POPTR	
35-IIWT330-9sep	316	2W+		64	64		6,00E-20	7,00E-19		79%	79%		Ogrodje 132 kromosoma 2, A7QNF6_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002276602
38-IIWT+270-9sep	243	2W+		34	34		2,00E-12	3,00E-11		97%	97%		domnevni neokarakteriziran protein, A5AK20_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], CAN62559
43-IIICEL+_47-IIICEL-	190	2C+ in 3C-		26	26		5,00E-07	7,00E-06		96%	96%		Ogrodje 48 kromosoma 13, A7Q3S8_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002274265
44-IWT-_45IIICEL-_46-IIWT+_225	194	2C-, 2W+ in 1W-	26	31	31	4,00E-04	7,00E-10	9,00E-09	65%	100%	100%	G2/mitotično-specifičen ciklin-1, CCN1_ANTMA	Ogrodje 15 kromosoma 6, A7PG02_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002268488

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
48-IIICEL+165-9sep	142	2C+		40	40		8,00E-14	1,00E-12		95%	95%		domneven neokarakteriziran protein, A5C775_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], CAN84014
51-IWT+305-9sep	289	1W+		38	39		2,00E-24	2,00E-23		97%	94%		Ogrodje 272 nedoločenega kromosoma, A7QZE9_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CAO17710
52-8IIWT+280-22avg	230	2W+		42	42		2,00E-08	2,00E-07		73%	73%		Domneven neokarakteriziran protein, A5AKS2_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], CAN69141
55-10IIICEL+_56-11IIICEL-22avg	205	2C+ in 3C-		25	25		3,00E-09	4,00E-08		100%	100%		Ogrodje 31 kromosoma 7, A7PUD7_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CAO22560
57-12IIWT-22avg_20-IIIWT+_23-IIIWT+_57-IIWT+9sep_74-26IIICEL-22avg	189	2C+, 2W+, 3W+, 2W-	38	40	40	2,00E-08	3,00E-14	3,00E-13	73%	97%	97%	E3 ubikvitin:protein-ligaza UPL1, UPL1_ARATH	Ogrodje 66 kromosoma 19, A7Q997_VITVI	PREDVIDEN: podoben E3 ubikvitin:protein-ligazi UPL1 [Vitis vinifera], XP_002268896
69-21_IIICEL-170_83-63IIICEL-.3-165-22avg	90	2C+		29			1,00E-04						Domneven nedoločen protein, A5BSJ0_VITVI	
71-23IIWT-169-22avg	66	2W-		20	20		5,00E-04	6,00 E-03		100%	100%		Domneven neokarakteriziran protein, A5BZ86_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], CAN81630

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
72-24IIWT+165-22avg	76	2W+	25	25	25	1,00E-07	2,00E-06	2,00E-05	96%	100%	100%	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reductaza, HMDH_NICSY	Ogrodje 162 kromosoma 4, A7QSS5_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002265638
95-ICEL+180-25sep	137	1C+		34	34		1,00E-12	2,00E-11		97%	97%		Ogrodje 1329 nedoločenega kromosoma, A7R6L3_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CAO65951
9-IIWT+-330-9sep	270	2W+		44	44		2,00E-18	2,00E-05		100%	100%		Ogrodje 34 kromosoma 8, A7PW18_VITVI	PREDVIDENA: hipotetična izooblika proteina 2 [Vitis vinifera], XP_002281179
10-IIWT+.2-400-9sep	112	2W+		37	37		8,00E-14	1,00E-12		97%	97%		Ogrodje 72 kromosoma 5, A7QAZ3_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CAO46352
112-IICEL-.1-260-17feb09	231	2C-	33	33	33	6,00E-11	2,00E-11	7,4	87%	96%	96%	Akonitat-hidrataza, citoplazmatska, ACOC_SOLTU	Ogrodje 36 kromosoma 12, A7PXG0_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002279260
180-IWT+.2-200-29maj	175	1W+		33	24		3,00E-12	6,00E-07		90%	100%		Ogrodje 3 kromosoma 6, A7P013_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002283332

Se nadaljuje

Javornik Cregeen S. Diferencialno izražanje genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*
Dipl.delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
18-ICEL+.2-230-9sep_1	182	1C+	40	41	41	5,00E-05	3,00E-16	4,00E-15	42%	100%	100%	Sekologanin sintaza, C72A1_CATRO	Ogrodje 1 kromosoma 18, A7NTF8_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002281648
26-IICEL+.1-320-9sep_1	292	2C+		72	20		3,00E-19	8,00 E-02		66%	95%		Ogrodje 36 kromosoma 12, A7PX42_VITVI	PREDVIDEN: podoben proteinu s SNF2 domeno, XP_002269303
33-IWT+.2-130-9sep_1	94	2C+		30	30		7,00E-10	9,00E-09		100%	100%		Ogrodje 3 kromosoma 6, A7P0A7_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002283740
33-IWT+.3-130-9sep	96	1W+	27	27	27	1,00E-08	2,00E-09	2,00E-08	85%	100%	100%	ABC prenašalec B family member 4, AB4B_ARATH	Ogrodje 2 kromosoma 5, A7NW00_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002275169
34-IICEL+.2-240-9sep_1	210	2C+		69	69		5,00E-34	8,00E-23		100%	100%		Ogrodje 3 kromosoma 6, A7NZG2_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002284994
4-IICEL+.3-150-9sep	113	2C+		35	37		4,00E-13	6,00E-13		100%	97%		Ogrodje 36 kromosoma 12, A7PX56_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002270488
61-14_2IIIWT+.2-220-22avg	98	3W+		32	32		3,00E-10	4,00E-09		100%	100%		Ogrodje 23 kromosoma 8, A7PP16_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002278801

Se nadaljuje

Javornik Cregeen S. Diferencialno izražanje genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*
Dipl.delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost	
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL
63-16_IICEL+.1-200-22avg	167	1C+		55	55	5,00E-22	3,00E-27		83%	100%		Ogrodje 52 nedoločenega kromosoma, A7Q559_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002275176
67-19IICEL-.3-185-22avg	115	2C-		38	38	1,00E-15	1,00E-14		100%	100%		Ogrodje 19 kromosoma 15, A7PKH9_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CAO70605
96-ICEL+.3-165-25sep	121	1C+	27	27		3,00E-11	4,00E-10		85%	88%	Transkripcijski faktor 1 zaporedja MADS, MTF1_PEA	Ogrodje 101 kromosoma 17, A7QHX9_VITVI	

Javornik Cregeen S. Diferencialno izražanje genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*
Dipl.delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Preglednica 6: cDNA-AFLP zaporedja, ki kažejo podobnost s proteini z možno funkcijo povezano z obrambo rastlin v stresnih pogojih. Prikazano je tudi, iz katerega vzorca je bilo zaporedje izolirano.

Zaporedje	Dolžina zaporedja	Vzorec	S-Prot	Podobnost		Možna funkcija
				TrEMBL	nr	
122-IIICEL+280-17feb_31-IWT+275-9sep	250	2C+ in 1W+	Oligopeptidni prenašalec 6, OPT6_ARATH	Prenašalec peptidov/glutaciona OPT1, Q84V29_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002275134	Vključen v energijsko-odvisno translokacijo tetra- in pentapeptidov preko celične membrane. Tudi prenašalec derivatov glutaciona in kovinskih kompleksov, možna tudi vloga pri odpornosti na stres.
24-ICEL+160-9sep	127	1C+	Transkripcijski faktor WRI1 odziven na etilen, WRI1_ARATH	Transkripcijski faktor z domeno AP2, B9HV97_POPTR	Transkripcijski faktor z domeno AP2 [Populus trichocarpa], XP_002315794	Možna udeležba v regulaciji ekspresije genov zaradi stresnih faktorjev in komponent stresnih signalnih transdukcij.
72-24IIWT+165-22avg	76	2W+	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktaza, HMDH_NICSY	Ogrodje 162 kromosoma 4, A7QSS5_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002265638	Katalizira sintezo mevalonata, specifičnega prekurzorja vseh izoprenoidnih spojin v rastlinah. Možna vloga v obrambnih mehanizmih rastline in celičnem ciklu.

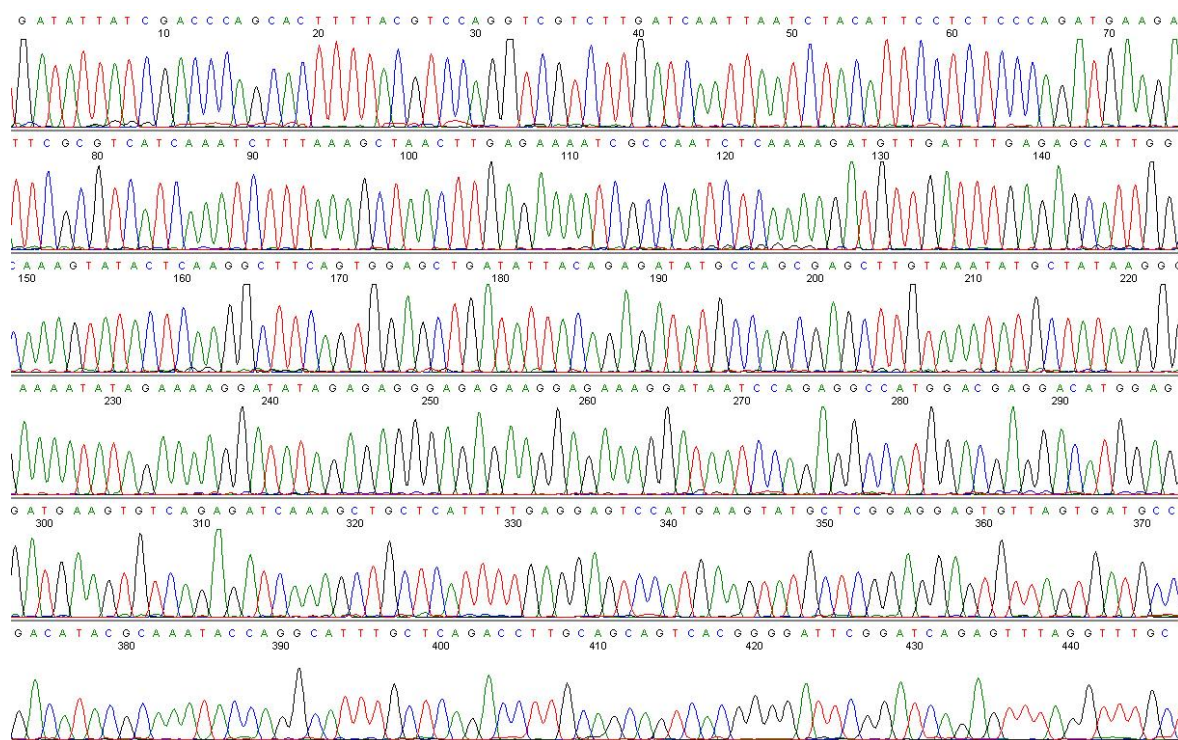
Preglednica 7: Prikaz zadetkov BLASTN cDNA-AFLP zaporedij v lokalni bazi EST hmelja.

Zaporedje	Številka zaporedja v Plant GDB bazi EST hmelja	Dolžina zaporedja [bp]	Dolžina zadetka [bp]	Ujemanje [%]	Vrednost E
117-IIICEL+370-17feb09	6305	357	151	84 %	2,00E-24
43-IIICEL+_47-IIICEL-	6723	190	69	89 %	1,00E-17
112-IIICEL-.1-260-17feb09	9188	231	67	87 %	7,00E-11
96-ICEL+.3-165-25sep	8345	121	109	91 %	7,00E-31

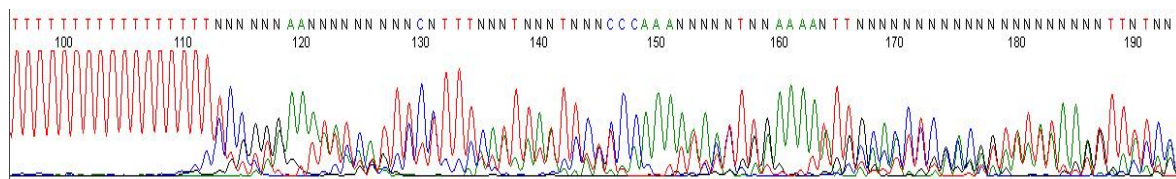
4.2.2 GeneSnare

Tudi v primeru metode GeneSnare smo kromatogramske datoteke z zaporedji izbranih DIF pregledali in obdelali s programom CodoneCode Aligner različice 2.0.6. Že na začetku smo izmed 416 zaporedij 5 zaporedij izločili zaradi preslabe kakovosti. V nadaljnji obdelavi smo tako obravnavali 411 nukleotidnih zaporedij v skupni dolžini 221.528 bp in povprečne dolžine 539 bp.

Najprej smo preverili, kateremu od zaporedij je bilo nukleotidno zaporedje uspešno določeno (tistemu z začetnim oligonukleotidom T7 ali tistemu z začetnim oligonukleotidom SP6; glej Sliki 12 in 13), in odstranili ostanke vektorja ter začetnih oligonukleotidov ACP. Slabše zaporedje smo odstranili, tudi v primeru, da je bilo zaporedje po očiščenju prekratko ali pa preslabe kakovosti. V nekaterih primerih se je zgodilo, da je bilo nukleotidno zaporedje uspešno določeno z obema začetnima oligonukleotidoma, ker je zaporedju manjkala regija poli-A oz. je polimeraza lahko to regijo prešla. V takih primerih smo obdržali obe zaporedji. Na ta način smo odstranili skupno 216 zaporedij (52,6 %).



Slika 12: Primer kromatograma uspešno določenega nukleotidnega zaporedja fragmenta 1-1_T7 dobljenega s poljubnim začetnim oligonukleotidom ACP1. Zaporedje je bilo določeno z začetnim oligonukleotidom T7, na sliki pa je prikazano zaporedje od 1 do 446 bp od celotne dolžine 719 bp.



Slika 13: Primer kromatograma istega zaporedja DNA kot na Sliki 11, kjer nukleotidno zaporedje ni bilo uspešno določeno. Prikazano je zaporedje 1-1_SP6, ki je komplementarno zaporedju 1-1_T7, vendar pa je reakcija določanja nukleotidnega zaporedja v primeru začetnega oligonukleotida SP6 potekala s strani, kjer DIF vsebuje poli-T zaporedje, ki onemogoča uspešno izvedbo sekvenčne reakcije. Homopolimerne regije so znane kot zelo težavne pri določanju nukleotidnega zaporedja.

Ostalo nam je 195 uporabnih nukleotidnih zaporedij, ki smo jih poskušali združiti v sošeske. Skupna dolžina zaporedij je bila 77.497 bp, povprečna dolžina zaporedja pa 397 bp. V 31 sošesk smo uspešno združili 142 zaporedij (72,8 %), preostalih 53 zaporedij pa je bilo enkratnih. Za iskanje podobnosti z znanimi nukleotidnimi oz. proteinskimi zaporedji smo tako dobili 84 zaporedij v skupni dolžini 37.050 bp (skupna dolžina sošesk je znašala 14.459 bp, skupna dolžina enkratnih zaporedij pa 22.591 bp) in povprečne dolžine 441 bp (povprečna dolžina sošesk je znašala 466 bp, povprečna dolžina enkratnih zaporedij pa 426 bp). Zaporedja smo predložili v GenBank, kjer so jim bile dodeljene akcisijske številke HO059191 do HO059274.

84 urejenih zaporedij smo, enako kot v primeru 133 cDNA-AFLP zaporedij, s pomočjo programskih orodij BLAST in NETBLAST primerjali z znanimi proteinskimi oziroma nukleotidnimi zaporedji. Tudi tu smo najpodrobneje analizirali zadetke v proteinskih bazah S-Prot, TrEMBL in »nr«. Na dan iskanja podobnosti je baza S-Prot vsebovala 30.811, baza TrEMBL pa 755.027 zaporedij.

V Preglednici 8 je prikazana primerjalna analiza vseh pomembnih zadetkov (E vrednost manjša ali enaka 10^{-5}) med tremi bazami (S-Prot, TrEMBL in »nr«). Med zadetki v bazi »nr« je bilo nekaj tudi nerastlinskih, ki smo jih tudi v tem primeru ne glede na vrednost E izločili. Takih zadetkov je bilo 22 (26,2 % vseh primerjanih zaporedij). Skupaj je bilo pomembnih zadetkov (tj. pomemben zadetek v vsaj eni ob baz) 46, kar predstavlja 54,8 % pomembnih zadetkov izmed vseh primerjanih zaporedij. Povprečna dolžina pomembnih zadetkov je znašala 542 bp s standardno deviacijo 217,6 bp.

Iskanje podobnosti v bazi S-Prot nam je dalo 28 (33,3 %) pomembnih zadetkov, v TrEMBL 45 (53,6 %) in v »nr« 40 (47,6 %).

V Preglednici 8 so ponovno označena zanimiva zaporedja, pri katerih je že iz njihove funkcijemogoče razbrati, da bi utegnili imeti vlogo pri obrambnih reakcijah rastlin. Taka zaporedja so 4 (4,8 %). Funkcija in podatek, iz katerega vzorca so bili izolirani, sta predstavljena v Preglednici 9.

Uporabili smo tudi algoritem BLASTN za primerjavo GeneSnare zaporedij v lokalni bazi EST hmelja in dveh javnih podatkovnih bazah. Naših 84 zaporedij DNA smo primerjali z 9.789 EST hmelja, med katerimi jih je 36 (46,4 %) kazalo podobnost z že znanimi EST hmelja. Prikazana so v Preglednici 10.

Tako kot pri analizi cDNA-AFLP, smo tudi pri metodi GeneSnare z algoritmom BLASTN preverili podobnost v bazah »nr« in EST (»est_others«), da bi odkrili morebitna zaporedja, ki bi bila npr. glivnega izvora ali bi izhajala iz genomskih kontaminacij nekodirajoče DNA. Tako smo s primerjanjem v bazi EST (»est_others«) odkrili tri (3,6 %) zaporedja, v podatkovni bazi »nr« pa eno zaporedje (1,2 %), ki so kazala podobnost z zaporedji glive *Verticillium spp.* V Preglednici 11 so prikazani zadetki teh zaporedij.

V preglednici v Prilogi B je za vseh 84 edinstvenih cDNA fragmentov prikazano, iz katerega vzorca izhajajo. Enako kot pri cDNA-AFLP zaporedjih lahko posamezna soseška združuje fragmente iz več vzorcev.

Preglednica 8: Primerjalna analiza pomembnih zadetkov primerjave GeneSnare fragmentov v treh podatkovnih bazah (S-Prot, TrEMBL in "nr"), opravljena z algoritmom BLASTX. Prikazana je dolžina našega zaporedja v baznih parih, dolžina proteinskega zadetka (s številom aminokislin -AA), vrednost E, odstotek ujemanja in podobnost z znanimi oz. predvidenimi proteini.

Zaporedje	Dolžna zaporedja [bp]	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
Contig1	1342	2W-	48	81	81	1,5	3,00E-04	1,00 E-03	35%	40%	41%	Protein argonaute MEL1, MEL1_ORYSJ	Domneven neokarakteriziran protein, A5C9U3_VITVI	Hipotetičen protein [Vitis vinifera], XP_002268669
Contig2	827	1C-, 2C-, 1W-	69	85	85	1,4	3,00E-39	3,00E-38	33%	91%	91%	Protein odziven na avksin IAA27, IAA27_ARATH	Domneven neokarakteriziran protein, C6JSL6_SORBI	Hipotetični protein SORBIDRAFT_1368 s002010 [Sorghum bicolor], XP_002488947
Contig3	745	3C+	220	223	223	1,00E-114	1,00E-117	1,00 E-116	94%	96%	96%	14-3-3-like protein, 1433_MESCR	14-3-3 protein, B7UD06_9ROSI	14-3-3 protein [Dimocarpus longan], ACK76233.1
Contig5	728	2C+, 3C+	15	113	113	0,39	9,00E-41	9,00E-40	93%	68%	69%	Podenota 5B citokrom c-oksidade, COX5B_SOLTU	Citokrom C-oksidade, domnevna, B9RV06_RICCO	Citokrom C-oksidade, domnevna [Ricinus communis], XP_002517575.1
Contig7	656	3C-, 1W-	144	142	142	6,00E-21	2,00E-36	3,00E-35	42%	56%	56%	Salt tolerance-like protein, STH_ARATH	Protein za toleranco na slanost, domneven, B9T7C0_RICCO	Protein za toleranco na slanost, domneven [Ricinus communis], XP_002534139.1
Contig8	606	3C-, 1W-	56	110	110	3,2	2,00E-44	2,00E-12	23%	86%	86%	UPF0497 membranski protein At4g11655, U4970_ARATH	Iron-sulfer cluster scaffold protein ISU1, B8R1J5_EUCGR	Iron-sulfer cluster scaffold protein ISU1 [Eucalyptus grandis], ACI47519.1

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžna zaporedja [bp]	vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
Contig9	598	1W-	155	155	155	1,00E-59	1,00E-61	1,00E-60	70%	75%	75%	Delta veriga ATP sintaze , kloroplastna, ATPD_TOBAC	ATP sintaza, B9MW43_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002327324.1
Contig10	511	2W-	66	132	132	0,62	4,00E-06	1,00E-06	28%	34%	34%	DEAD-zaporedje ATP-odvisne RNA helikaze 40, RH40_ARATH	Kloroplastno usmerjeni bakrov šaperon, domneven, B9RFA4_RICCO	Kloroplastno usmerjeni bakrov šaperon, domneven [Ricinus communis], XP_002512423.1
Contig11	455	1W- 1W+, 2W+, 3W+	33	79	79	4,2	3,00E-31	3,00E-30	36%	82%	82%	Dioksisigenaza 7, ki cepi karotenoide, kloroplastna, CCD7_ARATH	Ogrodje 6 kromosoma 4, A7P4P1_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002280239.1
Contig12	454	3W+	34	54	55	0,83	1,00E-05	1,00E-04	41%	44%	43%	Protein B4 podoben celulozni sintazi, CSLB4_ARATH	Domeneven neokarakteriziran protein, A5AYS3_VITVI	Hipotetični protein, XP_002264911.1
Contig13	359	2W-	48	48	48	3,00E-10	2,00E-10	3,00E-09	58%	64%	66%	ATPaza RAN1, ki prenaša baker, AHM5_ARATH	Heavy metal ATPaza, B9GYA1_POPTR	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CBI27210.1
Contig14	450	2C+, 1W+, 2W+	59	65	65	2,00 E-03	1,00E-08	2,00E-07	27%	43%	43%	Domnevna s cisteinom bogata receptorju podobna protein-kinaza 43, CRK43_ARATH	Ogrodje 3 kromosoma 6, A7NZY3_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CBI16443.1

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžna zaporedja [bp]	vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
Contig18	405	1C+, 3C+, 2W+, 3W-	33	46	46	4,3	3,00E-17	4,00E-16	33%	89%	89%	Protein ycf2, YCF2_MARPO	Neokarakteriziran protein, B9T737_RICCO	Ohranjen hipotetični protein, XP_002534056.1
Contig21	322	3C+, 2W+	36	54	54	3,9	9,00E-24	1,00E-22	30%	90%	90%	Protein-kinaza in protein z domeno podobno PP2C, P2C04_ORYSJ	Domeneven neokarakteriziran protein, C6TGB4_SOYBN	Neznan [Glycine max], ACU20866.1
Contig23	333	3C-	59	56	42	1,00E-23	3,00E-24	5,00E-08	86%	89%	92%	Homolog transkripcijskega podaljševanega faktorja 1, ELOF1_ORYSJ	Transkripcijski podaljševalni faktor, domneven, B9S937_RICCO	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002316799
Contig24	294	1C+, 2C+, 1W+, 3W-	40	40	40	5,00E-16	4,00E-16	5,00E-15	90%	95%	95%	Acyl-CoA vezavni protein, ACBP_RICCO	Predvideni protein, B9MUD8_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002303469
Contig27	208	3W-	54	54	34	8,00E-22	2,00E-22	1,00E-10	85%	90%	94%	Akonitat hidrataza 2, mitohondrijska, ACO2M_ARATH	Ogrodje 36 kromosoma 12, A7PXB6_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002279260
Contig28	197	3W-	14	46	46	6,6	2,00E-05	3,00E-04	71%	58%	58	Natrijev/vodikov izmenjevalec 7, NHX7_ARATH	Ogrodje 3 kromosoma 6, A7P0B6_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CBI16561
Contig31	167	3C-	42	42	42	2,00E-16	1,00E-16	2,00E-15	90%	90%	90%	60S ribosomski protein L17-2, RL172_ARATH	Neokarakteriziran protein, A9PIV5_9ROSI	Neznan [Populus trichocarpa], ABK93848

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžna zaporedja [bp]	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
1-1_T7	719	1C-	177	176	176	2,00E-73	5,00E-75	6,00E-74	79%	81%	81%	Cell division cycle protein 48 homolog, CDC48_SOYBN	Prehodna ATPaza endoplazemskega retikuluma, domnevna [Ricinus communis], B9S0I3_RICCO	Prehodna ATPaza endoplazemskega retikuluma, domnevna [Ricinus communis], XP_002519502
1-3_SP6	656	1C-	188	188	178	1,00E-77	1,00E-88	2,00E-46	68%	82%	84%	Protein-fosfataza 2C 57, P2C57_ARATH	Protein-fosfataza , domnevna B9T8J0_RICCO	Protein-fosfataza , domnevna [Ricinus communis], XP_002534559
15-3_T7	680	1W-	48	48	48	3,00E-19	1,00E-19	1,00E-18	89%	95%	95%	Z glicinom bogat RNA vezavni protein, GRP1_DAUCA	Predviden protein, A9P8Z7_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002305429
16-6_T7	705	3C+	159	159	159	2,00E-61	8,00E-60	5,00E-59	71%	70%	71%	Hevamin-A, CHLY_HEVBR	Kisla hitinaza, Q71HN4_FICAW	Hevamin-A, P23472
17a-3_T7	596	3W+	42	62	63	2,00E-15	3,00E-16	2,00E-15	83%	69%	68%	Topna anorganska pirofosfataza, IPYR_SOLTU	Ogrodje 37 kromosoma 15, A5BPY8_VITVI	Neimenovan prodeinski produkt [Vitis vinifera], CBI38728
19-1_SP6	616	1W+	158	147	185	1,00E-53	2,00E-68	2,00E-64	67%	80%	71%	Zinc finger CCCH domain-containing protein 49, C3H49_ORYSJ	Ogrodje 3 kromosoma 6, A7NYL7_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002280897
2-4_T7	782	1W-	167	207	207	2,8	3,00E-81	4,00E-80	22%	71%	71%	60 kDa šaperonin, kloroplastni, CH60_PORPU	Neokarakteriziran protein, C6TNC5_SOYBN	Neznan [Glycine max], ACU24417

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžna zaporedja [bp]	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
25-2_T7	504	1W-	94	141	138	1,00E-09	2,00E-45	4,00E-32	39%	58%	60%	Giberelin receptor GID1, AGI_ORYSJ	CXE karboksilesteraza, Q9XFF2_ORYRU	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], EEY22269
3-1_T7	448	2C+	42	101	101	3,1	3,00E-19	4,00E-18	38%	49%	49%	Homeobox protein knotted-1-like 1, KNAP1_MALDO	Predviden protein, B9I2C4_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002318507
3-2_SP6	479	2C+	67	60	60	0,42	4,00E-07	8,00 E-03	28%	41%	41%	ABC prenašalec C družinski član 10, AB10C_ARATH	Predviden protein, B9H6F5_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002307261
3-3_T7	366	2C+	64	62	44	1,00E-29	2,00E-31	8,00E-22	87%	85%	88%	neokarakteriziran protein, Y2309_ARATH	Neokarakteriziran protein, B4UWA0_ARAHY	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002285206
3-4_T7	522	2C+	97	98	98	6,00E-31	1,00E-32	9,00E-32	65%	72%	71%	Trans-cimetna 4- monooksigenaza, TCMO_CATRO	Cimetna kislina 4- hidroksilaza, C0KKW6_HUMLU	Cimetna kislina 4- hidroksilaza [Humulus lupulus], ACM69364
34-1_T7	552	2W-	113	120	120	4,00E-52	9,00E-54	9,00E-53	83%	85%	85%	FK506-vezavni protein 2, FKB15_VICFA	Predviden protein, A9PH03_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002301808
3-5_T7	495	2C+	107	107	107	9,00E-42	2,00E-40	1,00E-39	76%	78%	78%	60S ribosomski protein L23A, RL23A_FRIAG	Predviden protein, B9IIV1_POPTR	Podoben 60S ribosomskemu proteinu L23A izoformi 2 [Vitis vinifera], XP_002284448

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžna zaporedja [bp]	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
40-2_T7	725	3C+	162	156	156	1,00E-24	2,00E-62	3,00E-61	35%	71%	71%	Protein TRANSPARENT TESTA 12, TT12_ARATH	Ogrodje 16 kromosoma 17, A7PH11_VITVI	Neimenovan proteinski produkt [Vitis vinifera], CBI15521
4-1_T7	358	2C+	40	47	47	2,00E-06	5,00E-11	6,00E-10	60%	65%	65%	Transkripcijski faktor GLABRA 3, GL3_ARATH	Predviden protein, B9GQ94_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002301357
46-4_T7	198	3W-	58	56	56	9,00E-16	4,00E-16	5,00E-15	56%	58%	58%	Histon-lizin N-metiltransferaza, H3 lizin-9 specifični SUVH1, SUVH1_TOBAC	Protein s SET domeno, B9IHH8_POPTR	Protein s SET domeno [Populus trichocarpa], XP_002323201
47-1_SP6	674	1C-	128	128	128	2,00E-26	9,00E-47	1,00E-33	45%	63%	63%	Možni ADP-ribozilacijski faktor; Protein, ki aktivira GTPaze, AGD11_ARATH	ARF aktivator GTPaz, domneven B9T6Z1_RICCO	ARF aktivator GTPaz, domneven [Ricinus communis], XP_002534010
48-2_T7	584	2C-	111	107	107	2,00E-40	6,00E-48	6,00E-47	72%	88%	88%	SKP1-podoben protein 1A, SKP1A_ARATH	SKP1 component-like 1, A7KZP6_HUMLU	SKP1 component-like 1 [Humulus lupulus], ABS17589
49-5_T7	690	3C-		122	122		2,00E-52	6,00E-27					Predviden protein, B9HFD7_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002309963
49-6_T7	637	3C-	57	144	134	0,54	1,00E-54	2,00E-25	35%	75%	76%	Zeaksantin-epoksidaza, kloroplastna, ABA2_NICPL	Predviden protein, B9N3B5_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002318306

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Zaporedje	Dolžna zaporedja [bp]	Vzorec	Dolžina zadetka (AA)			Vrednost E			Ujemanje [%]			Podobnost		
			S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr	S-Prot	TrEMBL	nr
5-1_SP6	398	2C-	62	100	100	1,4	1,00E-34	2,00E-33	33%	66%	66%	Možna ovojnica ADP, ATP prenašalni protein, kloroplastni, EAAC_ARATH	Ogrodje 18 kromosoma 12, A7PJN8_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002278078
51-2_SP6	220	2W-	72	72	72	6,00E-36	6,00E-36	8,00E-35	81%	87%	87%	Protein COBRA, COBRA_ARATH	Neokarakteriziran protein, C6THH0_SOYBN	Neznan [Glycine max], ACU21272
58-1_SP6	747	2C-	248	248	230	1,00 E-118	1,00E-127	1,00E-101	79%	85%	85%	Cikloartenol-sintaza, CAS1_ARATH	Ogrodje 14 kromosoma 11, A7PFB5_VITVI	Hipotetični protein izoforma 2 [Vitis vinifera], XP_002264372
7-1_T7	437	2W-	52	131	131	1,00E-14	1,00E-20	2,00E-19	59%	41%	41%	Receptorju podobna protein-kinase FERONIA, FERON_ARATH	Ogrodje 9 kromosoma 14, A7PAB3_VITVI	Hipotetični protein [Vitis vinifera], CAN68061
8-2_T7	454	2W-	40	66	91	2,4	7,00E-06	1,00 E-02	40%	45%		Z levcinom bogata ponovitev receptorske protein-kinaze EXS, EXS_ARATH	APO protein 3, mitohondrijski, domeneven, B9S4A8_RICCO	Hipotetični protein [Vitis vinifera], XP_002264685
9-2_T7	224	2W-	70	74		6,00E-14	1,00E-21		48%	66%		Družina PRA1 protein E, PRA1E_ARATH	Ogrodje 190 kromosoma 14, A7QVP3_VITVI	

Preglednica 9: GeneSnare zaporedja, ki kažejo podobnost s proteini z možno funkcijo povezano z obrambo rastlin v stresnih pogojih. Prikazano je tudi, iz katerega vzorca je bilo zaporedje izolirano.

Zaporedje	Dolžna zaporedja	Vzorec	Podobnost			Možna funkcija
			S-Prot	TrEMBL	nr	
Contig12	454	3W+	Protein B4 podoben celulozni sintazi, CSLB4_ARATH	Domeneven neokarakteriziran protein, A5AYS3_VITVI	Hipotetični protein, XP_002264911.1	Možna beta-glikan sintaza, ki se nahaja na Golgijevem aparatu in polimerizira necelulozne polysaharide (hemiceluloze) celične stene.
15-3_T7	680	1W-	Z glicinom bogat vezavni protein ZA RNA, GRP1_DAUCA	Predviden protein, A9P8Z7_POPTR	Predviden protein [Populus trichocarpa], XP_002305429	Možna vloga v biosintezi in procesiranju heterogene jedrne RNA ter med dozorevnajem specifičnih mRNA kot odziv na rane.
16-6_T7	705	3C+	Hevamin-A, CHLY_HEVBR	Kisla hitinaza, Q71HN4_FICAW	Hevamin-A, P23472	Encim z dvojno funkcijo, lizocimna in hitinazna aktivnost.
3-4_T7	522	2C+	Trans-cimetna 4-monooksigenaza, TCMO_CATRO	Cimetna kislina 4-hidroksilaza, C0KKW6_HUMLU	Cimetna kislina 4-hidroksilaza [Humulus lupulus], ACM69364	Nadzoruje pretok ogljika k pigmentom pomembnim pri opravevanju ali zaščiti pred UV žarki, ter k številnim fitoaleksinom in ligninom, ki jih rastline sintetizirajo po okužbi s patogeni.

Preglednica 10: Prikaz zadetkov BLASTN GeneSnare zaporedij v lokalni bazi EST hmelja, iz katerega je razvidno, da kar 46,4 % zaporedij res izvira iz hmelja in da so prepisana v mRNA in ne posledica morebitnih kontaminacij z genomsko DNA.

Zaporedje	Številka zaporedja v Plant GDB bazi EST hmelja	Dolžina zaporedja [bp]	Dolžina zadetka [bp]	Ujemanje (%)	Vrednost E
Contig1	3964	1342	40	95%	4,00E-10
Contig2	9028	827	210	84%	2,00E-41
Contig3	9155	745	697	99%	0
Contig4	2433	938	650	98%	0
Contig5	5142	728	728	98%	0
Contig6	6901	690	146	93%	6,00E-57
Contig8	2182	606	579	98%	0
Contig10	7389	511	29	93%	6,00E-04
Contig12	1245	454	208	94%	7,00E-86
Contig19	8566	387	387	99%	0
Contig21	8417	322	321	99%	1,00E-177
Contig22	6214	319	311	94%	1,00E-156
Contig23	2578	333	302	99%	1,00E-169
Contig24	7356	294	294	100%	1,00E-167
Contig27	9188	208	205	99%	1,00E-114
Contig31	3721	167	165	100%	2,00E-90
1-1_T7	3354	719	572	100%	0
11-1_T7	1864	215	215	100%	1,00E-117
15-3_T7	747	680	366	99%	0
16-6_T7	6917	705	527	99%	0
17a-1_SP6	39894	651	314	100%	1,00E-178
17a-3_T7	12	596	175	98%	5,00E-91
2-4_T7	4379	782	502	97%	0
3-3_T7	4747	366	81	83%	2,00E-06
3-4_T7	5835	522	521	100%	0
34-1_T7	9532	552	484	96%	0
3-5_T7	3001	495	496	99%	0
35-6_T7	6147	198	157	99%	4,00E-83
4-2_T7	9010	352	352	100%	0
4-3_SP6	2099	275	92	100%	1,00E-46
47-1_SP6	8759	674	484	100%	0
48-2_T7	1551	584	368	100%	0
49-5_T7	5117	690	544	99%	0
5-1_SP6	4239	398	398	99%	0
7-1_T7	23	437	304	92%	1,00E-118
8-3_T7	4532	441	199	99%	1,00E-108

Preglednica 11: Prikaz zadetkov BLASTN GeneSnare zaporedij z zaporedji *Verticillium spp.* v bazi EST (»est_others«) in zadetka BLASTX v podatkovni bazi »nr«.

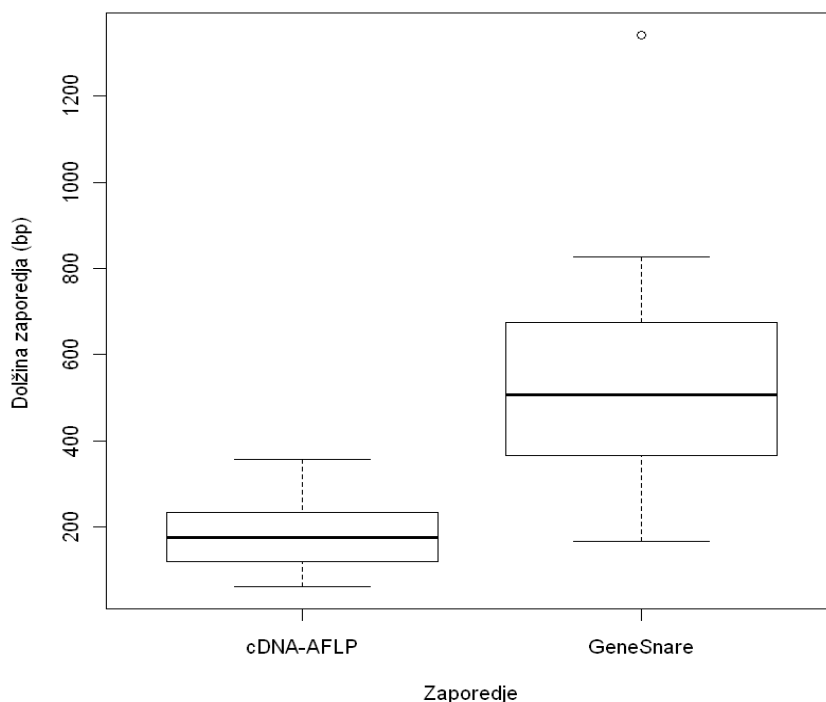
Zaporedje	Vzorec	Akcesijska številka	Dolžina zaporedja [bp]	Dolžina zadetka [bp oz. AA]	Ujemanje (%)	Vrednost E
Contig20	1C+,2C, 3C+,1W +	BQ110650	358	20	100%	1,00E-160
10-3_T7*	3C+	BQ110568	114	94	90%	1,00E-20
38-1_T7*	1C+	BQ110597	726	441	96%	0.0
24-3_T7 ¹	3C+	EEY22269	672	152	44%	2,00E-27

* podobnost z zaporedji *Verticillium spp.* v bazi EST (»est_others«)

¹ Zadelek, ki smo ga z algoritmom BLASTX dobili v podatkovni bazi »nr«. Zaporedje je kazalo podobnost s proteinom lektinom iz glive *Verticillium albo-atrum*.

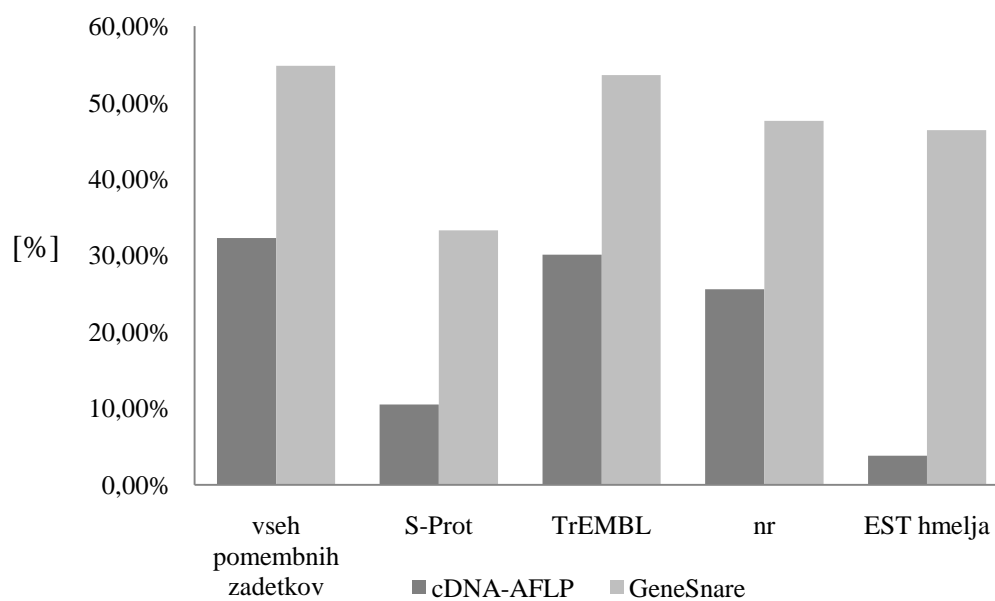
4.3 PRIMERJAVA USPEŠNOSTI METOD cDNA-AFLP IN GeneSnare

Na Slikah 14 in 15 je prikazana uspešnost metod cDNA-AFLP in GeneSnare na podlagi povprečne dolžine zaporedij, ki so dala pomembne zadetke, in odstotka pomembnih zadetkov med vsemi pregledanimi zaporedji. Razvidno je, da smo z metodo GeneSnare dobili višji odstotek pomembnih zadetkov, ter da so zaporedja, ki predstavljajo pomembne zadetke, daljša.



Slika 14: Primerjava analize dolžin (v bp) pomembnih zadetkov med cDNA-AFLP in GeneSnare zaporedji. Na okvirju z ročaji so predstavljene minimalne in maksimalne vrednosti (cDNA-AFLP – 61 in 357 bp ter GeneSnare – 167 in 1342 bp), prvi in tretji kvartil (cDNA-AFLP – 120 in 233,5 bp ter GeneSnare – 374 in 524,4 bp) ter mediana vrednost (cDNA-AFLP – 175 bp in GeneSnare – 507,5 bp). Povprečni vrednosti za oba seta podatkov sta 182,0 bp (cDNA-AFLP) in 524,4 bp (GeneSnare).

Na Sliki 15 so primerjalno prikazani odstotki pomembnih zadetkov, ki smo jih dobili s primerjanjem cDNA-AFLP in GeneSnare zaporedij s pomočjo algoritma BLASTX v lokalnih bazah S-Prot in TrEMBL ter podatkovni bazi »nr« ali s pomočjo algoritma BLASTN v lokalni bazi EST hmelja. Prva dva stolpca prikazujeta primerjavo med odstotkom vseh pomembnih zadetkov (vsaj en pomemben zadetek, tj. vrednost E manjša ali enaka 10^{-5} , v vsaj eni od treh baz), dobljenih s primerjanjem cDNA-AFLP in GeneSnare zaporedij z algoritmom BLASTX v bazah S-Prot, TrEMBL in »nr«.



Slika 15: Primerjava uspešnosti iskanja podobnosti z znanimi proteinskimi oz. nukleotidnimi zaporedji s pomočjo algoritma BLASTX oz. BLASTN v treh podatkovnih bazah proteinov (S-Prot, TrEMBL in »nr«) in lokalni bazi EST hmelja.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Z raziskavo diferencialnega izražanja genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum* smo želeli bolj natančno raziskati in razumeti odnos med glivo in njeno gostiteljsko rastlino – hmeljem. V ta namen smo uporabili uveljavljeno metodo cDNA-AFLP (Bachem in sod., 1996), ki pa nam ni dala popolnoma zadovoljivih rezultatov, zato smo se odločili še za uporabo komercialne metode GeneSnare, ki zagotavlja večjo specifičnost pri pomnoževanju diferencialno izraženih fragmentov (Hwang in sod., 2003).

Glavna težava pri metodi cDNA-AFLP, ki se je pojavila, je bila dolžina izoliranih fragmentov, ki nam zaradi svoje kratkosti niso dali zadovoljivega števila pomembnih zadetkov podobnosti v proteinskih bazah. Metodi namreč odkrivata različne polimorfizme molekul cDNA. Pri cDNA-AFLP odkrivamo različno izražene fragmente na podlagi restrikcijsko razrezanih molekul cDNA, ki jih pomnožujemo z naključnimi začetnimi oligonukleotidi, z metodo GeneSnare pa molekule cDNA pomnožujemo neposredno, brez restrikcijskega razreza, in sicer z naključnimi dekamernimi začetnimi oligonukleotidi in poli-T začetnim oligonukleotidom (dT-ACP), s čimer dobimo daljše diferencialno izražene fragmente. Druga težava, na katero smo naleteli pri metodi cDNA-AFLP, pa je bila v ponovljivosti pomnoževanja fragmentov v verižni reakciji s polimerazo po izolaciji iz gela in pri sami izbiri DIF, ločenih na denaturacijskem sekvenčnem gelu. Odločili smo se, da bomo največji poudarek namenili primerjavi diferencialnega izražanja med okuženim in neokuženim vzorcem iste sorte v isti časovni točki ter primerjavi med časovnimi točkami pri isti sorti.

Prvo težavo smo odpravili z uporabo metode GeneSnare, saj smo tako lahko izolirali mnogo daljše fragmente, ki so nam dali tudi večje število pomembnih zadetkov (pri GeneSnare smo dobili 54,8 %, pri cDNA-AFLP pa 32,3 % pomembnih zadetkov; glej Sliko 14). Tudi drugo težavo smo delno odpravili z metodo GeneSnare, saj smo s pomnoževanjem s posameznim parom začetnih oligonukleotidov dobili bistveno manjše število vseh fragmentov, a tudi manjše število DIF (glej Preglednico 4). Težava, ki se je pojavila pri tej metodi, pa je bila v samem poteku izbire DIF, saj ločljivost agaroznega gela in fluorescenca etidijevega bromida ne omogočata optimalne detekcije. Tudi pri metodi GeneSnare smo primerjali predvsem diferencialno izražanje znotraj iste sorte, bodisi med okuženim in neokuženim vzorcem bodisi med različnimi časovnimi točkami. Seveda pa so nam bili pri obeh metodah zanimivi tudi fragmenti, ki so se pojavljali le pri eni ali drugi sorti v okuženem ali neokuženem vzorcu.

Z uporabo obeh metod za odkrivanje diferencialno izraženih genov smo uspešno izolirali 217 edinstvenih fragmentov cDNA, v skupni dolžini 55.985 bp, ki so se različno izražali bodisi med časovnimi točkami bodisi med okuženim in neokuženim vzorcem znotraj iste sorte. Z metodo cDNA-AFLP smo z desetimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov

pridobili 133 edinstvenih fragmentov cDNA. V podobnih raziskavah interakcije med rastlino in patogenom je bilo večinoma uporabljeno večje število kombinacij začetnih oligonukleotidov, kar pa ni nujno privedlo do bistveno večjega števila diferencialno izraženih fragmentov. Steiner in sod. (2009) so uporabili 96 kombinacij začetnih oligonukleotidov, s katerimi so izolirali skupaj 164 diferencialno izraženih fragmentov. Chapman in sod. (2009) so uporabili bistveno večje število kombinacij začetnih oligonukleotidov (168) in z njimi izolirali 34 diferencialno izraženih fragmentov. Tudi Durrant in sod. (2000) so uporabili zelo veliko število kombinacij začetnih oligonukleotidov, kar 512, in z njimi pridobili 290 diferencialno izraženih fragmentov. Nasprotno pa so Wang in sod. (2009) z relativno majhnim številom kombinacij, uporabili so jih 64, uspeli pridobiti izredno veliko število diferencialno izraženih fragmentov – skupaj 2.306. Število izoliranih DIF je v največji meri odvisno od proučevane interakcije, predvsem od tega, kakšne razlike v izražanju genov opazujemo.

Z metodo GeneSnare smo z dvanajstimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov izolirali skupaj 84 edinstvenih fragmentov cDNA. Podobnih raziskav z uporabo GeneSnare ali katere od sorodnih tehnik (npr. GeneFishing) je bistveno manj, saj so te metode relativno nove. Lee in sod. (2009) so z uporabo 120 začetnih oligonukleotidov ACP izolirali le 11 diferencialno izraženih fragmentov DNA, medtem ko so Faridah in sod. (2009) s štirimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov ACP izolirali skupno devet diferencialno izraženih genov iz različnih cvetnih organov orhideje *Dendrobium crumenatum*.

Izolirane fragmente smo primerjali z znanimi proteinskimi zaporedji v lokalno izdelanih bazah in javno dostopni spletni bazi ter tako dobili skupno 89 pomembnih zadetkov (41 % od vseh edinstvenih fragmentov cDNA). Ti zadetki so izkazovali pomembno podobnost z znanimi proteini in v nekaterih primerih jim je bilo mogoče določiti tudi domnevno funkcijo. Pri primerjanju 84 zaporedij pridobljenih z metodo GeneSnare smo v primerjavi s cDNA-AFLP fragmenti dobili bistveno večje število pomembnih zadetkov v vseh proteinskih bazah. Tudi število pomembnih zadetkov v posamezni bazi je bilo bistveno večje pri metodi GeneSnare (Sliki 14 in 15). Zelo verjeten razlog za tako razliko v številu pomembnih zadetkov je dolžina zaporedij, pridobljenih s posamezno metodo, saj nam daljša zaporedja (pridobljena z metodo GeneSnare) dajo boljše zadetke. Možno je tudi, da smo pri cDNA-AFLP fragmentih, ki so krajši, dobili predvsem UTR regije (angl. untranslated region) mRNA, ki pa ne kažejo zadetkov s proteini, saj se v protein ne prevedejo.

Da metodi odkrivata različne polimorfizme molekul cDNA nakazuje tudi medsebojna primerjava cDNA-AFLP in GeneSnare zaporedij z algoritmom BLASTN, ki ni pokazala podobnosti med posameznimi zaporedji.

Proteinski zadetki z znanimi funkcijami so večinoma predstavljali encime, strukturne proteine, metabolično aktivne proteine in transkripcijske faktorje. Za nekatere zadetke je bilo mogoče že iz funkcije sklepati na vlogo v obrambnem mehanizmu rastlin – ti zadetki so predstavljeni v Preglednicah 6 in 9. Izpostavljenih je sedem zaporedij, od katerih je bilo šest izoliranih iz okuženih vzorcev v različnih časovnih točkah. Zaporedje, ki je bilo izolirano iz neokuženega vzorca (1W-), lahko nakazuje na to, da je pri okuženem vzorcu iste sorte prišlo do utišanja gena. Kot je bilo že omenjeno, ostala zaporedja kažejo podobnost z drugimi proteini z znano ali neznano funkcijo, kar seveda ne pomeni, da nimajo vloge pri obrambi rastline na različne strese, kot je napad patogenov.

Z metodo cDNA-AFLP smo iz vzorcev 2C+ in 1W+ izolirali DIF (122-IICEL+280-17feb_31-IWT+275-9sep), ki je izkazoval pomembno podobnost s proteinom, katerega funkcija je lahko povezana s stresom. Zaporedje je tako v bazi S-Prot kot tudi v bazi TrEMBL izkazovalo podobnost z oligopeptidnim proteinom oz. proteinom za prenašanje glutationa. Protein je bil izoliran iz rastline *Arabidopsis thaliana*, njegova vloga pa je prenašanje tetra- in pentapeptidov skozi celično membrano, prenaša pa tudi derivate glutationa in kovinske komplekse ter bi lahko imel vlogo pri odpornosti na stres. Parisy in sod. (2006) so potrdili, da je zadostna količina glutationa nujna za akumulacijo snovi, potrebnih za vzpostavitev odpornosti na patogen. V svoji študiji so preučevali odnos med *A. thaliana* in fitopatogenima glivama iz rodu *Phytophthora*.

DIF 15-3_T7, ki smo ga izolirali iz neokuženega vzorca sorte Wye Target po desetih dneh vzgoje v rastni komori (1W-), kaže podobnost s proteinom, ki ima vlogo pri odzivu poškodovanih tkiv. Gre za primer izključitve gena pri okuženih rastlinah. Z glicinom bogati protei za vezavo RNA ima vlogo pri biosintezi in procesiranju heterogene jedrne RNA in je pomemben pri dozorevanju specifičnih mRNA kot odziv na poškodbo tkiva (UniProt, 2010).

Zanimivo je tudi zaporedje 24-ICEL+160-9sep, izolirano z metodo cDNA-AFLP iz vzorca 1C+, ki kaže podobnost s transkripcijskim faktorjem odzivnim na etilen (UniProt, 2010). Njegova vloga naj bi bila v regulaciji izražanja genov v stresnih pogojih in stresnih signalnih transdukcijah. Etilen ima ob okužbi z glivami iz rodu *Verticillium* sicer vlogo signalne molekule. Pripomogel naj bi k vzpostavitvi odpornosti, poleg tega pa nadzoruje izražanje simptomov pri interakciji med rastlino in patogenom (Fradin in Thomma, 2006).

Naslednja skupina zanimivih zaporedij pa izkazuje podobnost z različnimi encimi. Contig12, v katerem so zaporedja iz vzorca 3W+, kaže podobnost s proteinom B4, ki je podoben celulozni sintazi. Njegova funkcija je v sintezi beta-glikanov in polimerizaciji neceluloznih polisaharidov (hemiceluloz), ki so sestavni del celične stene rastlin (UniProt, 2010). Zanimiv se nam je zdel zato, ker lahko te molekule pripomorejo k okrepitvi celične stene, s tem pa morda tudi preprečitvi nadaljnje kolonizacije. Zaporedje 72-24IWT+165-

22avg, izolirano iz vzorca 2W+, pa v bazi S-Prot kaže podobnost z encimom 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktaza, ki katalizira sintezo mevalonata, ki je pomemben prekursor izoprenoidnih snovi v rastlinah. Izoprenoidi so ena od mnogih oblik fitoaleksinov, ki so pomembna skupina antimikrobnih snovi. Encim je bil izoliran iz listov rastline *Nicotiana sylvestris* in se inducira kot posledica poškodbe ali po okužbi z bakterijskim ali glivnim patogenom (UniProt, 2010). Še en encim, ki je povezan s fitoaleksini je trans-cinamat 4-monooksigenaza, s katerim se je podobnost pokazala pri zaporedju 3-4_T7 iz vzorca 2C+. Ta encim namreč nadzoruje pretok ogljika k številnim fitoaleksinom, ki jih rastline sintetizirajo po okužbi s patogenom, in ligninom (UniProt, 2010).

Morda najbolj zanimivo zaporedje pa je 16-6_T7, izolirano iz vzorca 3C+, ki kaže podobnost z encimom hevamin-A, ki ima dve domeni – hitinazno in lizocimsko. Izoliran je bil iz drevesa *Hevea brasiliensis*, kjer ima vlogo predvsem pri mašenju lateksnih žil in prekinitvi lateksnega toka (UniProt, 2010). V okviru interakcije med rastlino in patogenom pa je zanimiva vloga hitinazne domene, saj so hitinaze druga največja skupina protiglivnih proteinov. Katalizirajo razcep β -1,4-glikozidne vezi, ki je prisotna v polimerih N-acetil-D-glikozaminov, predvsem v hitinu, ki je sestavni del glivne celične stene (Ferreira in sod. 2007).

Izražanje izbranih zaporedij bo potrebno preveriti še s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR). S to metodo je mogoče potrditi dejansko izražanje in količino izraženega gena v določenem vzorcu.

Vseh 217 zaporedij smo z uporabo algoritma BLASTN primerjali tudi z znanimi EST hmelja. Z metodo cDNA-AFLP smo dobili 3,8 %, z GeneSnare pa 46,4 % zadetkov. Zadelek z EST hmelja pomeni, da gre dejansko za hmeljno zaporedje in za izraženo zaporedje. Zanimivo je, da so vsa zaporedja, ki so pri metodi GeneSnare izkazovala podobnost s proteinom, ki ima funkcijo pri obrambi rastline, imela zadelek tudi v bazi EST hmelja.

Prav tako smo z algoritmom BLASTN opravili primerjavo 217 zaporedij v bazi EST (»est_others«), da bi odkrili morebitna glivna zaporedja. Med cDNA-AFLP zaporedji nismo našli podobnosti z glivo *Verticillium spp.*, medtem ko smo med GeneSnare zaporedji našli tri takšna, ki so bila izolirana iz okuženih rastlin (prikazana v Preglednici 11). Ti zadetki dodatno potrjujejo, da je šlo za cDNA, pridobljeno iz okuženih rastlin hmelja. Poleg teh zadetkov smo med GeneSnare zaporedji s pomočjo algoritma BLASTX dobili zadelek v bazi »nr« in sicer je bil podoben proteinu iz glive *Verticillium albo-atrum*.

V laboratoriju na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin smo prvič preizkusili že uveljavljeno metodo za preučevanje diferencialnega izražanja genov,

cDNA-AFLP, pa tudi novo metodo, pri kateri smo preizkusili komercialni komplet GeneSnare, ki temelji na pomnoževanju DIF s posebnimi začetnimi oligonukleotidi ACP. Slednja nam je dala bistveno daljše DIF, kot smo jih dobili z metodo cDNA-AFLP, zaradi česar smo dobili več in boljše zadetke v lokalno zgrajenih in javno dostopni spletni bazi proteinov. Z metodo cDNA-AFLP dobimo veliko število DIF, vendar so le ti kratki, postopek pa je dolgotrajen. Po drugi strani pa z metodo GeneSnare dobimo dolge DIF, a jih je – na posamezno kombinacijo začetnih oligonukleotidov – zelo malo. Dobra lastnost metode GeneSnare je tudi enostavnost samega postopka, saj fragmente cDNA neposredno pomnožimo v verižni reakciji s polimerazo in jih ločimo na 1,2% agaroznem gelu. Kljub temu je bilo včasih DIF težko izbrati, ker ločljivost agaroznega gela in fluorescenca etidijevega bromida nista omogočala optimalne detekcije. Ugotovimo lahko, da sta metodi vsaka na svoj način primerni za raziskovanje diferencialnega izražanja genov.

Z uporabo dveh metod zaznave in izolacije DIF smo uspešno preučili interakcijo med hmeljem in fitopatogeno glivo *Verticillium albo-atrum*. Potrdili smo diferencialno izražanje genov med okuženo in neokuženo rastlino, ter različno izražanje genov v različnih časovnih točkah. Med diferencialno izraženimi zaporedji smo določili sedem kandidatnih zaporedij, katerim obrambno funkcijo bomo poskušali potrditi še s qRT-PCR. Diferencialnega izražanja med obema sortama pa nismo mogli potrditi z gotovostjo.

6 POVZETEK

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) se v Sloveniji prideluje že več kot sto let in je pomemben kmetijski proizvod, namenjen predvsem izvozu. V pivovarstvu komercialno vrednost hmelja predstavljajo lupulinske žleze ženskih storžkov, ki vsebujejo aktivne aromatične snovi hmelja (hmeljne kisline oz. smole, eterična olja in polifenole spojine – tanine). Te snovi dajejo pivu značilno grenkobo, ga konzervirajo in mu dajejo hmeljno aromo in okus (Jakše, 2003).

Talni glivi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn sta traheomikotični glivi, ki rastlino okužita preko koreninskega sistema in se naselita v ksilemu žilnega sistema. Razširjeni sta po vsem svetu, predvsem v zmernih in subtropskih območjih. Imata zelo obsežen nabor gostiteljskih rastlin (predvsem dvokaličnic) – okoli 410 različnih vrst iz 80 rodov (Qin in sod., 2006). Glivama (tudi večletno) preživetje v tleh omogočajo trajni organi, ki se večinoma tvorijo ob neugodnih razmerah. *V. dahliae* tvori temno rjave do črne mikrosklerocije, *V. albo-atrum* pa temno rjav do črn trajni micelij (Radišek, 2001). Razvojni krog gliv delimo na tri faze: dormantno, parazitsko in saprofitsko. Faze prehajajo od klitja trajnih organov in okužbe rastline (dormantna) preko razmnoževanja v rastlini (parazitska) do ponovne tvorbe trajnih organov in prezimovanja v tleh (saprofitska) (Fradin in Thomma, 2006).

Hmeljeva uvelost, ki jo povzročajo glive iz rodu *Verticillium*, je ena najpomembnejših bolezni hmelja. Bolezen se na hmelju pojavlja v dveh oblikah, blagi in letalni. Splošna bolezenska znamenja zajemajo akropetalno venenje in rumenenje listov, pojav klorotičnega in nekrotičnega tkiva na listih, značilno vihanje listnih robov navzgor in rjavenje prevajalnega tkiva (Neve, 1991). Bolezen se je – v blagi obliki – v Sloveniji prvič pojavila leta 1974 in ni povzročila večje gospodarske škode, leta 1997 pa je bil v Savinjski dolini prvič zabeležen izbruh letalne oblike te bolezni, ki je resno ogrozil pridelavo hmelja, predvsem zaradi gostote hmeljevih nasadov na mestu izbruha in prevlade občutljivih sort. Ker je hmelj trajnica, lahko okužba celotnega nasada z letalno obliko bolezni resno omeji pridelavo. Doslej so glavni omejevalni ukrepi proti širjenju bolezni kolobar in fitosanitarni ukrepi, saj učinkovitih kemičnih sredstev za zatiranje glive ni. Najučinkovitejša bi sicer bila uporaba odpornih sort hmelja, vendar se tu pojavi splošna težava v samem postopku žlahtnjenja, ki je zelo dolgotrajen (Radišek, 2004).

Glavni namen diplomske naloge je bolj natančno raziskati interakcijo med letalno obliko patogene glive *Verticillium albo-atrum* in njeno gostiteljsko rastlino – hmeljem. Način okužbe, molekularni mehanizmi patogenosti glive in sama interakcija med glivo in njenim gostiteljem so slabo raziskana področja, čeprav gliva parazitira kmetijsko zelo pomembne rastline. V raziskavi smo želeli analizirati in okarakterizirati gene, ki se diferencialno

izrazijo po okužbi s patogeno glivo *Verticillium albo-atrum*, ter preučiti interakcije med gostiteljem in patogenom na ravni transkriptoma.

Analizirali smo diferencialno izražanje genov v dveh sortah hmelja, in sicer pri občutljivi sorti Celeia in odporni sorti Wye Target, ki sta bili okuženi z visoko virulentnim izolatom T2 glive *V. albo-atrum* (patotip PV1; genotip PG2), ki povzroča letalno obliko uvelosti. RNA iz rastlin (okužena in kontrolna obravnavanja) smo izolirali v treh časovnih točkah, 10, 20 in 30 dni po okužbi. Poskušali smo pridobiti čimvečje število diferencialno izraženih fragmentov (z dvema različnima pristopoma analize RNA, s tehnikami cDNA-AFLP in GeneSnare), ki smo jim nadalje določili nukleotidno zaporedje in podobnost z že znanimi proteini s pomočjo programskega paketa BLAST.

S cDNA-AFLP smo z 10 od 22 uporabljenimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov *Pst*I in *Mse*I uspešno pomnožili restrikcijske fragmente cDNA, jih ločili na denaturacijski sekvenčni elektroforezi ter izolirali in uspešno reamplificirali 117 diferencialno izraženih fragmentov (DIF), kar predstavlja 45,5 % od vseh izbranih DIF. Fragmente smo klonirali s pomočjo komercialnega kompleta pGEM-T easy in z modro-belo selekcijo izbrali uspešno klonirane fragmente, ki smo jim nato določili nukleotidno zaporedje (takih fragmentov je bilo 623). Z metodo GeneSnare smo z 12 od 24 kombinacijami začetnih oligonukleotidov ACP uspešno pomnožili diferencialno izražene fragmente, ki smo jih izolirali iz agaroznega gela, jih klonirali ter določili njihovo nukleotidno zaporedje. Skupaj smo nukleotidno zaporedje določili 208 DIF, in sicer s 416 reakcijami določanja nukleotidnega zaporedja, saj smo za vsak fragment izvedli reakcijo z obema vektorsko specifičnima začetnima oligonukleotidoma, SP6 in T7.

Kromatogramske datoteke z rezultati določevanja nukleotidnega zaporedja smo pregledali in obdelali s programom CodoneCode Aligner različice 2.0.6. Zaporedja smo pregledali, odstranili ostanke vektorja in AFLP adapterjev oz. začetnih oligonukleotidov ACP ter odstranili zaporedja, ki so bila prekratka ali preslabe kakovosti. Pri metodi cDNA-AFLP metodi nam je ostalo 455 uporabnih zaporedij, ki smo jih poskusili združiti v soseske – tako smo uspešno združili 412 zaporedij (90,5 % vseh dobrih zaporedij) v 90 sosesk. Ostalih 43 zaporedij je bilo enkratnih. Tako smo za nadaljnjo analizo dobili 133 zaporedij v skupni dolžini 18.935 bp ter povprečne dolžine 142 bp. Pri GeneSnare metodi je v nadaljnjo obravnavo šlo 195 nukleotidnih zaporedij, ki smo jih poskušali združiti v soseske. V 31 sosesk smo uspešno združili 142 zaporedij (72,8 %), preostalih 53 zaporedij pa je bilo enkratnih. Za iskanje podobnosti z znanimi nukleotidnimi oz. proteinskimi zaporedji smo tako dobili 84 zaporedij v skupni dolžini 37.050 bp in povprečne dolžine 441 bp.

Nukleotidna zaporedja smo s pomočjo programskih orodij NetBLAST in BLAST z algoritmom BLASTN oz. BLASTX primerjali z znanimi nukleotidnimi oziroma

proteinskimi zaporedji v treh lokalno zgrajenih bazah (dveh proteinskih – S-Prot in TrEMBL – in bazi EST hmelja) in javno dostopni spletni podatkovni bazi »nr« ter bazi EST (»est_others«). Med 133 cDNA-AFLP zaporedji smo z algoritmom BLASTX v bazah S-Prot, TrEMBL in »nr« dobili 43 pomembnih zadetkov (pomemben zadek v vsaj eni od treh baz), kar predstavlja 32,3 % pomembnih zadetkov. Povprečna dolžina pomembnih zadetkov znaša 182 bp s standardno deviacijo 75,9 bp. Med 84 GeneSnare zaporedji pa smo z algoritmom BLASTX dobili 46 pomembnih zadetkov, kar predstavlja 54,8 %. Povprečna dolžina pomembnih zadetkov je znašala 542 bp s standardno deviacijo 217,6 bp. Zaporedja (tako cDNA-AFLP kot GeneSnare) kažejo podobnost s proteini, ki imajo različne vloge – od metaboličnih encimov, strukturnih proteinov in encimov, ki sodelujejo pri mitotični delitvi, do proteinov, ki še niso bili okarakterizirani. Tri zaporedja (2,3 %) med cDNA-AFLP in štiri (4,8 %) med GeneSnare zaporedji pa kažejo podobnost s proteini, katerim je že iz funkcije mogoče razbrati, da lahko igrajo tudi vlogo pri obrambi rastline pred stresom.

Poleg zgoraj navedenih iskanj podobnosti smo uporabili tudi algoritem BLASTN za primerjavo naših zaporedij DNA z zaporedji DNA v podatkovnih bazah. Izmed 133 pregledanih cDNA-AFLP zaporedij jih je 5 (3,8 %) kazalo pomembno podobnost z že znanimi EST hmelja, med 84 GeneSnare zaporedji pa je bilo takšnih 36 (46,4 %). Z algoritmom BLASTN smo opravili tudi iskanje podobnosti v bazi EST (»est_others«), ki vsebuje vse EST razen EST miši in človeka. Med cDNA-AFLP zaporedji nismo našli takšnih, ki bi kazala podobnost z zaporedji glive *Verticillium spp.*, med GeneSnare zaporedji pa smo odkrili tri (3,6 %) zaporedja v bazi EST in (z algoritmom BLASTX) eno zaporedje (1,2 %) v podatkovni bazi »nr«.

Z uporabo obeh metod za odkrivanje diferencialno izraženih genov smo uspešno izolirali 217 edinstvenih fragmentov cDNA v skupni dolžini 55.985 bp, ki so se različno izražali bodisi med različnimi časovnimi točkami bodisi med okuženim in neokuženim vzorcem iste sorte. Skupno smo dobili 89 pomembnih zadetkov (41 % od vseh edinstvenih fragmentov cDNA) z znanimi proteinskimi zaporedji v lokalno izdelanih bazah in javno dostopni spletni bazi. Izražanje izbranih zaporedij bo potrebno preveriti še s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR). S to metodo je mogoče potrditi dejansko izražanje in količino izraženega gena v določenem vzorcu. Z metodo cDNA-AFLP smo dobili 3,8 %, z GeneSnare pa 46,4 % zadetkov, ki so kazali podobnost z EST hmelja. Zadek z EST hmelja pomeni, da gre dejansko za hmeljno zaporedje ter da gre za izraženo zaporedje.

Metoda GeneSnare nam je dala bistveno daljše DIF, a v manjšem številu kot metoda cDNA-AFLP. Zaradi njihove dolžine smo dobili več in boljše zadetke v lokalno zgrajenih in javno dostopni spletni bazi proteinov. Z metodo cDNA-AFLP sicer dobimo veliko

število DIF, vendar so le ti kratki, postopek pa je dolgotrajen. Ugotovimo lahko, da sta metodi vsaka na svoj način primerni za raziskovanje diferencialnega izražanja genov.

Z uporabo dveh metod zaznave in izolacije DIF smo uspešno preučili interakcijo med hmeljem in fitopatogeno glivo *Verticillium albo-atrum*. Potrdili smo diferencialno izražanje genov med okuženo in neokuženo rastlino ter različno izražanje v različnih časovnih točkah. Diferencialnega izražanja med obema sortama pa nismo mogli potrditi z gotovostjo.

7 VIRI

- Akhtar A., Becker P.B. 2000. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in drosophila. *Molecular Cell*, 5, 2: 367-375
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Bachem C. W. B., van der Hoeven R. S., de Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R. G. F. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, 9, 5: 745-753
- Bachem C. W. B., Oomen R. J. F. J., Visser R. G. F. 1998. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 157-173
- Barbara D.J., Clewes E. 2003. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there?. *Molecular Plant Pathology*, 4, 4: 297-305
- Bhat R.G., Subbarao K.V. 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 89: 1218-1225
- Broad Institute. *Verticillium* group Database (11.6.2010)
http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html (25.5.2010)
- Carder J.H., Hignett R.C., Swinburne T.R. 1987. Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31: 441-452.
- Chapman N. H., Burt C., Nicholson P. 2009. The identification of candidate genes associated with Pch2 eyespot resistance in wheat using cDNA-AFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 118:1045-1057
- Čerenak A. 2004. Kartiranje genoma hmelja (*Humulus lupulus* L.) z AFLP markerji. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 103 str.
- Durrant W. E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K. E., Jones J. D. G. 2000. cDNA-AFLP Reveals a Striking Overlap in Race-Specific Resistance and Wound Response Gene Expression Profiles. *The Plant Cell*, 12: 963-977
- Echt C.S., May-Marquardt P., Hsieh M., Zahorchak R. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39: 1102-1108
- Eckey C., Korell M., Leib K., Biedenkopf D., Jansen C., Langen G., Kogel K.-H. 2004. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology*, 55: 1-15
- Faridah Q.Z., Ng B.Z., Raha A.R., Umi K.A.B., Khosravi A.R. 2009. Differential expressions of putative genes in various floral organs of the Pigeon orchid

- (*Dendrobium crumenatum*) using GeneFishing. African Journal of Biotechnology, 8,11: 2443-2453
- Ferreira R. B., Monteiro S., Freitas R., Santos C. N., Chen Z., Batista L. M., Duarte J., Borges A., Teixeira A. R. 2007. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. Molecular Plant Pathology, 8, 5: 677-700
- Fradin E.F., Thomma B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Molecular Plant Pathology, 7, 2: 71-86
- Fradin E.F., Zhang Z., Ayala J. C. J., Castroverde C. D. M., Nazar R. N., Robb J., Liu C. M., Thomma B. P. H. J. 2009. Genetic Dissection of *Verticillium* Wilt Resistance Mediated by Tomato Ve1. Plant Physiology, 150: 320–332
- Gril T. 2009. Karakterizacija genetske variabilnosti izolatov glive *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey in razvoj diagnostičnih markerjev. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani. 143 str.
- Heale J. B., *Verticillium* spp., The cause of vascular wilts in many species. Advances in Plant Pathology, 291-312
- Hmeljeva uvelost v slovenskih hmeljiščih. 2006. Radišek S. (ur.), Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 24 str.
- Hsu T.-W., Tsai W.-C., Wang D.-P., Lin S., Hsiao Y.-Y., Chen W.-H., Chen H.-H. 2008. Differential gene expression analysis by cDNA-AFLP between flower buds of *Phalaenopsis* Hsiang Fei cv. H. F. and its somaclonal variant. Plant Science, 175:415–422
- Hwang I.-T., Kim Y.-J., Kim S.-H., Kwak C.-I., Gu Y.-Y., Chun J.-Y. 2003. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. BioTechniques, 35, 6: 1180-1184
- IndexFungorum. 2008.
<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=199278>
(1.4.2010)
- Inou H., Nojima H., Okayama H. 1990. high efficecy transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, 96, 1: 23-28
- Ivančič A. 2002. Osnove rastlinske hibridizacije. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 672 s.
- Jakše J. 2003. Izolacija mikrosatelitnih lokusov na krosomski DNA hmelja (*Humulus lupulus* L.) z obogatitvenim postopkom. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 140 str.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. Nature, 444: 232-329
- Jones D. A., Takemoto D. 2004. Plant innate immunity - direct and inderect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. Current Opinion in Immunology,16: 48-62
- 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., Prüfer D. 2001. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 11: 6511–6515
- Kim S., Kim S.-J., Shin Y.-J., Kang J.-H., Kim M.-R., Nam K. H., Lee M.-S., Lee S.-H., Kim Y.-H., Hong S.-K., Verma D. P. S., Chun J.-Y., Cheon C.-I. 2009. An atypical soybean leucine-rich repeat receptor-like kinase, GmLRK1, may be involved in the regulation of cell elongation. *Planta*, 229:811–821
- Lee S.-H., Lee K.-W., Kim K.-Y., Choi G. J., Yoon S. H., Ji H. C., Seo S., Lim Y. C., Ahsan N. 2009. Identification of salt-stress induced differentially expressed genes in barley leaves using the annealing-control-primer-based GeneFishing technique. *African Journal of Biotechnology*, 8,7:1326-1331
- Liang P., Zhu W., Zhang X., Zhen G., O'Connell R. P., Averboukh L., Wang F., Pardee A.B. 1994. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acid Research*, 22, 25: 5763-5764
- Lowe K. 2000. Recent advances in fluorescent differential display. V: Differential Display. Leslie R. A., Robertson H. A. (eds.). New York, Oxford University Press: 5-33
- McDowell J. M., Woffenden B. J. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology*, 21, 4: 178-183
- Murakami A., Darby P., Javornik B., Pais M. S. S., Seigner E., Lutz A., Svoboda P. 2006. Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity*, 97: 66–74
- Mysore K. S., Ryu C.-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know *TRENDS in Plant Science*, 9, 2: 97-104
- Neve R. A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- Parisy V., Poinssot B., Owsianowski L., Buchala A., Glazebrook J., Mauch F. 2006. Identification of PAD2 as a c-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49: 159–172
- Park J. S., Kim I. S., Cho M. S., Park S., Park S. G. 2006. Identification of differentially expressed genes involved in spine formation on seeds of *Daucus carota* L. (carrot), using annealing control primer (ACP) system. *Journal of Plant Biology*, 49, 2:133-140
- Pavlovič M. 2009. Ponudba hmelja v svetu v letih 2008 in 2009. *Hmeljar*, 71: 91-93
- Qin, Q.-M., Vallad, G. E., Wu, B. M., Subbarao, K. V. 2006. Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium* spp., *Phytopathology*, 96: 582-592
- PlantGDB (5.6.2010)
<http://www.plantgdb.org/> (1.8.2009)
- Radišek S. 2001. Analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) z molekulskimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. Magistrsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 61 str.
- 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. 2004. Molekularna variabilnost pri glivah (*Verticillium albo-atrum* in *V. dahliae*) in razvoj patotipsko specifičnih markerjev. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 107 str.
- Radišek S., Jakse J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 301–314
- Radišek S., Čerenak A., Javornik B. 2007. ŽLAHTNJENJE HMELJA NA ODPORNOST NA BOLEZNI: Postopki in tehnike pri selekciji križancev. *Hmeljarski bilten*, 14: 5-10
- Robb J. 2007. *Verticillium* tolerance: resistance, susceptibility or mutualism?. *Phytopathology*, 73: 1305-1308.
- Schwessinger B., Zipfel C. 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP triggered immunity in plants. *Current Opinion in Immunology*, 11: 389-395
- Seegene, Inc. 2000-2010.
<http://www.seegene.co.kr/en/service/acp.php> (30.4.2010)
- Slovensko biokemijsko društvo. 2007. Terminološka komisija (2.9.2009)
<http://bio.ijs.si/SBD/terminologija.html#I> (10.3.2010)
- Slovensko mikrobiološko društvo. Mikrobiološki slovar. 2002. Terminološka komisija (maj 2002)
<http://www.bfro.uni-lj.si/gost/smd/mikroslo/frame.htm> (15.4.2010)
- Steiner b., Kurz H., Lemmens M., Buerstmayr H. 2009. Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 753–764
- Štajner N., Satovic Z., Čerenak A., Javornik B. 2008. Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus* L.) as inferred from microsatellites. *Euphytica*, 161: 301–311
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sunderland, Sinauer Associates: 764 str.
- UniProt. 2002-2010.
<http://www.uniprot.org/> (1.8.2009)
- Vogelstein B., Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 2: 615-619
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 21: 4407-4414
- Vuytsteke M., Peleman J. D., Eijk M. J. T. 2007. AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nature Protocols*, 2, 6: 1387 -1398
- Wang X., Tang C., Zhang G., Li Y., Wang C., Liu B., Qu Z., Zhao J., Han Q., Huang L.,

- Chen X., Kang Z. 2009. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*. *BMC Genomics*, 10: 289
- Weaver K.R., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M., Callahan L.M. 1994. Isolation and cloning of DNA amplification products from silver stained polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 2: 226-227
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer K. *Fingerprinting in Plants and Fungi*. London, CRC Press, Inc.: 322 str.
- Xiao X., Li H., Tang C. 2009. A Silver-Staining cDNA-AFLP Protocol Suitable for Transcript Profiling in the Latex of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Molecular Biotechnology*, 42: 91–99

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki ste mi prekrižali pot v času študija. Vse izkušnje so bile neprecenljive.

Posebej pa bi se rada zahvalila naslednjim osebam, ki so bistveno vplivale na moje življenje v zadnjih petih letih.

Mentorju, doc. dr. Jerneju Jakšetu, ki me je več kot tri leta vodil in usmerjal skozi laboratorijsko delo in mi omogočil, da sem pridobila neprecenljive izkušnje, ki mi bodo prišle še kako prav v nadaljnji karieri.

Recenzentki, prof. dr. Marjani Regvar, ki je bila pripravljena prebrati moje diplomsko delo in mi dala koristne nasvete kako ga izboljšati.

Staršema in sestri za potrpežljivost, podporo, spodbude in pomoč, ter da mi niste dovolili, da bi od sebe dala manj kot le najboljše.

Klemenu za neskončno mero potrpežljivosti, vso spodbudo in ker si mi vedno stal ob strani in mi nikoli pustil obupati. Hvala tudi za vse pravopisne, slogovne in slovnične nasvete.

Evi, Tanji Đ., Gregorju, Roku in ostalim za vsa nepozabna BF druženja, izlete, ŠS BF in seveda Konferenco. Super je bilo! ☺

Barbari, Niki, Tanji, Tei in Vesni za tabore, terene, ure preživete v DŠB sobici, kosila, Biožure in skupinska učenja. Brez vas študij biologije ne bi bil tako zabaven. ☺

Vsem sedanjim in bivšim sodelavcem na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, še posebej pa Branki, obema Natašama in Tjaši G., ker ste mi bile vedno pripravljene pomagati, ko je šlo kaj narobe v laboratoriju.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste me na kakršenkoli način spremljali v času študija.

PRILOGE

Priloga A: Seznam 133 edinstvenih cDNA-AFLP zaporedij in podatkov o tem, iz katerega vzorca izvirajo.

Zaporedje	CELEIA OKUŽENA			CELEIA KONTROLA			WYE TARGET OKUŽEN			WYE TARGET KONTROLA		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
100-ICEL+_112-IIICEL-_113-IIICEL+17feb	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
100-ICEL+295-17feb09	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102-ICEL+245-17feb09	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103-ICEL+.1-230_113-IIICEL+	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104-ICEL+_118-IIICEL+_123-IIICEL+_135-IIWT+	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
105-ICEL+208_114-IIICEL+210-17feb09	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108-ICEL-160-17feb09	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
109-ICEL-150_110a-ICEL-148-17feb09	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10-IIWT+400-9sep	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
111-IIICEL+350-17feb09	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1140a-b-ICEL+148-17feb09	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
114-IIICEL+210-17feb09	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115-IIICEL+_23-ICEL+_30-IIICEL+_41-IIWT+	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
117-IIICEL+370-17feb09	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
122-IIICEL+280-17feb_31-IWT+275-9sep	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
126-IWT+190-17feb09	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
127-IWT+145-17feb09	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12-ICEL+260-9sep	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134-IIWT+230-17feb_35-IIWT+330-9sep	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
13-ICEL+220-9sep	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14-ICEL+185_19-ICEL+225-9sep	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15-ICEL+210-9sep	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16-ICEL+_17-IIICEL+_19-IIICEL-_20-IIWT+_23-IIWT+	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
16-ICEL+150-9sep	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
174-IWT+185-29maj	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
17-ICEL+300-9sep	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17-IIICEL+116_16-ICEL+116	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
180-IWT+_182-IIICEL+_189-IIICEL+_18-ICEL+_190-IIICEL+_191-IIICEL+-29maj	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
180-IWT+_185-ICEL+_188-ICEL+_189-IIICEL+	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
181-ICEL+_182-IIICEL+.1-180-29maj	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
185-ICEL+_187-IIICEL-_188-ICEL+29maj	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
186-IIICEL-119_187-IIICEL-118-29maj	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
195-IIICEL-140-29maj_21-IIWT-135	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0

Nadaljevanje

Zaporedje	CELEIA OKUŽENA			CELEIA KONTROLA			WYE TARGET OKUŽEN			WYE TARGET KONTROLA		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
15-3_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16-6_T7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17a-1_SP6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
17a-3_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19-1_SP6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2-4_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
24-2_T7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24-3_T7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25-1_T7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25-2_T7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3-1_T7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-2_SP6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-3_T7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-4_T7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34-1_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3-5_T7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35-2_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
35-6_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
38-1_T7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40-2_T7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-1_T7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-2_T7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3_SP6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45-1_SP6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
45-6_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
45-7_SP6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
45-8_SP6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
46-4_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
47-1_SP6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
48-1_T7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
48-2_T7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
49-5_T7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
49-6_T7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5-1_SP6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
51-2_SP6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
52-2_T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
53-5_T7-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54-1_T7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
58-1_SP6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

