

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok MIKLAV I

**BIOGEOGRAFSKA TIPIZACIJA HALOFILNE RNE
KVASOVKE *HORTAEA WERNECKII***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok MIKLAV I

**BIOGEOGRAFSKA TIPIZACIJA HALOFILNE ČRNE KVASOVKE
*HORTAEA WERNECKII***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BIOGEOGRAPHIC TYPIZATION OF THE HALOPHYLIC BLACK
YEAST *HORTAEA WERNECKII***

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaklju ek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr Nino Gunde-Cimerman, za recenzentko prof. dr. Ano Plemenita– in za predsednico komisije za zagovor doc. dr. Polono Zalar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehni-ka fakulteta, Oddelek za biologijo
lanica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehni-ka fakulteta, Oddelek za biologijo
lanica: prof. dr. Ana PLEMENITA™
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, in–titut za biokemijo

Datum zagovora: 6. 9. 2016

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identen tiskanemu. Na univerzo neodplamno, neizkljuno, prostorsko in časovno neomejeno prenam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogo anja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjiifnice Biotehni-ke fakultete.

Rok Miklav i

KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- TD** Dn
- DK** UDK 579(043.2)
- KG** *Hortaea werneckii*/ rne kvasovke/halotoleranca/AFLP/polimorfizen dolfine pomnofenih delov/M13
- AV** MIKLAV I , Rok
- SA** GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/PLEMENITA™ Ana (recenzentka)
- KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehni-ka fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI** 2016
- IN** BIOGEOGRAFSKA TIPIZACIJA HALOFILNE RNE KVASOVKE *HORTAEA WERNECKII*
- TD** Diplomsko delo (Univerzitetni -tudij)
- OP** XI, 64 str., 4 pregl., 13 sl., 1 pril., 56 vir. .
- IJ** sl
- JI** sl/en
- AI** *Hortaea werneckii* je ekstremno halotolerantna rna kvasovka, sprva poznana kot povzro iteljica povr-inske okuflbe dlani in stopal pri loveku, imenovane *tinea nigra*. Okuflba se pojavlja v tropskih in subtropskih predelih, kot saprofit pa je prisotna tudi v zmernem pasu. Osamili so jo iz -tevilnih naravnih slanih habitatov, kot so slanice v solinah, slana jezera, kamnite povr-ine ob obali in drugih. Je zna ilno polimorfna. Na spremembe v okolju se odzove s kompleksnim fivljenjskim krogom, kjer se izmenjujeta hidrofilna kvasna oblika in hidrofobna rast v obliki hif. Najbolj neugodne razmere preffivi s tvorbo meristematskih skupkov z debelo celi no steno. Zanja sta zna ilna tvorba kompatibilnega topljenca glicerola in pigmenta melanina, ki predstavlja za- ito pred sevanjem iz okolja, celice za- iti pred encimsko lizo, ekstremnimi temperaturami, oksidativni agensi in osmotskim stresom. *H. werneckii* je postala modelni organizem za preu evanje halotolerance pri evkariontih. V okviru diplomskega dela smo seve *H. werneckii*, izolirane iz razli nih habitatov in lokacij, od tropskega do zmernege pasu primerjali na mikromorfolo-kem in makromorfolo-kem nivoju, primerjali smo sposobnost rasti na goji- ih z razli nimi koncentracijami NaCl ter ugotavljali znotrajvrstno variabilnost. Slednje smo ugotavljali z metodama prstnega odtisa, in sicer z oligonukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 in s polimorfizmom dolfine pomnofenih delov (AFLP). Razlik v uspe-nosti rasti na goji- ih s povi-ano koncentracijo NaCl med sevi osamljenimi s love-ke kofle in solinskimi sevi nismo opazili. Ve ina sevov je rastla v razponu od 0 do 25 odstotkov dodanega NaCl. Na goji- ih s povi-ano koncentracijo NaCl in po dalj-em asu inkubacije smo opazili intenzivnej-o melanizacijo. Po molekularno-genetskih analizah se solinski in ostali okoljski sevi ter sevi izolirani s loveka niso lo evali v razli ne filogenetske skupine, ampak so bili zdruzeni. To je lahko pokazatelj, da vrsta ni posebej prilagojena na rast na love-ki kofi, ampak jo naseljuje zgolj zaradi podobnosti s svojim primarnim okoljem - solinami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
DC UDC 579(043.2)
CX *Hortaea werneckii*/black yeasts/halotolerance/AFLP/amplified fragment length polymorphism/M13 fingerprint
AU MIKLAV I Rok
AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/PLEMENTATMAna (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, department of Biology
PY 2016
TI BIOGEOGRAPHIC TYPIZATION OF THE HALOPHILIC BLACK YEAST *HORTAEA WERNECKII*
DT Graduation Thesis (Universty studies)
NO XI, 64 p., 4 tab., 13 fig., 1 ann., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Hortaea werneckii*, an extremely halotolerant black yeast, is known as a causative agent of *tinea nigra* in humans. This is a superficial black colouring of the palms of the hands and the soles of the feet. Infection occurs in tropical and subtropical regions. As a saprobe it is also present in the temperate zone. It was isolated from numerous natural hypersaline environments, including brines in salterns, saline lakes, rock surfaces near the marine coast and others. It is characteristically polymorphic. It reacts to the changes in the environment with a complex life cycle, alternating between a hydrophilic yeast-like growth and a hydrophobic growth in the form of hyphae. It survives the most adverse conditions by forming thick cell walled meristematic clumps. It produces a compatible solute glycerol, as well as the pigment melanin, which provides the protection against UV radiation, enzymatic lysis, extreme temperatures, oxidizing agents and osmotic stress. *H. werneckii* has become a model organism for halotolerance studying in eukaryotes. In this research, we compared various *H. werneckii* strains isolated from different habitats and locations from the tropical to the temperate zone. In order to determine the intraspecific variability, we compared the strains on the micro- and macro-morphological level, we tested them for their ability to grow on culture media with different concentrations of NaCl added. We performed two DNA fingerprinting techniques, the M13 fingerprinting and amplification fragment length polymorphism (AFLP). No differences in growth among the isolates from human skin and from salterns were recorded on culture media with high concentration of NaCl. Most strains thrived well on culture media with 0 to up to 25 % of added NaCl. In general, on culture media with a higher concentration of NaCl and after a longer incubation time, we observed a more intensive melanisation. Using the mentioned fingerprinting methods, no separate clustering of strains isolated from salterns versus strains isolated from humans and other natural habitats was observed. It appears that *H. werneckii* is present on human skin solely due to similar environmental factors, as present in its natural primary habitat - salterns.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-----------|
| KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO SLIK..... | VIII |
| KAZALO PREGLEDNIC | IX |
| KAZALO PRILOG..... | X |
| OKRAJ TM AVE IN SIMBOLI | XI |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 EKSTREMNI HABITATI IN SLANA OKOLJA | 3 |
| 2.2 HALOFILNI ORGANIZMI IN HALOFILNE GLIVE..... | 4 |
| 2.2.1 Prilagoditve mikroorganizmov na fivljenje v ekstremno slanah vodah | 5 |
| 2.3 RNE KVASOVKE | 6 |
| 2.4 <i>HORTAEA WERNECKII</i> | 8 |
| 2.4.1 Taksonomija..... | 8 |
| 2.4.2 Ekologija | 9 |
| 2.4.2.1 Naravna ekolo-ka ni-a..... | 9 |
| 2.4.2.2 <i>Tinea nigra</i> | 10 |
| 2.4.3 Morfologija..... | 12 |
| 2.4.4 Fiziologija | 13 |
| 2.4.5 Prilagoditve <i>H. werneckii</i> na slana okolja | 14 |
| 2.4.6 Molekularno genetske metode za prou evanje genetske raznolikosti | 15 |
| 3 MATERIAL IN METODE..... | 17 |
| 3.1 REAGENTI, KEMIKALIJE IN DRUGI PRIPOMO KI | 17 |
| 3.1.1 Kemikalije | 17 |
| 3.1.2 Laboratorijski pribor | 18 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.1.3 | Laboratorijske aparature | 19 |
| 3.2 | GOJI™ A, PUFRI, ZMESI IN GELI..... | 19 |
| 3.2.1 | Goji- a..... | 19 |
| 3.2.2 | Zmesi | 21 |
| 3.2.3 | Pufri..... | 21 |
| 3.2.4 | Geli za analizo DNA..... | 22 |
| 3.3 | UPORABLJENI SEVI..... | 24 |
| 3.4 | METODE..... | 25 |
| 3.4.1 | Molekularno genetske analize | 26 |
| 3.4.1.1 | Izolacija genomske DNA | 26 |
| 3.4.1.2 | Agarozna gelska elektroforeza..... | 27 |
| 3.4.1.3 | Metoda prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 (M13 fingerprinting)..... | 27 |
| 3.4.1.4 | Polimorfizem dolfine pomnoffenih delov (AFLP) | 29 |
| 3.4.2 | Morfolo-ke analize | 35 |
| 3.4.2.1 | Makromorfolo-ki opis | 35 |
| 3.4.2.2 | Mikromorfolo-ki opis..... | 36 |
| 4 | REZULTATI..... | 37 |
| 4.1 | MOLEKULARNO GENETSKE ANALIZE..... | 37 |
| 4.1.1 | Metoda prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 | 37 |
| 4.1.2 | Polimorfizem dolfine pomnoffenih delov (AFLP) | 38 |
| 4.2 | MORFOLO™KE ANALIZE | 41 |
| 4.2.1 | Makromorfolo-ki opis | 41 |
| 4.2.2 | Mikromofolo-ki opis | 44 |
| 5 | DISKUSIJA | 54 |
| 5.1 | MIKRO IN MAKROMORFOLOGIJA | 54 |
| 5.2 | MOLEKULARNO GENETSKE ANALIZE..... | 55 |
| 6 | SKLEPI | 58 |
| 7 | POVZETEK..... | 59 |

8 VIRI 60

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: fiivljenski krog <i>H. werneckii</i> (prirejeno po de Hoog, Gerrits van den Ende 1992) | 13 |
| Slika 2: Fotografija gela pomnoženih fragmentov lo enih z elektroforezo pri metodi prstnega odtisa z za etnikom M13 | 37 |
| Slika 3: Dendrogram podobnosti pridobljen po metodi prstnih odtisov za etnika M13 | 38 |
| Slika 4: Dendrogram izrisan na podlagi matrike podobnosti profilov AFLP. | 40 |
| Slika 5: Razli ni tipi kolonij <i>H. werneckii</i> na goji– u MEA. | 42 |
| Slika 6: Povpre ja premerov kolonij (s standardnimi odkloni) vseh sevov na goji– u MEA z dodanim NaCl..... | 43 |
| Slika 7: Povpre ja premerov kolonij (s standardnim odklonom) solinskih sevov in sevov izoliranih s loveka po treh tednih inkubacije na goji– u MEA z dodanim NaCl. | 44 |
| Slika 8: Makro in mikromorfolo–ke zna ilnosti seva EXF-155 na goji– u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl. | 48 |
| Slika 9: Makro in mikromorfolo–ke zna ilnosti seva EXF-241 na goji– u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl. | 49 |
| Slika 10: Makro in mikromorfolo–ke zna ilnosti seva EXF-2687 na goji– u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl. | 50 |
| Slika 11: Makro in mikromorfolo–ke zna ilnosti seva EXF-2688 na goji– u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl. | 51 |
| Slika 12: Makro in mikromorfolo–ke zna ilnosti seva EXF-2690 na goji– u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl. | 52 |
| Slika 13: Zna ilne strukture razli nih sevov vrste <i>H. werneckii</i> , na goji– ih MEA z dodanimi razli nimi koncentracijami NaCl, vidne z diferencialno interferen nim mikroskopom pri 1000x pove avi..... | 53 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij..... | 17 |
| Preglednica 2: Seznam uporabljenih aparatur..... | 19 |
| Preglednica 3: Seznam uporabljenih sevov..... | 24 |
| Preglednica 4: Lastnosti celic izbranih sevov, pridobljene z diferencialno interferen no mikroskopijo..... | 45 |

KAZALO PRILOG

**PRILOGA A : VELIKOSTI KOLONIJ V MILIMETRIH NA GOJI™ U MEA Z
RAZLI NIMI KONCENTRACIJAMI NACL, PO ENEM, DVEH IN TREH TEDNIH
INKUBACIJE**

OKRAJ^{TA}AVE IN SIMBOLI

| | |
|--------------------|---|
| AFLP | polimorfizem dolfin pomnofenih delov (ang. Amplified Ffragment Llength Ppolymorphism) |
| bp | bazni par |
| CBS | mikrobiolo-ka zbirka gliv Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht |
| CTAB | cetiltrimetilamonijev bromid |
| ddH ₂ O | bidestilirana voda |
| dH ₂ O | destilirana voda |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| dNTP | deoksinukleotid trifosfat |
| EDTA | etildiamintetraocetna kislina |
| H ₂ O | voda |
| HCl | klorovodikova kislina |
| M | molarno (mol/l) |
| MEA | agar s sladnim ekstraktom (ang. Malt extract agar) |
| MgCl ₂ | magnezijev (II) klorid |
| MZKI | Mikrobiolo-ka zbirka Kemijskega in-tituta |
| NaCl | natrijev klorid |
| obr/min | obrati na minuto |
| oz. | oziroma |
| PCR | verifna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction) |
| pH | negativni logaritem koncentracije protonov |
| pmol | pikomol (10 ⁻¹² mol) |
| RAPD | naklju no pomnofevanje polimorfne DNA (ang. Random Amplified Polymorphic DNA) |
| RFLP | polimorfizem dolfin restrikcijskih fragmentov (ang. Restriction Fragment Llength Polymorphism) |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| sod. | sodelavci |
| TBE | TRIS-borat-EDTA |
| TE | TRIS-EDTA |
| TRIS | 2-amino-2-hidroskimetil-propan-1,3diol |
| UPGMA | netehtana metoda parnih skupin z aritmeti no sredino (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) |
| UV | ultravioli en |
| ZDA | Zdrufene drflave Amerike |

1 UVOD

Hortaea werneckii je halofilna rna kvasovka, sicer znana kot povzročiteljica mikoze pri loveku, imenovane »tinea nigra«. Infekcija s *H. werneckii* se odraža v obliki rnih madežev, najpogosteje na dlaneh in podplatih. Ne velja pa kot patogena sprememba, saj je glivo mofno odstraniti s temeljitej-im spiranjem, hife pa nikoli ne prodrejo do flive plasti kofnih celic, ampak se omejujejo na rofleno in lipidno plast kofe. Kofne spremembe na ra un *H. werneckii* so bile opaflene izklju no v tropskem in subtropskem pasu.

Glivo *H. werneckii* so osamili iz izjemno slane vode solin po celem svetu (Slovenija, Bosna in Hercegovina, Tpanija, Dominikanska Republika, Namibija, Portugalska, Tajska). Raznolik izvor sevov, tako s loveka kot iz ekstremne naravne ekolo-ke ni-e - solin, pa postavlja vpra-anje, ali se izolati iz okolja in iz loveka razlikujejo.

1.1 NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti znotrajvrstno variabilnost glive *Hortaea werneckii*. Izolati za nalogo so bili pridobljeni z dolgoletnimi -tudijami biolo-ke raznovrstnosti gliv v izjemno slanah vodah solin po celem svetu. Naloga je vklju evala tudi seve, obravnavane v prej-njih populacijskih -tudijah, izolirane s kofe dlani in podplatov loveka, pridobljene iz drugih mikrobiolo-kih zbirk. Znotrajvrstno variabilnost smo ugotavljali z metodo raznolikosti dolfin pomnoflenih fragmentov (AFLP) in metodo prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 (M13 fingerprinting), spremljali pa smo tudi fenotipske lastnosti, kot je sposobnost rasti pri visokih koncentracijah NaCl ter morfolo-ke oblike in zna ilnosti pri omenjenih pogojih.

HIPOTEZE:

1. Solinski in ostali okoljski sevi ter sevi osamljeni iz ljudi in flivali ne bodo lo eni v razli ne filogenetsko podprte skupine, temve bodo med seboj pome-ani, kar bo posredno nakazovalo, da vrsta *H. werneckii* za loveka ni patogena.
2. Solinski in ostali okoljski sevi ter sevi osamljeni iz ljudi in flivali se ne bodo razlikovali v profilu rasti na goji-ih z dodanimi razli nimi koncentracijami NaCl.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EKSTREMNI HABITATI IN SLANA OKOLJA

Na Zemlji je poleg obi ajnih habitatov, ki omogo ajo flivljenje ve ini organizmom, tudi mnogo ekstremnih, kjer lahko preflivijo le prilagojeni organizmi. Skupna lastnost ekstremnih okolji je, da se fizikalno-kemijski parametri (tlak, temperatura, pH, dostopnost vode) toliko odmikajo od normalnih, mezofilnih vrednosti, da tukaj preflivijo le izredno prilagojeni - ekstremofilni organizmi.

Vodna okolja, kjer je koncentracija soli mnogo vi-ja od 3% (m/V) (0,5M NaCl) oz. slanosti morske vode, so habitati s pove-ano slanostjo. Imenujemo jih hiperslani habitati, tam flive e organizme, pa na sol odporni oz. halotolerantni in slanoljubni oz. halofilni organizmi. Razmejitev med halofilnimi ter halotolerantnimi organizmi je umetna in arbitrarna. Ker oceani predstavljajo 97% vse razpolofljive vode na Zemlji in prekrivajo 71% povr-ine Zemlje, se mora veliko tam flive ih organizmov kosati s pove ano slanostjo v svojem okolju (~3.5 % (m/V)). Oceanov pa kljub dejstvu, da v njih ne more prefliveti ve ina kopenskih in sladkovodnih organizmov, zaradi razsefnosti in velikega -tevila tam flive ih vrst, ne moremo imenovati ekstremno okolje.

Ekstremno slana vodna okolja nastanejo, kjer je zmanj-an oz. prepre en dotok vode in kjer prihaja do pove ane evaporacije. Primer tak-nih habitatov so solarne soline (Zalar, 1999) in slana jezera (Oren, 2002).

Visoke koncentracije topljencev v vodni raztopini zmanj-ujejo dostopnost vode za organizme, ki flivijo v takem okolju. Dostopnost vode za organizme lahko opi-emo na ve na inov (kot vodni potencial, kot osmotski potencial, kot kemijski potencial vode, kot osmotski tlak ali osmolalnost), najpogosteje pa se v zvezi z mikroorganizmi uporablja vodna aktivnost (a_w) (Blomberg in Adler, 1992). Najpogosteje uporabljena dogovorjena meja vodne aktivnosti, pod

katero lahko uspevajo izključno ekstremofilni organizmi, je $a_w=0,85$, kar ustreza 17 % (2.93M) raztopini NaCl (Pitt in Hocking 1977).

2.2 HALOFILNI ORGANIZMI IN HALOFILNE GLIVE

Halofilne organizme najdemo med prokarionti in evkarionti. Med prokarionti so najznačilnejše arheje iz reda *Halobacteriales* ter bakterije iz reda *Haloanaerobiales*. Pri evkariontih pa poznamo slanophilne rastline (halofite), ki uspevajo na tleh s povečano vsebnostjo soli, v vodah pa najdemo številne enocelularne alge in glive, pa tudi večcelularne alge in rastline. Med halofilnimi evkarionti sta najbolj znana solinski rakec (*Artemia salina*) in zelena alga *Dunaliella salina* (Oren, 2002).

Prav tako so glive fiziološko dobro prilagojene na življenje z nizkimi vodnimi aktivnostmi (Javor, 1989), jih do konca 80ih let niso povezovali z ekstremno slanimi habitatami. Izraz »halofilni« se je uporabljal le za bakterije in alge. Na koncu 80ih in v začetku 90ih, so za nekatere glive tudi dokazali, da rastejo bolje na gojiščih, kjer je kot topljenec dodan NaCl (Andrews in Pitt. 1987), halofilnost pri glivah pa je dobivala vedno večji pomen.

Leta 1997 so iz ekstremno slanega voda solarnih solin pri Sečovljah, izolirali številne vrste gliv, ki so jih razdelili v dve skupini. V prvi so bile kserotilne glive, ki so zrastle na gojiščih, bogatih s sladkorji. Te so spadale v nemelanizirano skupino gliv, ki jih običajno najdemo na hrani, konzervirani z visokimi koncentracijami sladkorja ali NaCl (*Wallemia sebi*, *Aspergillus* spp, idr.). Predvidevali so, da najverjetneje njihova naravna ekološka niša ni slana solinska voda, ampak naj bi bile tja zanešene iz tal ali dna bazenov, ki jih ob zimski praznini, spore pa so preživlele osmotski stres. Druga skupina gliv, ki so zrastle na slanah gojiščih, pa so bile halotolerantne in halofilne glive, ki so jih uvrstili v skupino kvasovkam podobnih in hifomicetnih gliv. Za te so predvidevali, da lahko preživijo v solinski slanici in da so soline

njihova naravna ekolo-ka ni-a. Med njimi je bila tudi rna kvasovka *Hortaea werneckii*. (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

Filamentozne halofilne glive, so izolirali tudi iz vodnih vzorcev Mrtvega morja (Buchalo in sod., 1998) ter dokazali njihovo sposobnost preflivetja pri visokih koncentracijah NaCl in s tem njihovo halotolerantno oz. halofilno naravo. (Kis-Papo in sod. 2003).

2.2.1 Prilagoditve mikroorganizmov na flivljenje v ekstremno slanah vodah

Organizmi, ki flivijo v ekstremno slanah okoljih, problem osmotskega tlaka, s tem pa izgubo vode iz celice re-ujejo tako, da izena ijo znotrajceli no vodno aktivnost, z vodno aktivnostjo v okolju. Prepoznani sta bili dve temeljni strategiji.

Prva je strategija vzdrflevanja visoke znotrajceli ne koncentracije ionov (t.i. »salt-in« strategija). Z energetsko ugodnim rpanjem ionov v celico ó saj je le-teh v okolici v izobilju ó doseflejo, da je znotrajceli na koncentracija ionov podobna koncentracijam v okolju. Ta strategija zahteva velike prilagoditve encimov in znotrajceli nih struktur na pove ano koncentracijo soli, saj je le tako lahko zagotovljeno nemoteno delovanje znotrajceli nih encimatskih mehanizmov. To strategijo je razvilo v dolgotrajnem in kompleksnem evolucijskem procesu le omejeno -tevalo prokariontov. Med njimi so aerobne ekstremno halofilne arheje iz redu *Halobacteriales* in anaerobne halofilne bakterije iz redu *Haloanaerobiales* (Oren, 1999)

Druga strategija je strategija kompatibilnih topljencev. Te strategije se posluflujejo vsi ostali halofilni mikroorganizmi (ostale bakterije, alge in glive). Gre za vzdrflevanje osmotskega ravnoteffja z lastno sintezo, ali s privzemom majhnih organskih molekul iz okolja. To so kompatibilni topljenci ó snovi z nizko molekulsko maso, nenabiti in zelo dobro topni v vodi. Najpogostej-i so polioli, kot so glicerol in arabitol, sladkorji in njihovi derivati, kot so

saharoza, trehaloza in glukozilglicerol ter aminokislina in njihovi derivati. Njihova sinteza je energetsko zahtevna, niso pa potrebne posebne prilagoditve znotrajceli nih struktur in encimov, saj je tudi pri visokih koncentracijah kompatibilnih topljencev omogo eno u inkovito delovanje encimov in celi nih struktur (Oren, 1999).

Med adaptacijo celic na stres se spremeni izraflanje genov za dolo ene proteine (Blomberg, 2000), sinteza le-teh pa je najve je v sredini obdobja prilagajanja (Norbeck in Blomberg, 1996).

Spremenjena je tudi aminokislinska sestava proteinov, predvsem pri tistih vrstah, ki vzdrflujejo visoke koncentracije soli znotraj celic (Oren, 1999).

2.3 RNE KVASOVKE

» rne kvasovke« je termin, ki ozna uje tako po taksonomskem, kot po filogenetskem vidiku zelo heterogeno skupino gliv, ki imajo nekatere skupne lastnosti. Te so debela melanizirana celi na stena, meristematska rast, tvorba h erinskih celic s kvasovkam-podobno multilateralno ali polarno cepitvijo, sposobnost micelijske rasti, proizvodjanje ekstracelularnih polisaharidov in kislih ali bazi nih sekundarnih metabolitov, toleranca za vodni in temperaturni stres in zapleten flivljenjski krog, kjer se izmenjujeta hidrofobna in hidrofilna faza. (de Hoog, 1993). Le redke vrste ne tvorijo nikakr-ne hifne faze (Sterflinger, 2006).

V literaturi naletimo tudi na izraz »meristematske glive«. Meristematske glive sta Hoog in Hermanides-Nijhoff (1977) opisala kot glive, ki tvorijo skupke melaniziranih, debelostenskih, izodiametri no rasto ih celic.

Nekatere vrste imajo morfolo-ke zna ilnosti, ki sovpadajo z obema opisoma. *Hortaea werneckii* npr., je melanizirana gliva, ki se razmnofluje med drugim tudi s kvasovkam-

podobno cepitvijo, sposobna pa je tvorbe meristematskih skupkov z izodiametri no rasto imi celicami (Sterflinger 2006). Nekatere meristematske glive tako lahko uvr- amo med rne kvasovke in obratno. Ozko filogenetsko sorodnost med obema skupinama sta fle leta 1977 predlagala de Hoog in Hernandez-Nijhof, kasneje pa je bila z molekularno-genetskimi metodami teza tudi potrjena (Sterflinger in sod. 1999).

Razvr- anje rnih kvasovk v taksonomske skupine, je tudi za izku- enega mikologa izredno zahtevno. Eden od razlogov je izjemno podobna morfologija nekaterih vrst in rodov. Tako so lahko sorodne vrste morfolo- ko divergentne, po morfologiji podobne glive pa filogenetsko manj sorodne, kot bi pri akovali (Sterflinger, 2006).

Nadaljnji razlog za teflavno razvr- anje rnih kvasovk v taksone, je njihov pleomorfizem. Pleomorfna gliva je tista, ki ima morfolo- ko razli ne oblike nespolnega (anamorf) in spolnega razmnoflevanja (teleomorf). Nekatere vrste so sinanamorfne, kar pomeni, da imajo ve morfolo- ko razli nih nespolnih oblik, poleg tega pa lahko imajo te nespolne oblike razli ne morfologije konidiogeneze (tvorbe spor), kar pa je pri identifikaciji na osnovi morfologije eden od pglavitnih znakov (Sterflinger, 2006).

Pri taksonomiji zato uporabljamo poleg morfolo- kih zna ilnosti, -e biokemijske in fiziolo- ke teste ter v zadnjih letih predvsem molekularno-genetske metode. Le z molekularno-genetskimi analizami se da ugotoviti, da sta dve morfolo- ko povsem razli ni glivi, v resnici le razli na sinanamorfa iste vrste.

Filogenetska drevesa, na osnovi sekvenc rRNA male ribosomske podenote (SSU rRNA), nam pokafljejo, da so rne kvasovke filogenetsko zelo oddaljene od razreda Hemiascomycetes, ki vsebuje najbolj znane rodove tipi nih kvasovk: *Saccharomyces*, *Candida* in *Pichia*. (Haase 1999). To potrjujejo tudi kemotaksonomski podatki, saj celi na stena rnih kvasovk sestoji iz hitina in ne celuloze in manoze, kot pri kvasovkah. rne »kvasovke« jim pravimo zgolj zaradi kvasovkam podobne rasti in razmnoflevanja s cepitvijo.

rne kvasovke najdemo v skupini Ascomycetes, so pa filogenetsko zelo raznolike. Le nekaj melaniziranih predstavnikov najdemo v skupini Basidiomycetes, in sicer v rodovih *Trichosporonoides* in *Moniliella* (Haase in sod., 1999).

Do nedavnega je veljalo, da v filogenetskem drevesu na osnovi SSU rRNA, najdemo askomicetne rne kvasovke v dveh redovih, in sicer *Chaethothyriales* in *Dothideales*. Eden meristematski predstavnik (*Botryomyces caespitosus*) pa spada v red *Plesoporales*. Med *Chaethothyriales* najdemo predstavnike iz rodov *Phialophora* in *Exophiala*. *Exophiala* je najveji rod rnih kvasovk, predstavniki pa so znani po številnih okužbah loveka. V redu *Dothideales* najdemo predstavnike, ki so v meristematski obliki cel fivljenjski cikel (*Phaeotheca*, *Phaeosclera*, *Hyphospora*) in tak-ne ki so sposobni tvorbe meristematskih sinanamorfov (*Aureobasidium*, *Hortaea*) (Sterflinger 2006).

rne kvasovke bi lahko glede na njihove ekolo-ke ni-e razdelili v tri skupine: glive, ki naseljujejo naravne ali umetno ustvarjene osmotske habitate, glive rasto e na kamninah ter glive ki povzro ajo mikoze pri ljudeh in fivalih (Zalar, 1999). Ve inoma imajo vsi opisani habitati zna ilne skupne lastnosti kot, so omejena dostopnost vode, UV sevanje, osmotski stres, pomanjkanje hranil in pogoste ekstremne temperature. Pogosto se zgodi, da zaradi podobnih razmer ista vrsta rnih kvasovk uspeva na ve ih zgoraj omenjenih habitatih.

2.4 HORTAEA WERNECKII

2.4.1 Taksonomija

Hortaea werneckii (Horta) Nishimura et Miyaji, je fle od svojega poimenovanja leta 1921 povzro ala teflave pri uvr- anju v taksonomski sistem. Horta jo je opisal na podlagi povr-inske lezije kofle loveka in jo uvrstil v rod *Cladosporium* kot vrsto *C. werneckii* Horta. Leta 1935 jo je Dodge preimenoval v *Dermatium werneckii* (Horta) Dodge. Leta 1952 jo je de Vries preimenoval v *Pullularia werneckii* (Horta) de Vries, von Arx pa jo je leta 1970 preimenoval v

Exophiala werneckii (Horta) von Arx in uvrstil v rod *Exophiala*. Leta 1977 sta de Hoog in Hermanides-Nijhof objavila sinonimijo med *E. werneckii* (Horta) von Arx ter med vrsto *Sarcinomyces crustaceus* Lindner. Obstaja -e vrsta sinonimov, kot so *Cryptococcus metaniger* Castell., opisana leta 1927, *Cladosporium metanigrum* (Castell.) Ferrari, opisana leta 1932, *Pullularia fermentans* Wynne et Gott var. *castellanii* Wynne et Gott, ter varieteta iste vrste *Pullularia fermentans* Wynne et Gott var. *leaoi* Wynne et Gott, opisani leta 1956. Kon no poimenovanje v popolnoma nov rod, *Hortaea* Nishimura et Miyaji, je sledilo po vrsti ni elektronsko-mikroskopski raziskavi, ko sta avtorja poleg anelidnega, odkrila enkraten simpodialen na in konidiogeneze (Nishimura in Miyaji, 1984). Od tedaj naprej lahko ta na in konidiogeneze zasledujemo tudi s svetlobno mikroskopijo. (Zalar, 1999).

Danes veljavna klasifikacija vrste *Hortaea werneckii*:

Kraljevstvo Glive

Deblo Ascomycota

Razred *Dothideomycetes*

Podrazred *Dothideomycetidae*

Red *Capnoidales*

Druffina *Teratosphaeriaceae*

Rod *Hortaea* (Nishim. in Miyaji 1984)

Vrsta *Hortaea werneckii* (Horta) Nishimura in Miyaji 1984

2.4.2 Ekologija

2.4.2.1 Naravna ekolo-ka ni-a

Ker so sprva *H. werneckii* poznali le kot povzro iteljico tinea nigre, se je pojavljalo vpra-anje o njeni naravni ekolo-ki ni-i. Naravno ekolo-ko ni-o *H. werneckii* sta na podlagi

ekofiziolo-kih testov de Hoog in Gerrtis van den Ende (1992) opisala kot ob asno suho, sicer pa slano vodno okolje. Njuno sklepanje je potrdila izolacija *H. werneckii* iz solarnih solin tekem celotne kristalizacijske sezone, kjer vsebnost NaCl v vodi naraste tudi do 30% (Gunde-Cimernam in sod. 2000), evaporacijski bazeni pa so med praznitvijo povsem brez vode.

Do danes so *H. werneckii* izolirali -e iz -tevilnih drugih okolij, vklju no s solinami v Tpaniji, Franciji, na Portugalskem, v Dominikanski republiki, v Namibiji in Portoriku, izolirali so jo iz potaplja-ke opreme v Tpaniji (Cabanes in sid., 2012), z listov mangrove na Kitajskem (Chen in sod., 2012) z marmornega kipa ob morju iz Gr ije (Sterflinger K., 1998), iz okon in morskega pra-i ka (Sharmin in sod. 2002) in -tevilnih drugih.

2.4.2.2 *Tinea nigra*

Hortaea werneckii je bila v preteklosti najbolj poznana kot povzro iteljica povr-inske kofne spremembe imenovane *tinea nigra*. *Tinea nigra* je bila prvi opaena fe leta 1872 na jufnem Kitajskem (Neves, Costa, 1947). Prve publikacije o infekciji in njeni povzro iteljici so se pojavile leta 1905 (Castellani, 1966), leta 1921 pa je Horta izoliral in poimenoval povzro itelja z originalnim imenom *Cladosporium werneckii*. Sprva je veljala kot patogena okuflba kofe, a se je kasneje pokazalo, da gliva naseljuje le zgornjo plast odmrlih celic kofe (stratum corneum) in ne prodira v globlje plasti do flivih celic. Vrsta ni sposobna razgradnje keratina. Hidrofobnost celi ne povr-ine, odpornost na visoko koncentracijo soli in na nizek pH, ter sposobnost razgradnje in asimilacije lipidov ji omogo a pritrjanje in preflivetje na love-ki kofli (Göttlich in sod., 1995).

Tinea nigra se na kofli pokazfe kot temni - rjavi do rni madeffi velikosti od nekaj milimetrov do nekaj centimetrov, navadno nepravilnih oblik. Pojavijo se 2-7 tednov po kontaktu z glivo. Imajo ostro definiran rob, niso dvignjeni in ne luskasti. Madeffi navadno ne srbijo, ne bolijo in

niso povezani z vnetjem. Pojavljajo se na dlaneh, redkeje na podplatih ali drugje (prsti, vrat, prsni ko-,...) (Bonifaz in sod. 2008, Perez in sod. 2005).

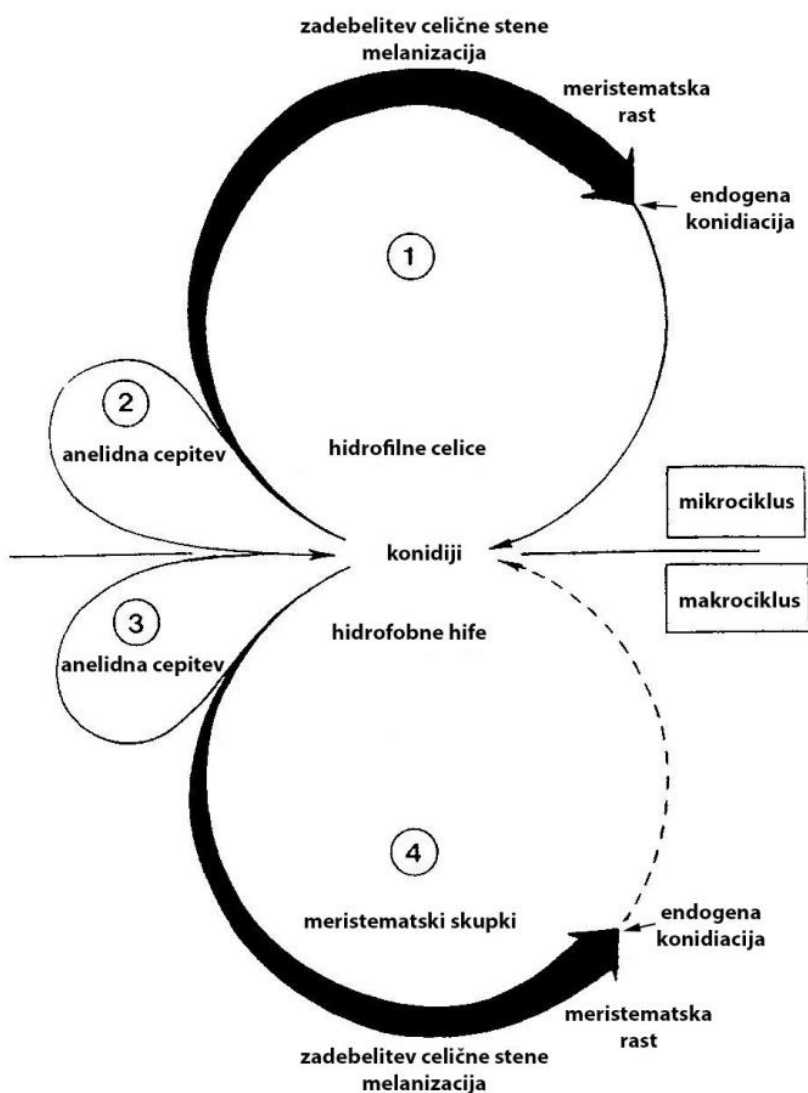
Tinea nigra je prisotna v tropskih in sub-tropskih predelih Srednje in Jufne Amerike, Afrike in Azije (McKinlay in sod. 1999). Poro ajo tudi o primerih iz Severne Amerike in Evrope, vendar naj bi ti pacienti v preteklosti obiskali ameri-ke trope ali Karibske otoke (Perez C. in sod. 2005). Najverjetneje so ti ljudje pri-li v stik z glivo, ko so bos hodili po plaffi, otroci pa pri ofotanju v obmorskih luffah. Po enih virih naj bi se najpogosteje pojavljala pri mladostnicah in otrocih (McKinlay in sod. 1999), po drugih virih pa naj bi se okuffba pojavlja enako pogosto pri vseh spolih in starostnih skupinah (Bonifaz in sod. 2008). Oslabitev imunskega sistema za okuffbo ni poglavitna. Kot edini predispozicijski faktor navajajo hiperhidrozo ó ljudje s ezmemim znojenjem dlani so bolj dovzetni za okuffbo (Perez in sod. 2005). Pogosteje poro ajo o okuffbah pri svetlopoltih ljudeh, najverjetneje zato, ker so madeffi na temnej-i kofii teffje opazni. Okuffba s *H. werneckii* je dokaj redka. Predstavlja manj kot 1% vseh glivnih okuffb (Bonifaz in sod. 2008). Frekvenca okuffb s *H. werneckii* je najverjetneje ve ja, a zaradi svoje asimptomatske narave in mofnosti spontane ozdravitve le malo ljudi poi-e zdravni-ko pomo , pa -e ti zato, ker spremembe na kofii zamenjajo s prvimi znaki kofinega raka. V preteklosti je ve krat prihajalo do zamenjave madeffev z malignim melanomom in tako do nepotrebnih bole ih biopsij. *Tinea nigra* se preprosto in hitro diagnosticira z dermatoskopijo kofinega madeffa in s svetlobno mikroskopijo pripravka strganja povr-ine madeffa v raztopini KOH, ki se kasneje lahko dokaffe tudi kot rast zna ilnih kolonij na trdnem goji-u. Madeffi se lahko u inkovito odpravijo s temeljitej-im strganjem povr-ine ali s keratoliti nimi pripravki (lu- ijo povrhnjico kofe). Zelo u inkovito je Whitfieldovo mazilo, ki vsebuje 3% raztopino salicilne kisline in 6% raztopino benzojske kisline. U inkovite so tudi razne lokalne aplikacije protiglivi nih mazil, ki zavirajo biosintezo ergosterola v celi ni membrani gliv, kot so bifonazol klortrimazol, ketokonazol, tebrinafin ter ciklopiroks olamin, ki pa deluje na -tevilne celi ne encime, kot so peroksidaze, katalaze in Na⁺ K⁺ ATP-aza (Bonifaz in sod. 2008, Perez in sod. 2005).

2.4.3 Morfologija

Hortaea. werneckii je zna ilno polimorfna, njena oblika pa odvisna od trenutnih pogojev v okolju. Kolonije so po asi rasto e, gladke in sluzaste, zra ni micelij je olivno zelene do rne barve, gladek in septiran. (Chen in sod., 2012). Hife med staranjem kolonij postanejo gosto septirane, rjavno obarvane in imajo debelo celi no steno. Na konidiogenih celicah, ki so name- ene interkalarno ali lateralno, so zna ilne 1-2 m dolge anelacijske cone. Konidiji so obi ajno elipsoidni, lahko pre no septirani, pogosto se preobrazijo v skupke hlamidospor, imenovane meristematski skupki. (de Hoog in sod., 2000).

Kot tudi nekatere druge rne kvasovke, ima *H. werneckii* kompleksen flivljenjski ciklus, kjer se izmenjavata hidrofilen in hidrofoben na in rasti, kar se ujema s spremenljivimi pogoji v solinah in slanih morskih lufah v obmo ju plimovanja.

V ugodnih pogojih, torej pri zmerni temperaturi in v vodi bogati s hranili, je gliva v hidrofilni kvasni obliki. Temu delu cikla pravimo mikrociklus - Slika 1(2). Pri teh pogojih kvasne celice pospe- eno tvorijo h erinske celice s polarno anelidno cepitvijo, na mestu cepitve pa ostanejo obro kaste "brazgotine". Materinske celice postopoma odebelijo in tvorijo debele celi ne stene ó za ne se meristematska rast, anelidna cepitev se ustavi - Slika 1(1). Sedaj se h erinske celice tvorijo z endogeno konidiacijo ó olu- i se celi na stena materinske celice in sprostijo se konidiji s tanko celi no steno. Na okoljski stres, kot je su-a, pomanjkanje hranil ali sprememba temperature, se gliva odzove s produkcijo hidrofobnih hif. Temu delu cikla pravimo makrociklus - Slika 1(3). Hife kalijo skozi celi no steno materinske celice. Interkalarne celice hif tvorijo konidije, ki se spro- ajo spiralno. V zelo neugodnih razmerah pa se tvorijo dormantna sklerocijska telesca (hlamidospore), ki so mo no melanizirana in imajo debele celi ne stene - Slika 1(4). V ugodnih okoljskih pogojih se z njih z endogeno konidiacijo sprostijo h erinske celice (de Hoog, Gerrtis van den Ende 1992).



Slika 1: fivljenski krog *H. werneckii* (prirejeno po de Hoog, Gerrtis van den Ende 1992)

2.4.4 Fiziologija

Sevi vrste *Hortaea werneckii* rastejo v razponu 0 do 30 % NaCl v goji- u. Optimalna koncentracija NaCl za rast in razmnoflevanje je 5 do 10 %. Prisotnost NaCl je torej eden od klju nih faktorjev rasti *H. werneckii*, ni pa nujno potrebna za njeno rast (Zalar in sod., 1999a).

Glive ki lahko rastejo pri 3 M koncentracijah NaCl (a_w 0,85) in so jih redno izolirali iz razli nih slanah okolij z koncentraciji NaCl ve jo kot 1,7 M kategoriziramo kot ekstremno halotolerantne, medtem, ko so sporadi ni izolati, ki lahko rastejo pri 3 M koncentracijah NaCl kategorizirani kot halotolerantne glive.

H. werneckii lahko asimilira laktozo, nitrat in nitrit, zmo flna je rasti brez ali pri majhnih koncentracijah L-lizina, kadaverina, kreatinina (de Hoog in sod., 1992). Vrsta ni sposobna razgradnje keratina, ima pa lipoliti no aktivnost (Cabanes in sod., 2012). Zna ilna je tudi sinteza ureaze (Ng in sod., 2005). Optimalna temperatura rasti je 25 °C, pri 37 °C ne raste (de Hoog in sod., 1992). Optimalno pH obmo je rasti je 6,0 (Chen in sod., 2012). Je obligatno aerobna vrsta. (Abliz in sod., 2003)

2.4.5 Prilagoditve *H. werneckii* na slana okolja

Pri visokih koncentracijah soli v okolju, halotolerantne in halofine glive, vzdr flujejo pozitivni turgorski tlak s pove ano tvorbo in kopi enjem kompatibilnih topljencev znotraj celic. Pri *H. werneckii* so to glicerol in nekateri drugi poliooli (eritritol, inositol, arabitol, ksilitol in manitol) (Plemenita–in sod. 2008) ter mikosporini (Kogelj in sod. 2007)

Znotrajceli no kopi enje kalijevih K^+ in natrijevih Na^+ ionov, je pri *H. werneckii* tudi pri visokih koncentracijah soli v okolju (4,5 M NaCl) nizko, kar izklju uje osmotsko prilagajanje na povi–ano slanost z uporabo znotrajceli nih ionov (Kogej in sod. 2007).

Melanizacija ima pomembno vlogo pri preflivetju gliv v ekstremnih okoljih, saj omogo a odpornost gliv na sevanje iz okolja, celice za– iti pred encimsko lizo, ekstremnimi temperaturami, oksidativni agensi in osmotskim stresom. Melanini so skupina pigmentov z raznoli no molekulsko maso, sestavljeni iz kompleksnih molekul, ki so negativno nabite in hidrofobne. Tudi pri *H. werneckii* je melanin nepogre–ljiv za njeno preflivetje v izjemo slanah

solinskih vodah (Kejflar in sod. 2013). Dobro je poznana pot prenosa signala HOG (high-osmolarity glycerol), ki kot odgovor na povi-ano slanost v okolju, aktivira med drugim gene za encime, ki sodelujejo pri sintezi melanina (Turk in Plemenita-2002, Kejflar in sod. 2015).

V hiperslanih pogojih je transmembranski transport ionov za celice poglobitnega pomena. Analiza prena-alcev kovinskih kationov pri *H. werneckii*, je pokazala, da je ve ina doffivela ve podvojitve genov tekom evolucije. Posledi no se pojavljajo v veliko ve jem -tevilu kot bi pri akovali. Dolo ili so nukleotidno zaporedje celotnega genoma in ugotovili da je pravzaprav pri-lo do evolucijsko nedavne podvojitve celotnega genoma (Lenassi in sod. 2013).

2.4.6 Molekularno genetske metode za prou evanje genetske raznolikosti

Pri taksonomiji so poleg morfolo-kih zna ilnosti, fiziolo-kih in biokemijskih testov za identifikacijo, vedno bolj pomembne tudi molekularno-genetske analize. Za dolo evanje genetske raznolikosti populacij, danes poznamo fe veliko molekularnih metod. Za dolo evanje polimorfizma na ravni genoma se pogosto uporabljajo RFLP ó polimorfizem dolfine restrikijskih fragmentov (Denning in sod 1990), AFLP ó polimorfizem dolfine pomnoflenih fragmentov (Vos in sod. 2000), RAPD ó naklju no pomnoflevanje polimorfne DNA (Williams in sod. 1990), M13 fingerprinting ó metoda prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 (Ryskov in sod. 1988) in druge.

Pri glivah je za -tudij taksonomije in raznolikosti v uporabi ve regij genoma. Najpogosteje se uporablja regija ribosomalnih genov, katere splo-na organizacija je dobro znana. Sestavljena je iz genov za 18S majhno rRNA podenoto (ang. small ribosomal subunit - SSU) in genov za 28S veliko rRNA podenoto (ang. large ribosomal subunit - LSU). Lo ujeta ju dva notranja distan nika ó ITS1 in ITS2 (ang. internal transcribed spacer - ITS), med njima pa je 5,8S konzervativna regija (Abliz in sod 2003). Znotrajvrstne raznolikosti *Hortaea werneckii* so dolo ali na podlagi filogenetske analize ITS1 regije (Zalar in sod 1999), ITS2 regije in regije

5,8S rDNA (de Hoog in sod. 1999), RAPD analizo (Uijthof in sod. 1994) ter RFLP tehnikami mitohondrijske DNA (mtDNA) (de Cock 1994).

Za detekcijo *Hortaea werneckii* v vzorcih celokupne DNA so poznani in natan no dolo eni specifi ni oligonukleotidni za etniki, ki so skonstruirani na podlagi hipervariabilne regije ITS (Abliz in sod 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 REAGENTI, KEMIKALIJE IN DRUGI PRIPOMO KI

3.1.1 Kemikalije

Pri raziskovalnem delu smo uporabili kemikalije, zbrane v preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij

| Kemikalija | Proizvajalec |
|--|---------------------------------|
| Agar agar | Merck, Nem ija |
| Agaroz | BMA, Rockland, ME, ZDA |
| Borova kislina | Sigma Aldrich C., ZDA |
| Bromfenol modro | Sigma Aldrich C., ZDA |
| Celit | Merck, Darmstadt, Nem ija |
| CTAB | Sigma Chemical C., ZDA |
| dNTP | Amersham Biosciences, ZDA |
| <i>Eco</i> RI endonukleza | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| <i>Eco</i> RI linker 1 (5'-CTCgTAgACTCgTACC-3') | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| <i>Eco</i> RI linker 2 (5'-AATTggTACgCAgTCTAC-3') | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| EDTA | Kemika, Hrva-ka |
| Etanol 70 % | Chemo d.d., Slovenija |
| Etanol 96 % | Chemo d.d., Slovenija |
| Etidijev bromid | Sigma Chemical C., ZDA |
| Glicerol | Kemika, Hrva-ka |
| Glukoza | Kemika, Hrva-ka |
| HCl | Kemika, Hrva-ka |
| Kloroform | Kemika, Hrva-ka |
| Lestvica DNA GeneRuler [®] 10bp Plus | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| Lestvica DNA GeneRuler [®] 1kb Plus | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| Ligacijski pufer (10x) | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| Ligacijski pufer (10x) | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| Ligaza T4 (1 U/ l) | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| MgCl ₂ | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| <i>Msp</i> I endonukleaza | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| <i>Msp</i> I linker 1 | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| <i>Msp</i> I linker 2 | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| NaCl | Merck, Nem ija |

Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij

| | |
|--|---------------------------------|
| oligonukleotidni za etnik <i>EcoRI</i> (5'-gACTgCgTACCAATTC-3') | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| oligonukleotidni za etnik <i>EcoRI</i> *-AC (15 ng/ μ l) *-ozna en z CY5 fluorescentnim barvilom | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| oligonukleotidni za etnik <i>MspI</i> | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| oligonukleotidni za etnik <i>MspI</i> -TA (15 ng/ μ l) | Proligo, Sigma Aldrich C.,ZDA |
| PCR pufer | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| Pepton | Difco Lab., ZDA |
| Pufer Y+/Tango (2x) | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| Silikagel | Merck, Nem ija |
| Sladni ekstrakt | Difco Lab., Detroit, Mi., ZDA |
| <i>Taq</i> DNA polimeraza (5U/ μ l) | Fermentas, Life Sciences, Litva |
| TRIS | Sigma Chemical C., ZDA |
| TRIS-HCl | Sigma Chemical C., ZDA |

3.1.2 Laboratorijski pribor

Pri raziskovalnem delu smo uporabili slede laboratorijski pribor:

- Laboratorijska steklovina (erlenmajerice, a-e, menzure, pipete, epruvete, infuzijske stekleni ke, petrijevke)
- Cepilne zanke
- Nastavki za pipete, Eppendorf, Nem ija
- Mikrocentrifugirke (200 μ l, 1500 μ l, 2000 μ l), Eppendorf, Nem ija
- Objektna in krovna stekelca, Tlos, Hrva-ka
- Plasti ne petrijevke
- Polavtomatska pipeta (0.5 ó 10 μ l), Proline Pipette, Finska
- Polavtomatske pipete (2 -20 μ l, 10 ó 100 μ l, 100 ó 1000 μ l), Eppendorf, Nem ija
- Jeklne -ibre premera 5 mm
- Laboratorijske rokavice
- Parafilm® M, Sigma Aldrich C., ZDA

3.1.3 Laboratorijske aparature

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali aparature, zbrane v preglednici 2.

Preglednica 2: Seznam uporabljenih aparaturn

| Aparatura | Proizvajalec |
|--|--|
| Avtoklav A-63C | Kambi , Slovenija |
| Bunsenov gorilnik | TLOS, Hrva-ka |
| Cenfrifuga | Eppendorf, Nem ija |
| Digestorij Variolab Mobilien W90 | Waldner, Nem ija |
| Digitalna kamera DP12 | Olympus, Japonska |
| Digitalni fotoaparata Camedia C-5050 200M | Olympus, Japonska |
| Elektri ni transformator za elektroforezo Consort E143 | Sigma-Aldrich, MO, ZDA |
| Elektroforezna banjica E33 | Hofer, CA, ZDA |
| Homogenizator MM301 | Retsch, Nem ija |
| Inkubator | Kambi , Slovenija |
| Laminarij IBK 1V2 | Iskra, Slovenija |
| Lupa Steri SV11 | Zeiss, Nem ija |
| Magnetno me-alo Rotamix 550MMH | Tehtnica, Slovenija |
| Mikrovalovna pe-ica | Gorenje, Slovenija |
| PCR sistem | Eppendorf, Nem ija |
| pH meter | Metrohm, T ^N vica |
| Sekvenator ALFexpress® | Pharmacia Biotech, T ^N vedska |
| Spektrofotometer UV/VIS | Perkin Elmer, MA, ZDA |
| Tehtnica, Santer SD 1000 T | Tehtnica, Slovenija |
| Termoblok | Syngene G box |
| Transluminator LKB 2001 Macrovue | LKB Bromma, T ^N vedska |
| UVI software | |
| Vodna kopel | Pharmacia Biotech, T ^N vedska |
| Vorteks me-alo | Tehtnica, Slovenija |

3.2 GOJITM A, PUFRI, ZMESI IN GELI

3.2.1 Goji- a

Priprava goji- :

V a-o (1 liter) smo dodali suhe sestavine (razen agarja), magnetno me-alo in ve ino vode. Na magnetnem me-alniku smo raztopino me-ali tako dolgo, dokler se sestavine niso popolnoma raztopile. Po potrebnosti smo umerili pH (NaOH za vi-anje pH, HCl za niflanje), dopolnili vodo do kon nega volumna, dodali agar in segrevali, dokler se tudi agar ni popolnoma raztopil. Goji-a smo prelili v ve je Elenmeyerjeve steklenice (2 litra), jih prekrili z aluminijasto folijo in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Goji-a smo v vodni kopeli ohladili na 55 °C in jih asepti no prelili v plasti ne petrijevke. Strjena goji-a smo shranjevali v hladni sobi pri 4 °C.

Goji- e MEA (trdno goji- e s sladnim ekstraktom ó Malt Extract Agar) (Raper in Thom 1949):

| | |
|------------------------|-------------------|
| Sladni ekstrakt | 20,0 g |
| Glukoza | 20,0 g |
| Pepton | 1,0 g |
| Agar | 20,0 g |
| <u>dH₂O</u> | <u>do 1000 ml</u> |

pH 5,3 ± 0,3

Goji- e MEA + X % NaCl

Osnova goji-a je standardno goji- e iz sladnega ekstrakta (MEA), kateremu smo dodali ustrezne koli ine NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2003):

| | |
|-----------------|---------------------------|
| MEA + 5 % NaCl | í í í í í í .. 50g NaCl/l |
| MEA + 15 % NaCl | í í í í í í 150g NaCl/l |
| MEA + 20 % NaCl | í í í í í í 200g NaCl/l |
| MEA + 25 % NaCl | í í í í í í .250g NaCl/l |

3.2.2 Zmesi

Zmes silikagela in celita (Gerrits van den Ende in de Hoog, 1999)

Silikagel 30 g

Celit 545 15 g

Zmes smo avtoklavirali in shranili v stekleni posodici.

3.2.3 Pufri

Pufer CTAB (Sambrook in sod., 1989)

Tris 2,42 g

NaCl 8,2 g

EDTA 0,74 g

CTAB 2,0 g

Bidestilirana voda (ddH₂O) do 100 ml

pH = 7,5 ± 0,1

Pufer TE (Sambrook in sod., 1989)

Tris 0,12 g

EDTA 0,04 g

dH₂O do 100 ml

pH = 8,0 ± 0,1 (uravnavamo s HCl)

0,5 M EDTA (Sambrook in sod., 1989)

EDTA 186,12 g

dH₂O do 1000 ml

5x Pufer TBE (Sambrook in sod., 1989)

| | |
|------------------------|-------------------|
| Tris | 50,4 g |
| Borova kislina | 27,5 g |
| EDTA (0,5 M) | 20 ml |
| <u>dH₂O</u> | <u>do 1000 ml</u> |

1x pufer TBE za M13

Kot zalofno raztopino smo uporabili 5x pufer TBE in ga red ili z bidestilirano vodo (200 ml TBE(5x) + 800 ml H₂O).

0.5x Pufer TBE za AFLP

Kot zalofno raztopino smo uporabili 5x pufer TBE in ga red ili z bidestilirano vodo (100 ml TBE(5x) + 900 ml H₂O).

5x nana-alni pufer za gelsko elektroforezo (sambrook in sod., 1989)

| | |
|------------------------|-----------------|
| Bromfenol modro | 0.25 g |
| Ksilen cianol | 0.25 g |
| Glicerol | 30 ml |
| <u>dH₂O</u> | <u>do 100ml</u> |

3.2.4 Geli za analizo DNA

1% agarozni gel za elektroforezo (35ml) (Sambrook in sod.,1989)

| | |
|-----------------------|--------------|
| Agarozna | 0,35 g |
| <u>0,5x TBE pufer</u> | <u>35 ml</u> |

Zatehtano agarozo in pufer smo prenesli v 100 ml Erlenmeyerjevo steklenico in jo segrevali v mikrovalovni pe ici dokler se vsa agarosa ni raztopila. Med segrevanjem smo vsebino steklenice ve krat preme-ali in dodajali toliko vode, kot je je izparelo. Ko se je raztopljena agarosa ohladila na približno 40 °C smo ji dodali 7 µl etidijevega bromida s koncentracijo 1 mg/µl, pazljivo preme-ali in vlili v pripravljen model z glavni ki ter po akali da se ohladi in strdi. Nato smo pazljivo odstranili glavni ke.

1,4% agarozni gel za elektroforezo pri metodi prstnega odtisa z za etnikom M13 (160ml)

| | |
|---------------------|---------------|
| Agarosa | 2,24 g |
| <u>1x TBE pufer</u> | <u>160 ml</u> |

Zatehtano agarozo in pufer smo prenesli v 250 ml Erlenmeyerjevo steklenico in jo segrevali v mikrovalovni pe ici dokler se vsa agarosa ni raztopila. Med segrevanjem smo vsebino steklenice ve krat preme-ali in dodajali toliko vode kot je je izparelo. Ko se je raztopljena agarosa ohladila na približno 40 °C smo jo vlili v pripravljen model z glavni ki ter po akali da se ohladi in strdi. Nato smo pazljivo odstranili glavni ke.

Gel za AFLP

Pri metodi AFLP smo uporabili komercialni poliakrilamidni gel ReproGel[®] (Amersham Biosciences). Prilofeni raztopini smo zme-ali po navodilih proizvajalca, zlili gel med stekleni plo- i z glavni kom in ga za 10 minut izpostavili UV flarkom, da je polimeriziral. Nato smo odstranili glavni ke in plo- i z gelom vstavili v sistem ALFexpress[®] ter v banjice dolili 0,5x TBE pufer do oznak.

3.3 UPORABLJENI SEVI

Pri analizah smo uporabili seve navedene v preglednici 3. Seve smo pridobili iz zbirke Ex, ki deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo BF UL (oznaka glivnih sevov EXF), iz Mikrobiolo-ke zbirke Kemijskega in-tituta (oznaka sevov MZKI) in iz zbirke CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Nizozemska; oznaka sevov CBS). Vklju ili smo tudi dva seva, HWEVOL1C in HWEVOL40, ki sta bila dalj asa inkubirana v teko em goji- u na stresalniku, pri visoki koncentraciji NaCl ó izvorno EXF-225.

Preglednica 3: Seznam uporabljenih sevov.

| Oznaka seva | | | Geografsko poreklo | Substrat |
|-------------|--------|---------|---------------------|------------------|
| CBS | MZKI | EXF | | |
| | B-1026 | EXF-9 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-1016 | EXF-12 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-1021 | EXF-15 | Španija, Ebre Delta | soline |
| | B-1019 | EXF-16 | Španija, Ebre Delta | soline |
| | B-1027 | EXF-18 | Španija, Ebre Delta | soline |
| | B-1015 | EXF-19 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-1017 | EXF-20 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-1025 | EXF-29 | Španija, Ebre Delta | soline |
| | B-808 | EXF-34 | Slovenija, Sečovlje | soline |
| | B-1023 | EXF-96 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-1010 | EXF-100 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-1014 | EXF-108 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-745 | EXF-112 | Slovenija | soline |
| | B-1011 | EXF-120 | Španija, Santa Pola | soline |
| CBS 107.67 | B-800 | EXF-151 | Portugalska | človek |
| | B-806 | EXF-154 | Slovenija, Sečovlje | soline |
| CBS 359.66 | B-801 | EXF-155 | Surinam | človek |
| CBS 115.90 | B-796 | EXF-157 | Brazilija | ledvica krastače |
| CBS 100496 | B-955 | EXF-166 | Grčija, Delos | marmorni kip |
| CBS 111.31 | B-799 | EXF-171 | Brazilija | človek |
| CBS 705.76 | B-794 | EXF-177 | Francija | človek |
| CBS 100457 | B-736 | EXF-225 | Slovenija, Sečovlje | soline |
| | | | | Se nadaljuje. |

| Nadaljevanje - Preglednica 3: Seznam uporabljenih sevov | | | | |
|---|--------|-----------|---------------------------|-----------------|
| | B-1009 | EXF-239 | Španija, Santa Pola | soline |
| | B-739 | EXF-241 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-737 | EXF-247 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-504 | EXF-562 | Namibija, Atlantski ocean | morska voda |
| | B-2513 | EXF-2514 | Portoriko | soline |
| | B-2514 | EXF-2515 | Portoriko | soline |
| | B-2516 | EXF-2516 | Portoriko | soline |
| | B-2579 | EXF-2579 | Portoriko | soline |
| | | EXF-2682 | Italija | človek |
| CBS 117.90 | | EXF-2683 | Brazilija | slana riba |
| CBS 100456 | | EXF-2684 | Slovenija | soline |
| CBS 100455 | | EXF-2685 | Slovenija | soline |
| CBS 373.92 | | EXF-2686 | Španija | plaža |
| CBS 410.51 | | EXF-2687 | Japonska | zrak |
| CBS 255.96 | | EXF-2688 | Španija – Kanarski otoki | rastlina – list |
| CBS 706.76 | B-795 | EXF-2689 | Senegal | rastlina – list |
| CBS 707.76 | | EXF-2690 | Šrilanka | sajasta plesen |
| | B-811 | EXF-2782 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-819 | EXF-2783 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-904 | EXF-2784 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-910 | EXF-2785 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-915 | EXF-2786 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-968 | EXF-2787 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | B-977 | EXF-2788 | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | | HWEVOL1C* | Slovenija, Sečovelje | soline |
| | | HWEVOL40* | Slovenija, Sečovelje | soline |

*- Izvorno EXF-225

3.4 METODE

Ko smo pridobili vse seve, smo jih v rti nacepili na petrijevke z goji- em MEA in jih inkubirali 14 dni pri sobni temperaturi (~25 °C). Kolonije zrastle na tem goji- u smo uporabili kot izvirne za nacepljanje goji- za nadaljnje morfolo-ke analize in molekularno genetske analize.

3.4.1 Molekularno genetske analize

Za molekularno genetske analize vseh sevov smo po predhodni izolaciji DNA uporabili metodo AFLP (polimorfizem dolfine pomnoženih delov). Z izbranimi sevi smo izvedli tudi metodo prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 (v nadaljevanju: M13 fingerprinting).

3.4.1.1 Izolacija genomske DNA

Genomsko DNA smo izolirali po nekoliko spremenjenem klasi nem protokolu za izolacijo glivne DNA (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). V mikrocentrifugirke z oglatim dnom (2 ml) smo dodali jekleno kroglico (\varnothing 5 mm) in zmes silikagela in celita (\sim 0,5 g) ter jih avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. V tako pripravljeno mikrocentrifugirko smo odpipetirali 300 μ l CTAB pufra. S sterilno spatulo smo v pufer prenesli približno 2cm² dva tedna starega micelija, vzgojenega na agarnem goji- u MEA. Micelij smo homogenizirali s homogenizatorjem, in sicer 1 minuto pri frekvenci 30 tresljajev na minuto. Dodali smo dodatnih 200 μ l CTAB pufra in za 2 sekundi pretresli z vorteks me-alom, nato pa homogeniziran micelij inkubirali 2 uri v vodni kopeli pri temperaturi 65 °C. Po inkubaciji smo v digestoriju v mikrocentrifugirko dodali 500 μ l kloroforma, za 2 sekundi pretresli na vorteks me-alu in me-anico centrifugirali 5 minut pri 14000 obr/min. Zgomjo ó vodno fazo smo odpipetirali v sterilno mikrocentrifugirko, ponovno dodali 500 μ l kloroforma, preme-ali na vorteksu in centrifugirali 5 minut pri 14000 obr/min. Postopek smo ponovili ó odpipetirali vodno fazo, dodali 500 μ l kloroforma, preme-ali in centrifugirali 5 minut pri 14000 obr/min ter ponovno previdno odpipetirali zgornjo ó vodno fazo v sterilno mikrocentrifugirko. Nato smo vodni fazi dodali dvakratni volumen 96% etanola ohlajenega na -20 °C, pazljivo ro no preme-ali, zmes vodne faze in etanola pa inkubirali ez no na -20 °C. Po inkubaciji smo zmes centrifugirali 5 minut pri 14000 obr/min in pazljivo odpipetirali supernatant. Usedlino smo sprali s 500 μ l 70% etanolom, centrifugirali 5 minut pri 14000 obr/min in pazljivo odpipetirali etanol. Pelet (sedaj

DNA) smo osu-ili na zraku do suhega (~30 min), resuspendirali v 97,5 µl TE pufra, dodali 2,5 µl RNAze in inkubirali 30 minut v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C. Vzorce DNA smo shranjevali na -20 °C.

3.4.1.2 Agarozna gelska elektroforeza

Uspe-nost izolacije DNA in uspe-nosti reakcij s polimerazo smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo.

Po receptu smo pripravili 1% agarozni gel (3.2.4). Gel smo z nosilcem vred odstranili iz modela ter ga prestavili v banjico za elektroforezo. Banjico smo napolnili z 0,5x pufrom TBE, tako da je bil gel popolnoma prekrit (Sambrook in sod.,1989).

Na traku parafilma smo si pripravili vzorce, ki smo jim dodali nana-alni pufer (kon en volumen 7 µl) in jih s pipeto prenesli v luknjice na gelu. V prvo luknjico na gelu smo nanegli standardno lestvico (GeneRuler[®] 100 bp Plus), v drugo luknjico negativno kontrolo, ki je namesto vzorca vsebovala destilirano vodo, v naslednje pa vzorce. Elektroforeza je potekala pod napetostjo 90V približno 30 minut. Po kon ani elektroforezi smo gel vzeli iz banjice, odstranili iz nosilca ter gel fotografirali na transiluminatorju, nato fotografijo obdelali z ra unalni-kim programom UVI.

3.4.1.3 Metoda prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 (M13 fingerprinting)

Z izolirano DNA izbranih sevov smo opravili metodo prstnega odtisa z za etnikom M13. Po spodnjem protokolu smo pripravili me-anico za verifno reakcijo s polimerazo (prilagojeno po Sonjak in sod.,2007). Vklju ili smo negativno kontrolo ó namesto DNA smo dodali enako koli ino destilirane vode.

Priprava 25 μ l me-anice za (PCR) (koli ine za 1 vzorec)

| | |
|---|-----------------------------|
| PCR pufer (10x) | 2,5 μ l |
| MgCl ₂ (25mM) | 1,5 μ l |
| dNTP (10mM) | 0,5 μ l |
| M13 primer (20 μ M) | 1,0 μ l |
| <i>Taq</i> DNA polimeraza (5U/ μ l) | 0,2 μ l |
| ddH ₂ O | 18,8 μ l |
| DNA | 0,5 μ l |
| | <u>25 μl</u> |

Verifno reakcijo s polimerazo smo opravili s ciklinim sistemom Eppendorf po slede em programu:

| <u>Temperatura</u> | <u>Trajanje</u> | <u>Število ciklov</u> |
|--------------------|-----------------|-----------------------|
| 95 °C | 5 min. | |
| 93 °C | 45 sek. | } 40 |
| 50 °C | 60 sek. | |
| 72 °C | 60 sek. | |
| 72 °C | 6 min | |
| 4 °C | Ô | |

Sledilo je preverjanje prisotnosti fragmentov z gelsko elektroforezo na 1 % agaroznem gelu v 0,5x TBE pufru z negativno kontrolo (destilirano vodo) (3.4.1.2).

S podalj-ano gelsko elektroforezo smo nato lo ili pomnoffene fragmente. Pripravili smo 1,4 % gel z agarozo v 1x TBE pufru. (3.2.4). 25 μ l PCR produkta smo dodali 5 μ l nana-alnega pufra z barvilom. Vklju ili smo tudi 2 μ l 1 kb lestvice Gene ruller. Vzorce z barvilom smo nanegli v luknjice na gelu. Dodali smo -e negativno kontrolo ó destilirano vodo z dodanim barvilom. Elektroforeza je tekla 3 ure in 30 minut na napetosti 90 V. Po kon ani elektroforezi smo gel

obarvali. V banjico smo nalili 250 ml 1x TBE pufra, ki smo mu dodali 15 µl etidijvega bromida. Gel smo barvali 20 minut, nato smo pufer odlili in gel namakali –e 20 minut v destilirani vodi. Gel smo nato fotografirali na transluminatorju in obdelali z računalniškim programom UVI.

3.4.1.4 Polimorfizem dolfine pomnoženih delov (AFLP)

S pridobljenimi vzorci DNA vseh sevov smo izvedli AFLP analizo.

Preverjali smo tudi ponovljivost metode, tako da smo DNA dolo enih sevov neodvisno izolirali dvakrat in jih obravnavali kot različne vzorce.

Polimorfizem dolfine pomnoženih delov je genotipizacijska metoda, ki sestoji iz več korakov:

1. Restrikcija genomske DNA

Z merjenjem absorbance pri 260 nm in 280 nm v stekleni kiveti, na spektrofotometru, smo dolo ali istost in izračunali koncentracijo izolirane kromosomske DNA. Z redčenjem z destilirano vodo smo pripravili 7,5 µl raztopine, ki je vsebovala 250 ng DNA. Restriksijsko mešanico smo pripravili po sledenem protokolu (prilagojeno po Sonjak in sod., 2007).

Priprava 20 µl restriksijske mešanice (količine za 1 vzorec):

| | |
|------------------------|--------------|
| Pufer Y+/Tango 2x | 4 µl |
| <i>Eco</i> RI (10U/ l) | 0,125 l |
| <i>Msp</i> I (10U/ l) | 0,125 l |
| ddH ₂ O | 8,25 l |
| <u>DNA</u> | <u>7,5 l</u> |
| | <u>20 l</u> |

Da smo prepre ili nezafeljeno delovanje encimov, smo restrikcijsko me-a-nico pripravljali na ledu. V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpepitirali N+1 kratno koli ino reagentov (N--tevilu vzorcev, 1-rezerva), po slede em vrstnem redu: bidestelirana voda in pufer, raztopino smo dobro preme-ali ter dodali restrikcijske encime in rahlo preme-ali. V mikrocentrifugirke (200 l) smo v vsako odpepitirali 7,5 l vzorca DNA in 12,5 l restrikcijske me-a-nice.

Vzorci z restrikcijsko me-a-nico smo inkubirali 3 ure na vodni kopeli pri 37 °C. Po inkubaciji smo za nekaj sekund vzorce prestavili v centrifugo, da smo sprali morebitne sestavine s stene mikrocentrifugirke na dno. Sledila je inaktivacija restrikcijskih endonukleaz v vodni kopeli za 20 minut pri 65 °C.

2. Priprava adapterjev

Od proizvajalca podane koncentracije zalofnih sestavin smo razred ili do feljenih koncentracij. Me-a-nici adapterjev *EcoRI* in *MspI* smo pripravili lo eno po slede em protokolu (prilagojeno po Sonjak in sod.,2007):

| <u>Priprava 40 l adapterja <i>EcoRI</i> (5 pmol/ l)</u> | |
|---|----------------|
| <i>EcoRI</i> linker 1 (1 g/ l) | 0,58 l |
| <i>EcoRI</i> linker 2 (1 g/ l) | 0,54 l |
| TrisHCl (1M, pH=7,7) | 10 l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>28,88 l</u> |
| | <u>40 l</u> |

| <u>Priprava 40 l adapterja <i>MspI</i> (50 pmol/ l)</u> | |
|---|----------------|
| <i>MspI</i> linker 1 (1 g/ l) | 6,49 l |
| <i>MspI</i> linker 2 (1 g/ l) | 6,45 l |
| TrisHCl (1M, pH=7,7) | 10 l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>17,06 l</u> |
| | <u>40 l</u> |

Mikrocentrifugirki z me-anicama adapterjev smo dali v segret termoblok (98 °C), ga izklju ili, nato po akali (vsaj 30 minut), da je temperatura padla na 25 °C. S tem smo zagotovili denaturacijo in nato postopno prileganje enoverifnih linkerjev v dvoverifne adapterje.

3. Ligacija adapterjev

Ligacija je potekala po slede em protokolu (prilagojeno po Sonjak in sod.,2007):

Priprava 25 l ligacijske me-anice (koli ine za 1 vzorec)

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Adapter <i>EcoRI</i> | 0,5 l |
| Adapter <i>MspI</i> | 0,5 l |
| Ligacijski pufer (10x) | 0,5 l |
| Ligaza T4 (1 U/ l) | 0,1 l |
| ddH ₂ O | 3,4 l |
| <u>Restriksijski vzorec</u> | <u>20 l</u> |
| | <u>25 l</u> |

Ligacijsko me-anico smo pripravljali na ledu. V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpepitirali N+1 kratno koli ino reagentov (N-tevilo vzorcev, 1-rezerva), po slede em vrstnem redu: bidestelirana voda, ligacijski pufer in oba adapterja, raztopino smo dobro preme-ali, dodali ligazo in rahlo preme-ali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo v vsako odpepitirali 20 µl restriksijskega vzorca in 5 µl ligacijske me-anice.

Vzorci z ligacijsko me-anico smo inkubirali 3 ure v vodni kopeli pri 37 °C. Po inkubaciji smo za nekaj sekund vzorce prestavili v centrifugo, da smo sprali morebitne sestavine s stene mikrocentrifugirke na dno. Sledila je inaktivacija ligaze v vodni kopeli za 10 minut pri 65 °C.

4. Predhodno pomnoflevanje

Predhodno pomnofevanje je potekalo po slede em protokolu (prilagojeno po Sonjak in sod., 2007):

Priprava 25 μ l me-anice za PCR (koli ine za 1 vzorec)

| | |
|--|------------------------------|
| PCR pufer (10x) | 2,5 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1,5 μ l |
| dNTP (10 mM) | 0,5 μ l |
| oligonukleotidni za etnik <i>Eco</i> RI (75 ng/ μ l) | 0,5 μ l |
| oligonukleotidni za etnik <i>Msp</i> I (75 ng/ μ l) | 0,5 μ l |
| <i>Taq</i> DNA polimeraza (5U/ μ l) | 0,125 μ l |
| ddH ₂ O | 16,875 μ l |
| <u>restrikijsko-ligacijski vzorec</u> | <u>2,5 μl</u> |
| | <u>25 μl</u> |

Me-anico za PCR smo pripravljali na ledu. V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpepitirali N+1 kratno koli ino reagentov (N--tevilu vzorcev, 1-rezerva), po slede em vrstnem redu: bidestelirana voda, pufer, MgCl₂, dNTP in oba oligonukleotidna za etnika, raztopino smo dobro preme-ali, dodali polimerazo in rahlo preme-ali. V mikrocentrifugirke (200 μ l) smo v vsako odpepitirali 2,5 μ l restrikijsko-ligacijskega vzorca in dodali 22,5 μ l me-anice za predhodno pomnofevanje.

Predpomnofevanje je potekalo s cikl inim sistemom Eppendorf po slede em programu.

| <u>Temperatura</u> | <u>Trajanje</u> | <u>Tevilu ciklov</u> |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| 94 °C | 30 sek. | |
| 56 °C | 60 sek. | 20 |
| 72 °C | 60 sek. | |

Uspešnost reakcije s polimerazo smo preverili z elektroforezo na 1% agaroznem gelu z etidijevim bromidom.(3.4.1.2)

5. Pomnoževanje

Pomnoževanje je potekalo po slede em protokolu (prilagojeno po Sonjak in sod., 2007):

Priprava 10 µl me-anice za PCR (koli ine za 1 vzorec)

| | |
|--|--------------|
| PCR pufer (10x) | 1 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0,6 µl |
| dNTP (10 mM) | 0,2 µl |
| oligonukleotidni za etnik <i>EcoRI</i> *-AC (15 ng/µl) | 1 µl |
| oligonukleotidni za etnik <i>MspI</i> -TA (15 ng/µl) | 1 µl |
| <i>Taq</i> DNA polimeraza (5U/µl) | 0,06 µl |
| ddH ₂ O | 4,14 µl |
| <u>Preamplifikacijski vzorec</u> | <u>2 µl</u> |
| | <u>10 µl</u> |

Uporabili smo oligonukleotidna za etnika z dodanima dvema selektivnima nukleotidoma, isicer *MspI*-TA in *EcoRI*-AC. Slednji je bil ozna en z fluorescentnim barvilom Cy5 (*).

Me-anico za PCR smo pripravljali na ledu. V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpepitirali N+1 kratno koli ino reagentov (N-tevilo vzorcev, 1-rezerva), po slede em vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer, MgCl₂, dNTP in oba oligonukleotidna za etnika, raztopino smo dobro preme-ali, dodali polimerazo in rahlo preme-ali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo v vsako odpepitirali 2 µl preamplifikacijskega vzorca vzorca in dodali 8 µl me-anice za pomnoževanje.

Predpomnoševanje je potekalo s cikličnim sistemom Eppendorf po sledem programu.

| <u>Temperatura</u> | <u>Trajanje</u> | <u>Število ciklov</u> |
|--------------------------|-----------------|-----------------------|
| 94 °C | 30 sek. | |
| 65 °C (-0.7 °C na cikel) | 30 sek. | 13 |
| 72 °C | 60 sek. | |
| 94 °C | 30 sek. | |
| 56 °C | 30 sek. | 23 |
| 72 °C | 60 sek. | |
| 4 °C | ô | |

6. Priprava vzorcev in poliakrilamidna elektroforeza

Po konanem pomnoševanju smo vzorcem dodali ekvivalenten volumen nana-alnega barvila za AFLP (10 µl), ki je vsebovalo 99,8% formamida in 0,2% barvila dekstran modro. Vzorce smo denaturirali pri 94 °C 5 minut in jih prenesli na led. Enako smo naredili z lestvico.

10 µl vzorcev smo s pipeto nanesli v luknjice poliakrilamidnega gela (3.2.4 Gel za aflp), ki smo jih pred tem temeljito sprali s pufrom. Namesto vzorca smo v dve luknjici na gelu (približno tretjino razdalje na gelu od vsake strani) nanesli 5 µl lestvice.

Sledila je elektroforeza na sekvenatorju ALFexpress®, pod naslednjimi pogoji:

- Elektri na napetost 1500 V
- Elektri ni tok 60 mA
- Elektri na mo 15 W
- Temperatura 55 °C
- Trajanje elektroforeze 450 min.
- Interval vzor enja 1 sek.

7. Analiza gela

Gel smo analizirali z računalniškim programom Fragment Analyzer ter računski elektroferogram smo pretvorili v matriko, kjer kolona predstavlja sev, vrstica pa vrh na elektroferogramu pri določeni dolžini fragmenta. Če je bil vrh prisoten pri določeni sevu, smo to označili z 1, če je bil odsoten pa z 0. Iz podatkov urejenih v matriko, smo s programom FreeTree (Pavliček in sod., 1999) izračunali podobnost ugotovljenih profilov Jaccard-ovega koeficienta. Za ugotavljanje podobnosti elektroforetskih profilov smo uporabili metodo parnih skupin z aritmetično sredino ó UPGMA (»Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean«). Kladograme smo oblikovali in uredili s programom TreeView (Page 2000).

3.4.2 Morfološke analize

Vse seve smo po dveh tednih rasti na agarju s sladnim ekstraktom (MEA), tri-tovkovno precepili na nove ploščice za gojenje na MEA z dodano soljo (NaCl), in sicer na pet različnih koncentracij (brez NaCl, 5% NaCl, 15% NaCl, 20% NaCl in 25% NaCl). Ploščice smo inkubirali pri sobni temperaturi (~25 °C). Tedensko smo spremljali morfološke makroskopske karakteristike kolonij. Po treh tednih smo na izbranih sevih z diferencialno interferenčno kontrastno mikroskopijo opazovali tudi morfološke karakteristike mikroskopskih struktur pri različnih koncentracijah NaCl.

3.4.2.1 Makromorfološki opis

Vse seve smo inkubirali tri tedne na gojenju na MEA z različnimi koncentracijami NaCl. Enkrat tedensko smo zapisali spremembe. Opazovali smo premer, barvo in strukturo kolonij.

3.4.2.2 Mikromorfolo-ki opis

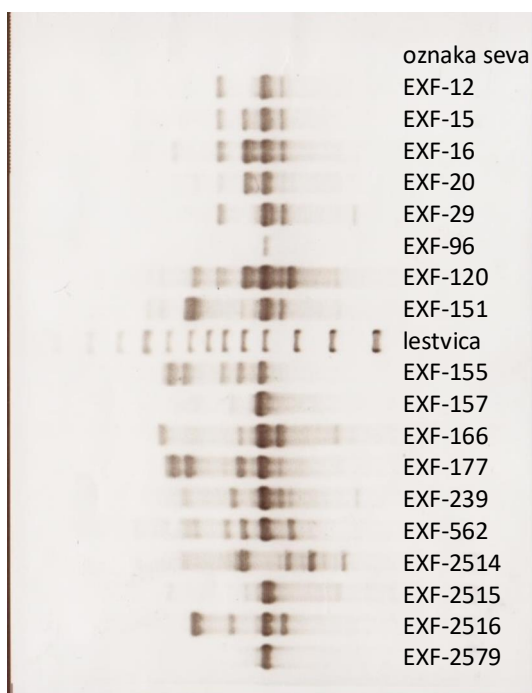
Po treh tednih inkubacije smo iz centra in roba kolonij pripravili mikroskopske preparate v 60 % mle ni kislini. Preparate smo mikroskopirali in fotografirali z mikroskopom Olympus BX 51 in kamero Olympus DP15. Z mikroskopijo z diferencialnim interferen nim kontrastom smo opazovali prisotnost, obliko, dolfino in -irino konidijev, hif in meristematskih skupkov, melanizacijo in tvorbo konidijev ter brstenje kvasnih celic.

4 REZULTATI

4.1 MOLEKULARNO GENETSKE ANALIZE

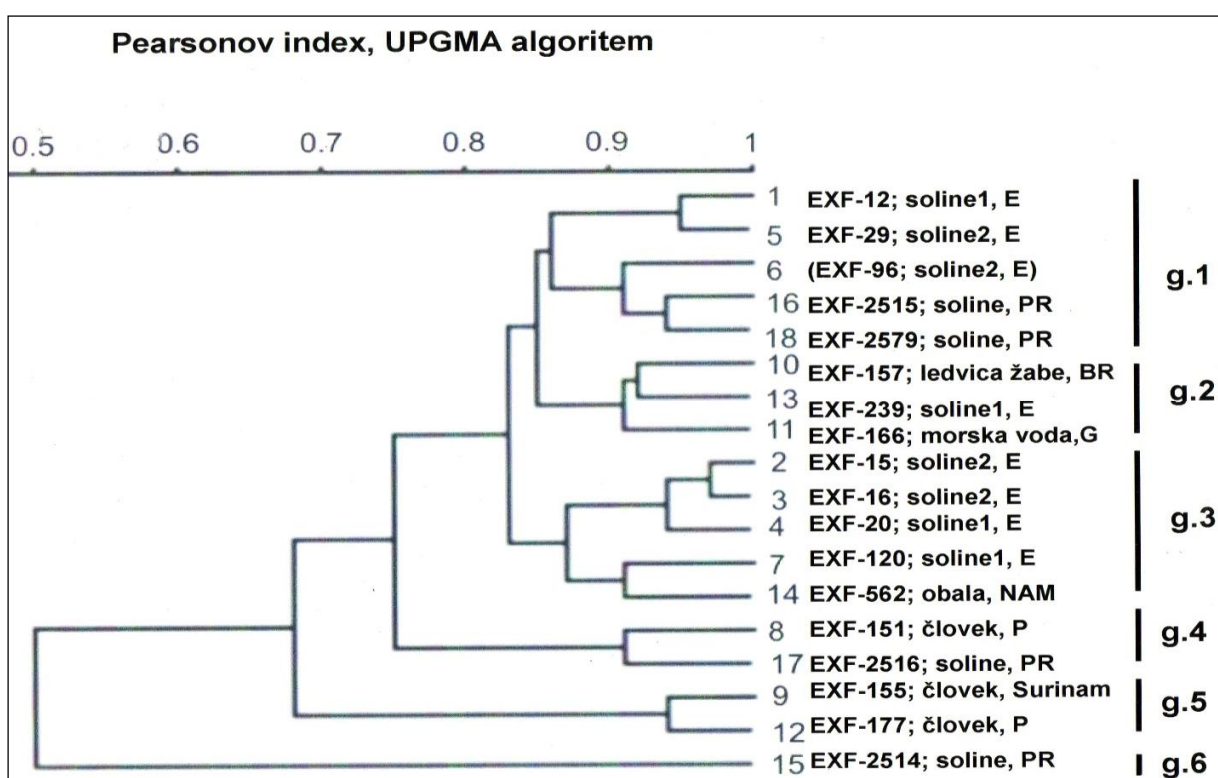
4.1.1 Metoda prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13

Z verflino reakcijo s polimerazo (PCR) smo DNA vzorce 18-ih sevov pomnofili z oligonukleotidnim za etnikom faga M13. Pridobljene pomnofke smo lo ili na dalj-i elektroforezi. Po elektroforezi, so bili na gelu po barvanju in fotografiranju s transluminatorjem vidni pomnofeni fragmenti prikazani na Slika 2. Opazili smo 12 polimorfnih znakov. Pri posameznem vzorcu se je pomnofilo 1 ó 7 fragmentov.



Slika 2: Fotografija gela pomnofenih fragmentov lo enih z elektroforezo pri metodi prstnega odtisa z za etnikom M13

Gel smo ra unalni-ko analizirali in izrisali dendrogram podobnosti (Slika 3). Sevi so se združili v šest skupin (na sliki ozna čene kot g.x, kot grupa in -tevilka). Sevi izolirani s loveka in sev iz ledvic flabe so se grupirali v tri skupine, skupaj z nekaterimi solinskimi sevi. V prvi skupini so le solinski sevi, prav tako so se v tretjo skupino združili sevi iz solin in sev izoliran z obale v Gr iji. Le peta skupina (g. 5) vsebuje seva izolirana s loveka.



Slika 3: Dendrogram podobnosti pridobljen po metodi prstnih odtisov za etnika M13

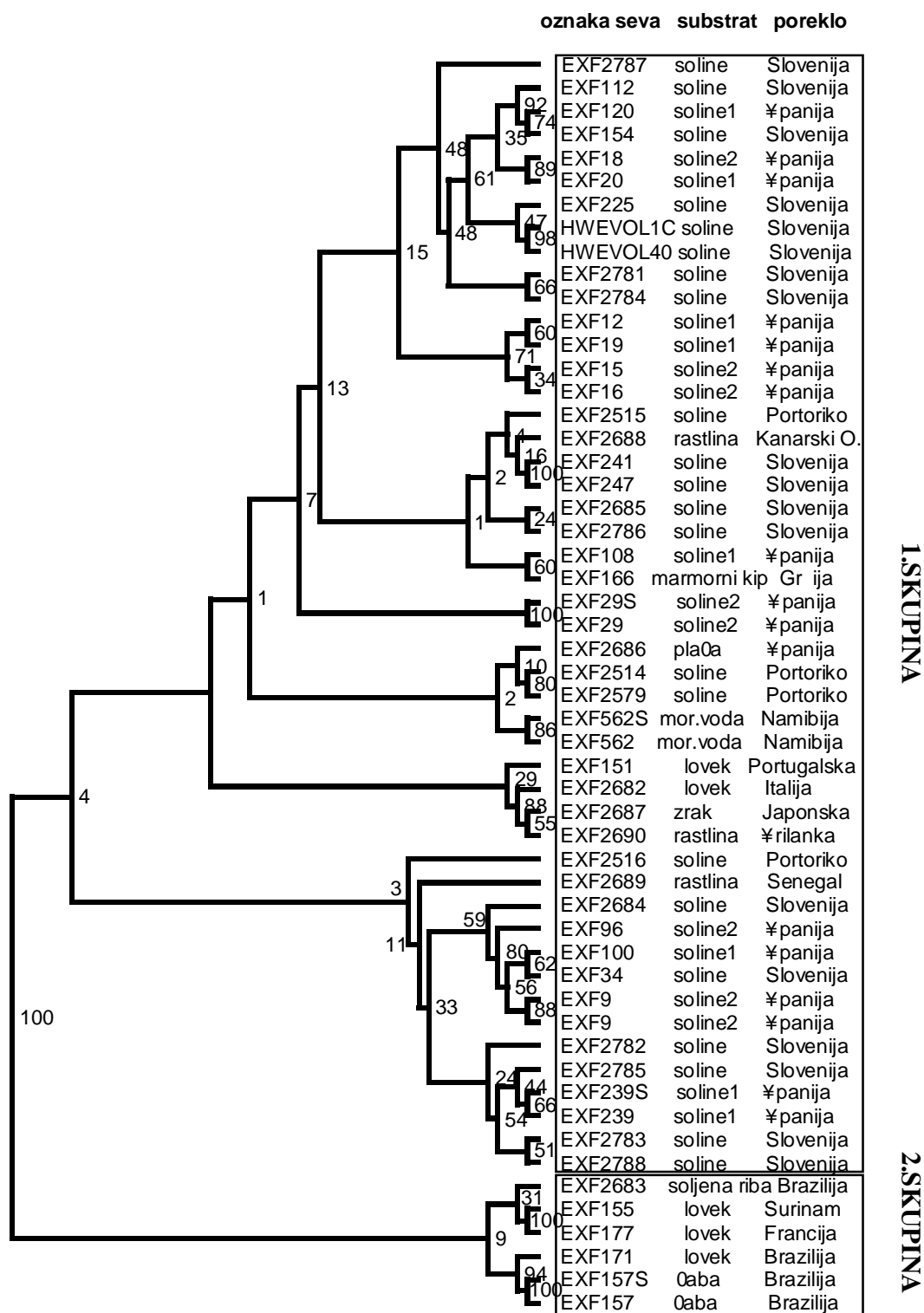
4.1.2 Polimorfizem dolfine pomnoženih delov (AFLP)

Pri analizi elektroferograma smo upo-čevali pomnožene lise v razponu velikosti od 50 do 710 baznih parov. Pridobljeni AFLP profili so vsebovali 120 polimorfni lis. Posamezen vzorec je vseboval od 12 do 31 lis, povpre no 21 lis. Z metodo vezanja - ocenjevanje kvalitete

filogenetskih dreves (bootstrapping) s 1000 ponovitvami smo ocenili ponovljivost posamezne veje na filogenetskem drevesu.

Na pridobljenem filogenetskem drevesu (Slika 4) opazimo med sabo jasno lo eni dve skupini. Znotraj prve velike skupine bi lahko med seboj lo ili ve podskupin, vendar zaradi nizke vrednosti ponovljivosti vej, po metodi vezanja (<15 %), podskupine niso lo ene z zadostno podporo. Izjema je veja z dokaj mo no ponovljivostjo (48 %), ki vsebuje izklju no solinske seve - devet iz Slovenije in tri iz Tpanije. Druga skupina vsebuje izklju no nesolinske seve - tri seve izolirane s loveka (Brazilija, Francija, Surinam), sev izoliran iz ledvic krasta e (Brazilija) in sev izoliran iz soljene ribe (Brazilija). Vse ostale seve najdemo znotraj prve velike skupine. Ti vklju ujejo seve izolirane s loveka, solinske seve iz Slovenije, Tpanije in Portorika, seve izolirane iz morske vode in seve izolirane z drugih povr-in, z razli nim geografskim poreklom. Seva HWEVOL1C in HWEVOL40 sta se zdrufila skupaj z izvornim sevom EXF-225.

Preverili smo tudi ponovljivost metode. Vzorce izolirane DNA petih sevov (EXF-9, EXF-166, EXF-247, EXF-2514, HWEVOL1C) smo pripravili in dodali na gel v dveh ponovitvah. Vzorca istega seva so dali identni AFLP profil z visoko podporo (> 88%). Vzorcev z identnimi profili s 100% ponovljivostjo, zaradi preglednosti nismo dvakrat vklju ili na dendrogram. DNA -tirih sevov (EXF-157, EXF-239, EXF-562, EXF-29) smo neodvisno izolirali dvakrat in tako preverili ponovljivost in ob utljivost metode AFLP na na in izolacije DNA. Tudi v tem primeru so se AFLP profili posameznih sevov na dendrogramu zdrufile z mo no ponovljivostjo.



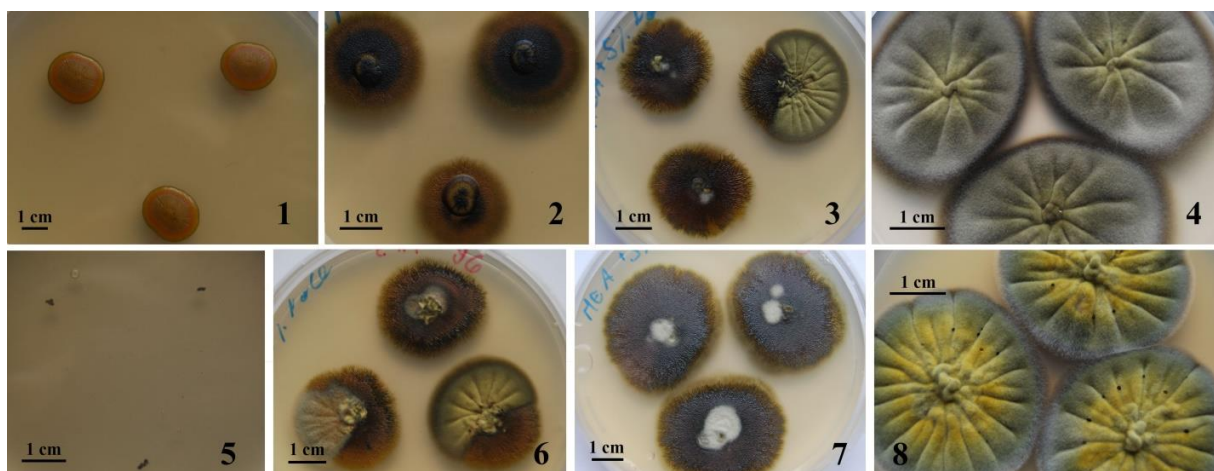
Slika 4: Dendrogram izrisan na podlagi matrike podobnosti profilov AFLP.

4.2 MORFOLOŽKE ANALIZE

4.2.1 Makromorfolo-ki opis

Vse seve smo inkubirali tri tedne na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl, pri sobni temperaturi (~25 °C). Enkrat tedensko smo zapisali spremembe. Opazovali smo premer, barvo in strukturo kolonij.

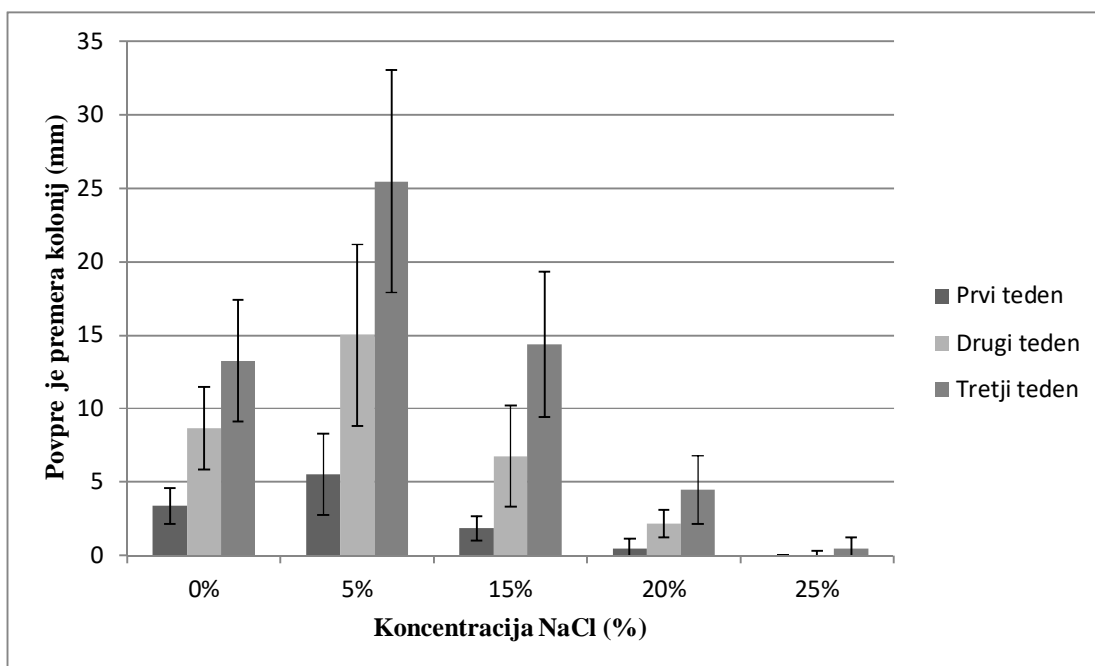
Morfologija kolonij se je tekom inkubacije spreminjala. Oblika rasti je bila odvisna tudi od koncentracije NaCl v goji- u. Na goji- u brez NaCl in na goji- u s 5 % NaCl je prvi teden rasti, skoraj izklju no prevladovala kvasna oblika. Kolonije so bile sprva rumene do temno oranfne barve, drugi teden so postajale temnej-e, do tretjega tedna pa je ve ina sevov fle imela kolonije rne barve. Le redke so ostale tudi tretji teden inkubacije rumene do oranfne barve (Slika 5 - 1). Tudi pri vi-jih koncentracijah NaCl v goji- u smo sprva opazili kvasno obliko rasti, ki pa je bila fle prvi teden melanizirana. Kasneje se je pojavila filamentozna oblika rasti ó hife so izra- ale v globino goji- a, imele pa -e vedno mazav, svetle videz, saj so lateralno brstele, zaradi esar so kolonije izgledale kvasno. Ponekod je bil jasno viden prehod iz kvasne v filamentozno rast (Slika 5 - 2). Pri nekaterih sevih so se pojavljale zra ne hife hidrofobe hife, ki so izra- ale nad povr-ino goji- a in dajale koloniji izredno filamentozen videz. Zra ni micelij je bil prisoten pogosteje, e je bil as inkubacije dalj-i in koncentracija NaCl v goji- u vi-ja. Nekatero kolonije so bile popolnoma prekrite z zra nim micelijem (Slika 5 - 4), lahko pa je nastopil v obliki filamentoznih sektorjev (Slika 5 - 3). Na goji- ih brez NaCl, s 5 % NaCl in 15 % NaCl, so brez izjeme rastli vsi sevi. Na goji- u z 20 % NaCl so po treh tednih inkubacije rastli vsi sevi, razen EXF-2687, ki je bil izoliran iz zraka na Japonskem. Na goji- ih s 25 % NaCl je bila rast slaba, kolonije so bile po treh tednih inkubacije komaj opazne, ve inoma velike 1 milimeter ali manj (Slika 5 - 5).



Slika 5: Razli ni tipi kolonij *H. werneckii* na goji- u MEA.

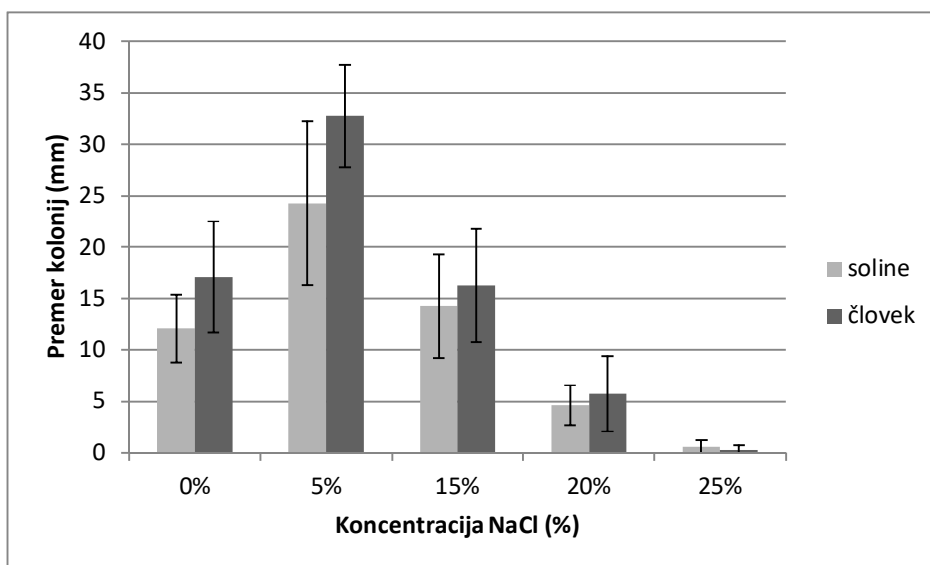
Legenda: **1:** EXF-112 na MEA ó rumena kavsa oblika; **2:** EXF-241 na MEA + 5 % NaCl ó rna kvasna oblika s prehodom v filamentozno obliko; **3:** EXF-2785 na MEA + 5 % NaCl ó filamentozna oblika s sektorji zrna micelija, premer kolonij: 3 cm; **4:** EXF-171 na MEA + 5 % NaCl ó filamentozna oblika, zrna micelij; **5:** EXF-100 na MEA + 25 % NaCl ó komaj opazna rast na goji- u z visoko konc. NaCl; **6:** EXF-96 na MEA + 5 % NaCl ó ve različni obliki rasti na isti plo- i; **7:** EXF-100 na MEA + 5 % NaCl ó zrna micelij izra- a iz kvasno-filamentozne sredine kolonije; **8:** EXF-171 na MEA ó intenzivna filamentozna oblika rasti, na kolonijah vidne kapljice eksudata.

Velikosti kolonij na goji- u MEA z različnimi koncentracijami NaCl po enem, dveh in treh tednih inkubacije so prikazani v prilogi A. Izračunali smo povprečne vrednosti velikosti kolonij, po treh tednih inkubacije (Slika 6). Sevi so najhitreje in najbolj rastle na goji- u z dodanim 5 % NaCl. Čeprav počasneje, so sevi uspevali tudi na goji- u s višjo koncentracijo NaCl. Rast na goji- u z 25 % NaCl, je bila po treh tednih slaba in komaj opazna, vendar prisotna pri nekaterih sevih. Vsi sevi so uspevali tudi na goji- u brez dodanega NaCl, čeprav slabše kot na goji- u s 5 % NaCl.



Slika 6: Povpre ja premerov kolonij (s standardnimi odkloni) vseh sevov na goji- u MEA z dodanim NaCl.

Primerjali smo premere kolonij solinskih sevov in sevov izoliranih s loveka, po treh tednih inkubacije (Slika 7). Na vseh goji- ih so bile kolonije sevov izoliranih s loveka v povpre ju ve je. Razlika je bila bolj o itna na goji- ih brez NaCl in na goji- ih s 5 % NaCl.



Slika 7: Povpre ja premerov kolonij (s standardnim odklonom) solinskih sevov in sevov izoliranih s loveka po treh tednih inkubacije na goji- u MEA z dodanim NaCl.

4.2.2 Mikromofolo-ki opis

Lastnosti celic izbranih sevov, pridobljene z mikroskopijo z diferencialnim interferen nim kontrastom smo zdrufili v preglednico (Preglednica 4). Izmerili smo pet do deset struktur in velikost podali kot povpre no vrednost. Zapisali smo prisotnost in velikost meristematskih skupkov, prisotnost konidiacije, melanizacije in -irino hif ter obliko, velikost, prisotnost brstenja in melanizacije pri konidijih. Opazovali smo rob in sredino kolonije, saj so se strukture na razli nih obmo jih kolonije razlikovale.

Preglednica 4: Lastnosti celic izbranih sevov, pridobljene z diferencialno interferen no mikroskopijo

| GOJI -™ E | ™T. SEVA | Obmo je kolonije | HIFE | | | KVASNE CELICE | | | | | | MERISTEMAT- SKI SKUPKI | |
|----------------|----------|---------------------|---------------|-------------|------------------|---------------|------------|------------------|---------------|--------------|--------------|---------------------------|---------------|
| | | | ™rina (m) | Konidiacija | Melanizacij a | Oblika celic | ™ celic | Dolffina (m) | ™rina (m) | Brstenj e | Melanizacija | Dolffin a (m) | ™rina (m) |
| MEA + 0 % NaCl | EXF-155 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 7,2 / 9,5 | 4 / 4,2 | NE | DA | | |
| | | rob | 3,1 | NE | DA | podolgovate | 1 - 2 | 6,2 / 8,8 | 3 / 3,6 | DA | DA | | |
| | EXF-157 | sredina | | | | ovalne | 1 | 5,5 | 5 | NE | DA | | |
| | | rob | | | | podolgovate | 1 - 2 | 6,2 / 10,1 | 3,1 / 3,2 | DA | DA | | |
| | EXF-177 | sredina | | | | podolgovate | 2 | 6,1 | 3,2 | DA | DA | | |
| | | rob | 2,7 | NE | DA | | | | | | | | |
| | EXF-241 | sredina | | | | ovalne | 1 | 6,3 | 5 | NE | NE | | |
| | | rob | 2,6 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 9 | 4,5 | DA | DA | | |
| | EXF-2687 | sredina | 3,9 | NE | DA | ovalne | 1 | 7,5 | 6,5 | NE | DA | | |
| | | rob | 2,8 | NE | DA | podolgovate | 2 | 11 | 3,7 | DA | DA | | |
| | EXF-2688 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 5,6 / 11 | 4,8 / 5,2 | DA | NE | | |
| | | rob | 3,5 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 9,3 | 4,3 | DA | NE | | |
| | EXF-2690 | sredina | | | | ovalne | 1 | 6,5 | 6,4 | NE | DA | | |
| | | rob | 3,1 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 8,6 | 3,5 | DA | DA | | |
| MEA + 5 % NaCl | EXF-155 | sredna | | | | podolgovate | 1 - 2 | 5,3 / 10,3 | 4,3 / 5,4 | DA | DA | | |
| | | rob | 3 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 6,8 / 9,8 | 3,6 / 3,8 | DA | DA | | |
| | EXF-157 | sredina | 2,7 | DA | DA | podolgovate | 1 | 5,6 | 3,6 | DA | DA | | |
| | | rob | 3,8 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 5,8 / 9,1 | 3,8 / 4 | DA | DA | | |
| | EXF-177 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 6,2 / 10 | 3,2 | DA | DA | | |
| | | rob | 2,7 | NE | DA | | | | | | | | |
| | EXF-241 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 6 | 3,3 | DA | DA | | |
| | | rob | 3,7 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 7 / 10 | 3,7 / 5 | DA | DA | | |
| | EXF-2687 | sredina | | | | ovalne | 1 | 6,8 | 6,1 | NE | DA | | |
| | | rob | 3 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 9,2 | 5,3 | NE | DA | | |

Se nadaljuje.

| Nadaljevanje - Preglednica 4: Lastnosti celic izbranih sevov, pridobljene z diferencialno interferen no mikroskopijo | | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|---------|-----|----|-------------|-------------|------------|------------|-----------|----|----|-------------|------------|
| EXF-2688 | sredina | 2,6 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 6 / 7,8 | 4,6 / 5,4 | DA | DA | | | |
| | rob | 3,6 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 7 / 11,5 | 4,3 / 4,4 | DA | DA | | | |
| EXF-2690 | sredina | | | | ovalne | 1 - 2 | 7 / 13 | 6,5 / 7,6 | NE | DA | | | |
| | rob | 4,1 | DA | DA | ovalne | 1 - 2 | 7,2 / 10,3 | 5,4 / 5,5 | DA | DA | | | |
| MEA + 15 % NaCl | EXF-155 | sredina | | | podolgovate | 1 - 2 | 5,6 / 10 | 3,7 / 3,8 | DA | DA | | | |
| | | rob | 3,4 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 5,3 / 7,7 | 3,4 / 3,2 | DA | DA | | |
| | EXF-157 | sredina | | | | ovalne | 1 - 2 | 5,3 / 6,8 | 3,5 / 4,7 | DA | DA | | |
| | | rob | 4,5 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 5,1 / 8,4 | 3,7 / 3,9 | DA | DA | | |
| | EXF-177 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 7 / 9,5 | 2,7 / 3,6 | DA | DA | | |
| | | rob | 2,9 | DA | DA | podolgovate | 1 | 6,8 | 3 | DA | DA | | |
| | EXF-241 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 5,2 / 10,7 | 3,2 / 4,5 | DA | DA | | |
| | | rob | 3,7 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 5,8 / 9,3 | 3,1 / 4,1 | DA | DA | | |
| | EXF-2687 | sredina | | | | ovalne | 1 | 5,5 | 4,9 | NE | NE | | |
| | | rob | 3,9 | NE | DA | podolgovate | 1 - 2 | 6,3 / 9,2 | 4,4 / 4,9 | DA | DA | | |
| | EXF-2688 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 4,9 / 7,3 | 3,3 / 5,8 | DA | DA | | |
| | | rob | 4,4 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 5,9 / 11,1 | 3,1 / 3,9 | DA | DA | | |
| | EXF-2690 | sredina | | | | ovalne | 1 - 2 | 6,7 / 10,6 | 6,1 / 6,4 | DA | DA | | |
| | | rob | 4,3 | DA | DA | podolgovate | 1, 2 in ve | 5 / 7 / 13 | 3 / 4 / 5 | DA | DA | | |
| MEA + 20 % NaCl | EXF-155 | sredina | | | podolgovate | 1 - 2 | 4,9 | 2,9 | DA | DA | | | |
| | | rob | 3,7 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 6 / 7,4 | 2,8 / 3,3 | DA | DA | | |
| | EXF-157 | sredina | 3,5 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 6,8 / 9,1 | 4,7 / 5,7 | DA | DA | | |
| | | rob | 5,4 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 5,3 / 7,5 | 4,1 / 4,6 | DA | DA | 11,7 | 6,2 |
| | EXF-177 | sredina | 3,6 | DA | DA | | | | | | | | |
| | | rob | 4,5 | DA | DA | | | | | | | | |
| | EXF-241 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 9,2 / 12 | 3,6 / 4,1 | DA | DA | | |
| | | rob | 5 | DA | DA | podolgovate | 1 - 2 | 7,1 / 11 | 3,2 / 4,2 | DA | DA | | |
| EXF-2687 | | | | | | | | | | | | | |

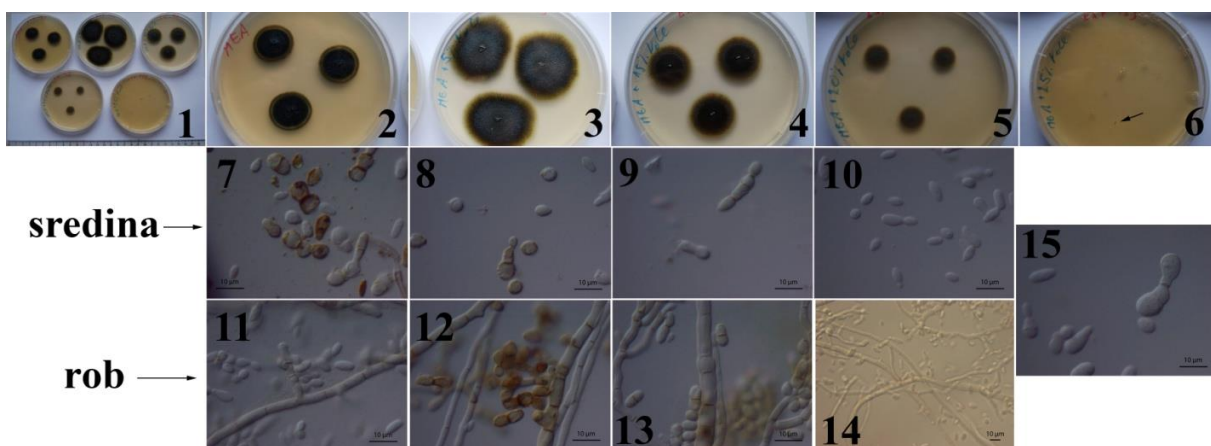
Se nadaljuje.

| Nadaljevanje - Preglednica 4: Lastnosti celic izbranih sevov, pridobljene z diferencialno interferen no mikroskopijo | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|-----|----|----|-------------|-------|------------|-----------|----|----|-------------|-------------|
| EXF-2688 | sredina | 2,9 | NE | DA | podolgovate | 1 - 2 | 4,9 | 3,3 | DA | DA | | |
| | rob | 4,6 | NE | DA | podolgovate | 1 - 2 | 6,3 / 9,5 | 3,6 / 4,1 | DA | DA | | |
| EXF-2690 | sredina | | | | podolgovate | 1 - 2 | 7,0 / 9,7 | 4,4 / 5,1 | NE | DA | 11 | 9 |
| | rob | 6,2 | DA | NE | podolgovate | 1 - 2 | 5,7 / 7,7 | 4,3 / 5,9 | NE | DA | | |
| MEA + 25 % NaCl | EXF-155 | | | | | | | | | | | |
| | EXF-157 | | | | podolgovate | 1 - 2 | 7,5 / 9,9 | 5,3 / 6,6 | NE | NE | 17,1 | 11,2 |
| | EXF-177 | | | | podolgovate | 1 - 2 | 6,9 / 10,4 | 3,8 / 4,3 | NE | DA | 15,8 | 9,4 |
| | EXF-241 | | | | podolgovate | 1 - 2 | 8,5 / 13,1 | 4,4 / 4,9 | DA | DA | | |
| | EXF-2687 | | | | | | | | | | | |
| | EXF-2688 | | | | | | | | | | | |
| | EXF-2690 | | | | | | | | | | | |

Legenda: (obarvano polje): Ni prisotnih struktur oz. rasti

Na spodnjih slikah so prikazane makro in mikromorfolo-ke zna ilnosti izbranih sevov *Hortaea werneckii* na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl . Mikroskopirali smo seve izolirane iz razli nih habitatov; EXF-155 (*tinea nigra*, Surinam), EXF-241 (soline, Se ovlje, Slovenija), EXF-2687 (zrak, Japonska), EXF-2688 (list rastline *Casuarina equisetifolia*, Kanarski otoki) in EXF 2690 (sajasta plesen na rastlini, ^TMilanka). Na sliki 13 so zbrane in prikazane zna ilne strukture razli nih sevov vrste *H. werneckii*, na goji- ih MEA z dodanimi razli nimi koncentracijami NaCl, vidne z diferencialno interferen no (DIC) mikroskopijo pri 1000x pove avi.

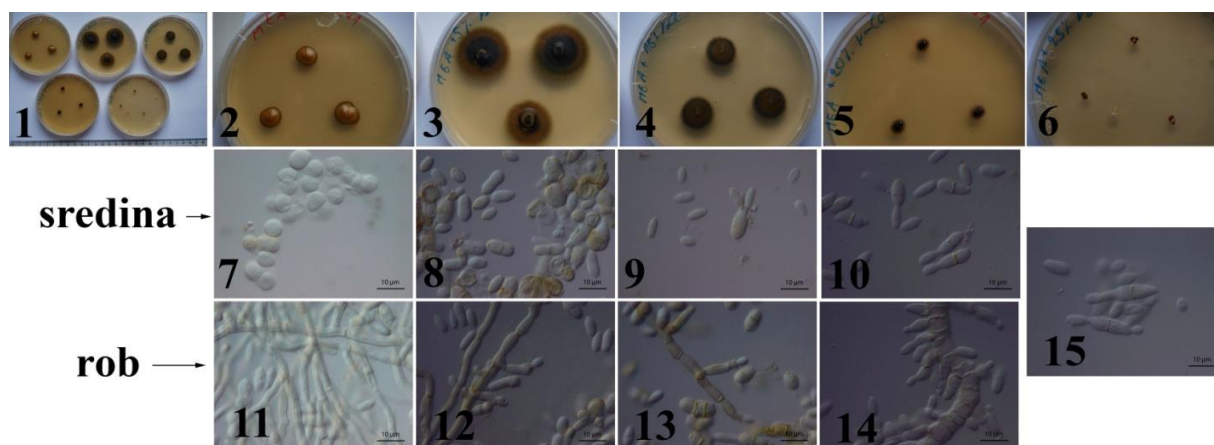
EXF-155 (*tinea nigra*, Surinam): hife smo opazili le na robovih kolonij, pri vseh koncentracijah NaCl, razen pri 25 %. Konidiji so bili tudi na goji- u brez NaCl dobro pigmentirani, slab-e so bili pigmentirani na goji- ih s pove-animi koncentracijami NaCl. Sev je uspeval tudi na goji- u s 25 % NaCl, vendar slabo. Meristematskih skupkov nismo opazili.



Slika 8: Makro in mikromorfolo-ke zna ilnosti seva EXF-155 na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl.

Legenda: **1:** rast na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl; **2:** MEA; **3:** MEA + 5 % NaCl; **4:** MEA + 15 % NaCl; **5:** MEA + 20 % NaCl; **6:** MEA + 25 % NaCl; **7-10:** mikroskopiranje sredine kolonije pri pripadajo i konc. NaCl; **11-14:** mikroskopiranje roba kolonije pripadajo i konc. NaCl; **15:** mikroskopiranje predela ozna enega s pu- ico ó MEA + 25 % NaCl. Pove ava mikrskopiranja 1000x, le sl. 14: 400x.

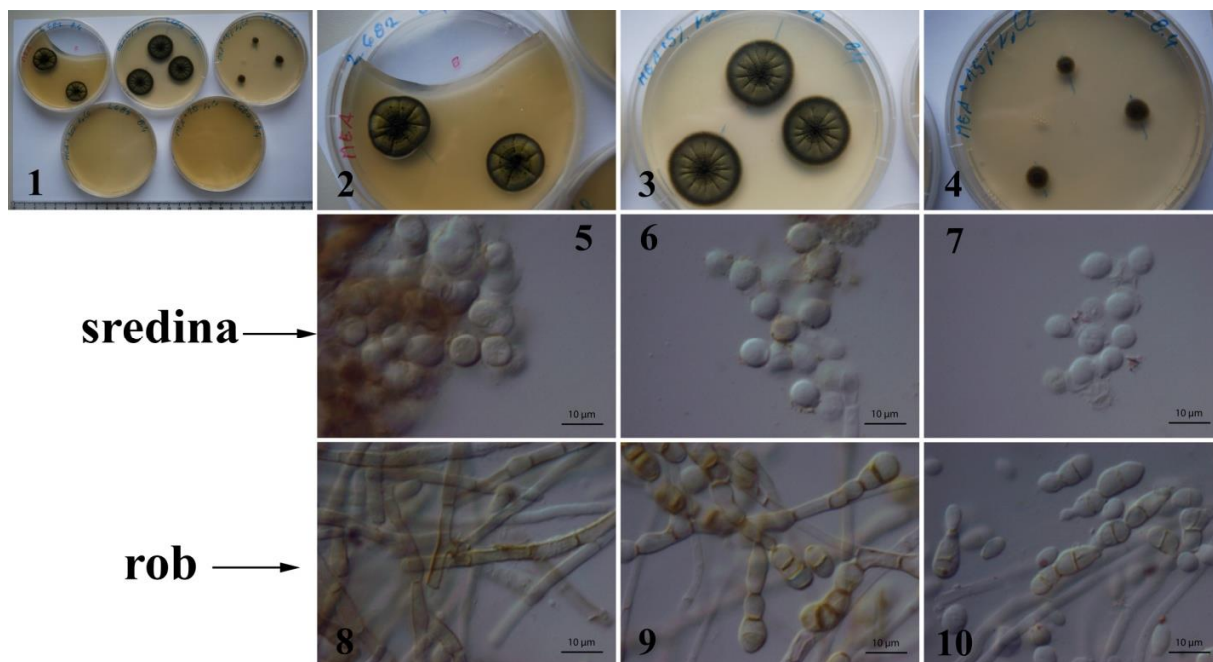
EXF-241 (soline, Se ovlje, Slovenija): Na goji- u brez NaCl so bile celice ovalna, slabo pigmentirane. Pigmentiranost se je pove ala na goji- ih s pove-ano koncentracijo NaCl. Hife so bile prisotne le na robu kolonij. Na goji- u z 20 % NaCl, so se hife fle debelile in pre no septirale. Rast na goji- u s 25 % NaCl je bila prisotna v kvasni obliki.



Slika 9: Makro in mikromorfolo-ke zna ilnosti seva EXF-241 na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl.

Legenda: **1**: rast na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl; **2**: MEA; **3**: MEA + 5 % NaCl; **4**: MEA + 15 % NaCl; **5**: MEA + 20 % NaCl; **6**: MEA + 25 % NaCl; **7-10**: mikroskopiranje sredine kolonije pripadajo ih slanosti; **11-14**: mikroskopiranje roba kolonije pripadajo i konc. NaCl; **15**: MEA + 25 % NaCl. Pove ava mikroskopiranja: 1000x.

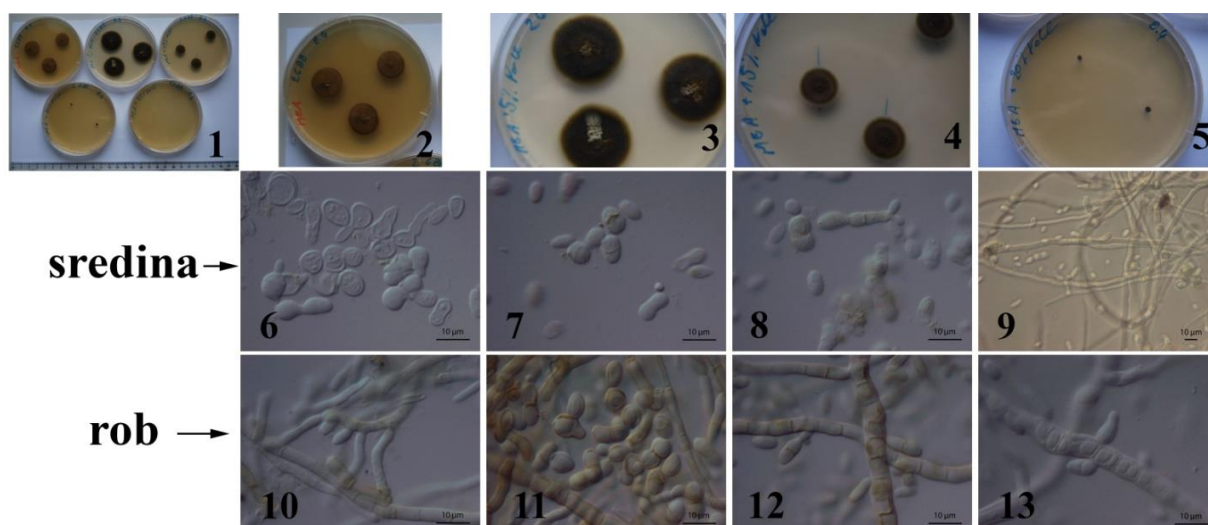
EXF-2687 (zrak, Japonska): V sredini kolonij so bile celice ovalna. Na robovih so bile prisotne hife. Na goji– u s 5 % NaCl, so bili na robovih konidiji ve ji, tudi do trikrat pre no septirani, z debelo celi no steno in mo no melanizacijo. Na goji– u s 15 % dodanim NaCl smo opazili tudi vzdolžno septirane konidije. Sev na goji– u s 20 % NaCl in 25 % NaCl ni rasel.



Slika 10: Makro in mikromorfolo-ke zna ilnosti seva EXF-2687 na goji– u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl.

Legenda: **1:** rast na goji– u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl; **2:** MEA; **3:** MEA + 5 % NaCl; **4:** MEA + 15 % NaCl; **5-7:** mikroskopiranje sredine kolonije pripadajo i konc. NaCl; **8-10:** mikroskopiranje roba kolonije pripadajo i konc. NaCl. Pove ava mikroskopiranja: 1000x.

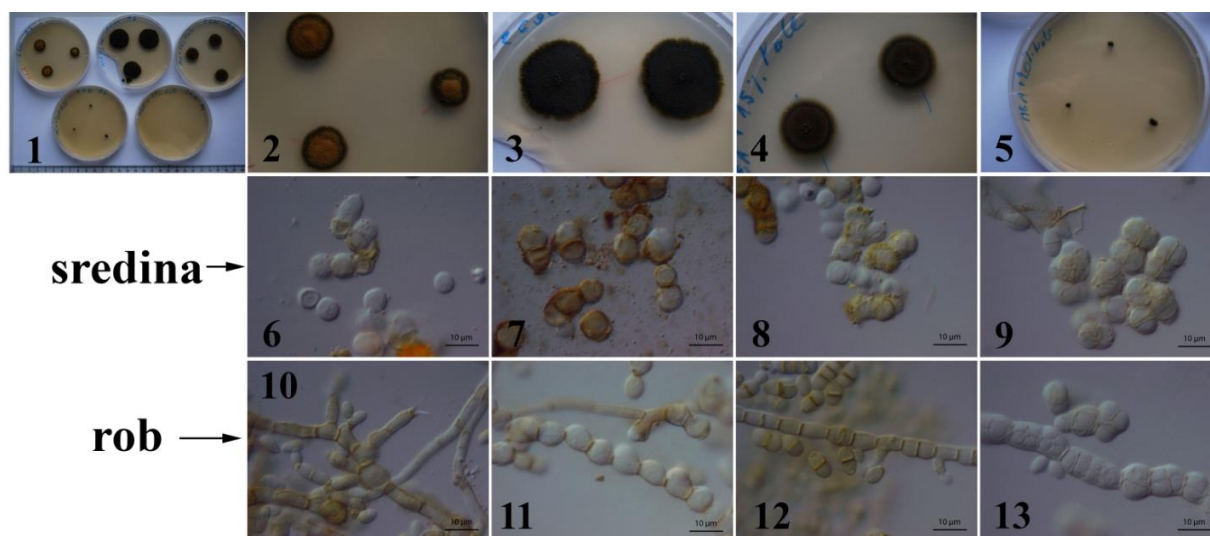
EXF-2688 (List rastline *Casuarina equisetifolia*, Kanarski otoki: Celice s sredine kolonij so bile na goji- u brez NaCl ovalna do ovalne, slabo pigmentirane. Hife so bile prisotne le na robu kolonij. Na goji- ih s 5 % NaCl in 15 % NaCl, so bile celice in konidiji mo no pigmentirani. Na goji- u z 20 % NaCl so bile hife -iroke in gosto septirane. Sev na goji- u s 25% NaCl ni rasteL.



Slika 11: Makro in mikromorfolo-ke zna ilnosti seva EXF-2688 na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl.

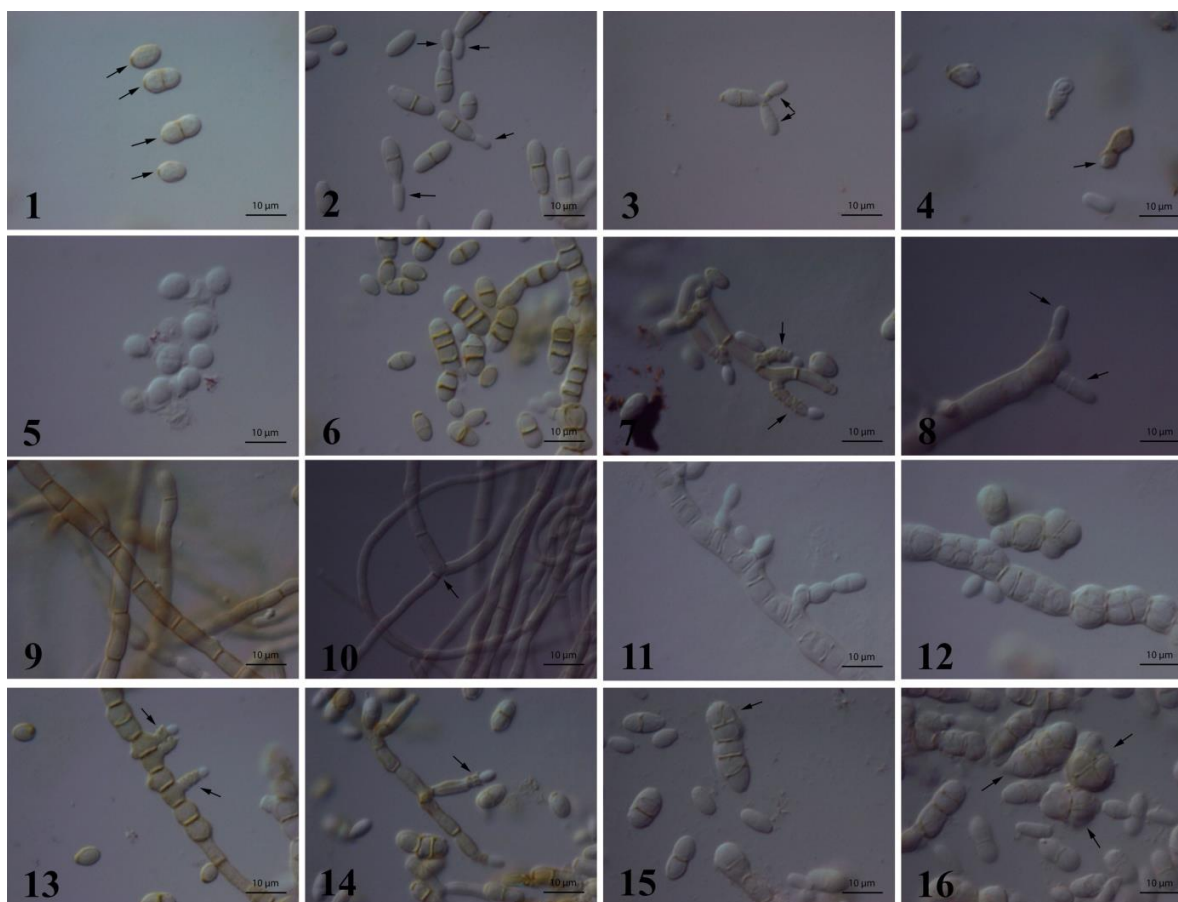
Legenda: **1:** rast na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl; **2:** MEA; **3:** MEA + 5 % NaCl; **4:** MEA + 15 % NaCl; **5:** MEA + 20 % NaCl; **6-9:** mikroskopiranje sredine kolonije pripadajo i konc. NaCl; **10-13:** mikroskopiranje roba kolonije pripadajo i konc. NaCl. Pove ava mikroskopiranja: 1000x, le sl. 9: 400x.

EXF 2690 (sajasta plesen na rastlini, ^Tmilanka): Celice na sredini kolonij so bile ovalna. Na goji- u brez NaCl so bile celice slabo pigmentirane, pri vi-ji koncentraciji NaCl so imele debele celi ne stene in bile mo no pigmentirane. Na robu kolonij so bile hife na vseh goji- ih mo no pigmentirane. Na goji- u s 20 % NaCl so bile dobro vidne -iroke, pre no in vzdoljno septirane hife, ki so razpadale v meristematske skupke. Sev na goji- u s 25% NaCl ni rasel.



Slika 12: Makro in mikromorfolo-ke zna ilnosti seva EXF-2690 na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl.

Legenda: **1:** rast na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl; **2:** MEA; **3:** MEA + 5 % NaCl; **4:** MEA + 15 % NaCl; **5:** MEA + 20 % NaCl; **6-9:** mikroskopiranje sredine kolonije pripadajo i konc. NaCl; **10-13:** mikroskopiranje roba kolonije pripadajo i konc. NaCl. Pove ava mikroskopiranja: 1000x.



Slika 13: Zna ilne strukture razli nih sevov vrste *H. werneckii*, na goji- ih MEA z dodanimi razli nimi koncentracijami NaCl, vidne z diferencialno interferen nim mikroskopom pri 1000x pove avi.

Legenda: **1:** EXF-2690 - eno in dvo-celi ni konidiji z dobro vidno odebeljeno celi no steno na mestu odcepitve od mati ne celice; **2:** EXF-2688 - dvo-celi ini konidiji s polarno polarno cepitvijo h erinskih celic; **3** EXF-241 - dvo-celi ni konidij s sinhrono simpodialno cepitvijo dveh h erinskih celic; **4:** EXF 155 - endogena konidiacija; **5:** EXF-2687 - okrogli enoceli ni konidiji; **6:** EXF-2690 - 0-3x pre no septirani konidiji z debelimi melaniziranimi septami; **7:** EXF-241 - anelidna konidiacija h erinskih celic s konidiogenih celic hif, dobro so vidne obro aste cone konidiacije; **8:** EXF-177 - simpodialna konidiacija s hifne celice ; **9:** EXF-2688 - hife z debelo melanizirano celi no steno; **10:** EXF-177 - razvejitev hife ; **11:** EXF-2690 ó -iroke, ve krat pre no septirane hife; **12:** EXF-2690 - debele ve krat pre no in vzdoljno septirane hife, za etek tvorbe meristematskih skupkov; **13:** EXF-2690 - obro aste cone konidiacije po ve kratni cepitvi h erinskih celic s konidiogene celice hife; **14:** EXF-241 - obro asta cona konidiacije; **15:** EXF-177 - ve krat pre no in vzdoljno septirane celice, za etek tvorbe meristematskih skupkov; **16:** EXF-177 ó zreli meristematski skupki (hlamidospore).

Slike 1,4,7,9: rast na MEA + 5 % NaCl; slike 2, 3, 5, 6, 10, 14: rast na MEA + 15 % NaCl; slike 8,11,12,13: rast na MEA + 20 % NaCl; slike 15,16: rast na MEA + 25 % NaCl.

5 DISKUSIJA

5.1 MIKRO IN MAKROMORFOLOGIJA

Spremljali smo morfolo-ke zna ilnosti razli nih sevov na goji- u MEA z razli nimi koncentracijami NaCl. Izbrane seve smo mikroskopirali z diferencialno interferen no kontrastno mikroskopijo.

Kolonije na plo- ah so bile izjemno raznolike, kar se ujema z izredno polimorfno naravo vrste *Hortaea wernecki*, ki je odvisna od trenutnih pogojev v okolju (de Hoog 1993). Na goji- u brez dodanega NaCl, je bila ve ina sevov v kvasni obliki, ki je bila sprva slabo melanizirana. Po dalj-em asu inkubacije so kolonije po rnele, debele, melanizirane celi ne stene pa so postale dobro vidne s svetlobno mikroskopijo, kar je ena od zna ilnosti *H. wernecki* (Chen in sod. 2012). Na goji- u s 5 % NaCl, so bili sevi prvi teden inkubacije najve krat v kvasni obliki, kasneje pa so za eli s formacijo hif prodirati v globino goji- a. Hife so -e vedno zelo aktivno tvorile nove konidije, kar je dalo kolonijam svetle , mazav videz kvasne rasti. Pri -e povi-ani koncentraciji NaCl v goji- u, se je za ela tvorba hidrofobnih hif v obliki zra nega miceljia. Hife iz kolonij so izra- ale nad povr-ino goji- a. To v neugodnih pogojih, ko v okolju primanjkuje vode, omogo a prena-anje konidijev po zraku (de Hoog 1993). Dalj-i kot je bil as inkubacije in vi-ja kot je bila koncentracija NaCl v goji- u, ve razli nih morfolo-kih oblik kolonij smo opazili. Opazili smo celo ve morfolo-ko razli nih oblik na isti koloniji. Velikokrat se razlikujeta tudi rob in sredina kolonije, zato smo jih mikroskopirali lo eno. Za rob kolonije je zna ilna eksponentna faza rasti, kamor se izra- ajo nove hife, pa tudi brstenje konidijev smo tukaj pogosteje opazili. Medtem ko v sredini koloniji pri mikroskopiranju nismo opazili hif, celice pa so najve krat ovalna oblike, pa tudi brstenje konidijev tukaj redko opazimo.

Tedensko smo merili premere kolonij pri razli nih koncentracijah NaCl v goji- ih. Najbolje so rastle sevi na goji- u z dodanim 5 % NaCl, kar se ujema z ugotovljeno optimalno koncentracijo NaCl za rast, ki je 5 do 10 % NaCl (Zalar in sod. 1999a). Vsi sevi so uspevali

tudi na goji- u brez dodanega NaCl, kar potrjuje halotolerantno naravo *H. werneckii* ó sol za njeno rast ni nujno potrebna, kar jo lo uje od halofilnih vrst, ki pa za rast sol nujno potrebujejo (Gunde-Cimerman in sod. 2009). Na goji- u z dodanim 25 % NaCl, je zrastle le nekaj sevov, pa -e pri teh je rast zelo slaba, kolonije pa najve krat manj-e od 1 milimetra. To pripisujemo dejstvu, da na tako povi-ani koncentraciji NaCl sevi rastejo zelo po asi. e bi feleli bolje opazovati rast pri tak-ni koncentraciji NaCl, bi morali as inkubacije podalj-ati, saj so kolonije nekaterih sevov s prostim o esom vidne -ele po -tirih tednih (Sterlflinger 2006) Z istega razloga smo pri mikroskopiranju, le pri -tirih sevih opazili hlamidospore - meristematske skupke, ki nastanejo pri najbolj neugodnih pogojih. e bi podalj-ali as inkubacije, bi se le-ti najbrfl za eli tvoriti tudi pri ostalih sevih.

Izra unali in primerjali smo povpre ja velikosti kolonij solinskih sevov in sevov izoliranih s loveka. Sevi izolirani s loveka so imeli po treh tednih inkubacije na vseh goji- ih ve je ali enako velike kolonije kot solinski sevi. Po nekaterih podatkih, naj bi solinski sev na goji- ih z dodanim NaCl rastle nekoliko hitreje kot sev izoliran s loveka (Zalar in sod., 1999a). Solinski sevi so pri na-i raziskavi imeli v povpre ju manj-e kolonije na vseh goji- ih tudi po prvem in drugem tednu inkubacije. To je lahko dodatni pokazatelj, da vrsta ni bila podvrflena evolucijski divergenci in prilagoditvi flivljenju na love-ki kofli, ampak jo naseljuje zgolj zaradi podobnih okoljskih dejavnikov, kot je njena naravna ekolo-ka ni-a (de Hoog 1993).

5.2 MOLEKULARNO GENETSKE ANALIZE

Opravljenih je bilo fle ve -tudij znotrajvrstne raznolikosti *Hortaea werneckii*. Avtorji so dolo ali znotrajvrstne raznolikosti na podlagi filogenetske analize ITS1 regije (Zalar in sod. 1999), ITS2 regije in regije 5,8S rDNA (de Hoog in sod. 1999), z RAPD analizo (Uijthof in sod. 1994) ter z RFLP tehnikami mitohondrijske DNA (mtDNA) (de Cock 1994). Rezultati so nakazovali na ve skupin znotraj *H. werneckii*.

Tudi pri na-ih analizah smo lahko potrdili obstoj ve skupin znotraj vrste. Pri metodi prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13, smo opazili zdrufljevanje analiziranih sevov v -est skupin. Zaradi majhnega -tevila pomnoflenih fragmentov ó pri nekaterih sevih se je pomnofil le en fragment, je lo evanje v podskupine filogenetsko slabo podprto. Iz pridobljenega dendrograma izrisanega na osnovi podobnosti profilov pomnoflenih fragmentov je razvidno, da se klini ni sevi zdrufljujejo v skupine skupaj s solinskimi sevi. Tako najdeno sev izoliran z ledvic flabe in solinski sev v isti gru i ter sev izoliran s loveka in solinski sev spet v drugi gru i. V -esti gru i najdemo dva seva izolirana s loveka, imamo pa tudi gru o v kateri so le solinski sevi. Kot je napovedovala na-a hipoteza, sevi osamljeni iz ljudi in flivali niso lo eni v razli ne filogenetske skupine, temve so med samo pome-ani.

Vse seve smo analizirali z metodo AFLP (polimorfizem dolfine pomnoflenih delov). Iz pridobljenega dendrograma zgrajenega na osnovi podobnosti AFLP profilov, lahko lo imo dve filogenetsko mo no podprti skupini. V drugi skupini so le klini ni izolati ó trije sevi izolirani s loveka, sev iz ledvic flabe in sev iz ribe. Vsi ostali sevi so v prvi veliki skupini. Znotraj prve skupine bi lahko med seboj lo ili ve podskupin, vendar podskupine niso lo ene z zadostno podporo. Hipoteza je s to metodo delno potrjena, saj se klini ni izolati niso zdruflili izklju no v eno skupino, ampak jih najdemo tudi v podskupinah z okoljskimi izolati.

Pri metodi prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13 smo opazili le 12 polimorfnihi znakov, medtem ko pri metodi AFLP kar 120 polimorfnihi znakov. Metoda AFLP je bolj robustna in prilagodljiva, saj lahko z dodatkom selektivnih nukleotidov na oligonukleotidna za etnika prilagodimo ob utljivost metode. Ve kot dodamo selektivnih nukleotidov ve ja bo specifi nost vezave oligonukleotidnega za etnika in s tem manj pomnoflenih fragmentov. Tudi zaporedje selektivnih nukleotidov vpliva na specifi nost vezave za etnika (Savelkoul in sod. 1999). Pri na-em delu smo preliminarno testirali vpliv selektivnih nukleotidov na -tevalo pomnoflenih fragmentov. V fazi amplifikacije smo testirali tri kombinacije za etnikov; primer EcoRI in primer MspI, oba brez selektivnih nukleotidov, primer EcoRI brez selektivnih nukleotidov in primer MspI-TA (timin-adenin) ter primer

EcoRI-AC (adenin-citozin) in MspI-TA (timin-adenin). Pri prvih dveh kombinacijah je bilo pomnoženih fragmentov preve , pri kombinaciji obeh za etnikov s selektivnima nukleotidoma pa je bilo fragmentov dovolj, vendar ne preve (rezultati niso prikazani). Metoda AFLP je tako bolj primerna za razlikovanje offje sorodnosti nifljih taksonomskih skupin - kot na primer znotraj vrste, medtem ko za prou evanje sorodnosti vi-jih taksonomskih skupin, zaradi premajhnega -tevila skupnih fragmentov in s tem zdrufljevanja nesorodnih skupin, ni primerna (Savelkoul in sod. 1999).

6 SKLEPI

- *Hortaea werneckii* je izjemno halotolerantna, saj ve ina testiranih sevov raste na goji-ih brez NaCl, do koncentracije NaCl 25 %.
- Za rast na povi-ani koncentraciji NaCl v goji- u potrebujejo sevi dalj asa - na goji-ih s 25 % NaCl vsaj -tiri tedne
- Razlik v uspe-nosti rasti pri povi-ani koncentraciji NaCl med sevi izoliranimi s loveka in solinskimi sevi nismo opazili. Sevi izolirani s loveka po treh tednih inkubacije na goji-ih brez NaCl in na goji-ih s povi-ano koncentracijo NaCl tvorijo ve je, ali enako velike kolonije kot solinski sevi.
- Na osnovi analize podobnosti pomnofenih fragmentov z metodo prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13, so se sevi grupirali v -est skupin, a zaradi malega -tevila pomnofenih fragmentov s slabo podporo. Sevi se glede na njihovo geografsko poreklo in habitat niso zdrufevali v skupine, ampak so v skupinah pome-ani.
- Na osnovi podobnosti profilov pomnofenih fragmentov pri metodi polimorfizma dolfine pomnofenih delov (AFLP) z oligonukleotidnima za etnikoma in dodanimi selektivnimi nukleotidi EcoRI-AC in MspI-TA, so se sevi z mo no podporo grupirali v dve skupini. Ena je vsebovala le nesolinske seve, v drugo pa so se zdrufile tako solinski kot nesolinski sevi izolirani s loveka in drugih habitatov. Znotraj skupin se sevi grupirajo z zelo slabo podporo.
- Pri ugotavljanju znotrajvrstne raznolikosti *H. werneckii*, z analizo celokupne genomske DNA, sta EcoRI-AC in MspI-TA najprimernej-a kombinacija za etnikov in selektivnih nukleotidov.

7 POVZETEK

Hortaea werneckii je ekstremno halotolerantna rna kvasovka. Kot njeno naravno ekolo-ko ni-o so dolo ili slanice v solarnih solinah, izolirali pa so jo -e iz -tevilnih drugih naravnih slanih habitatov, kot npr. slana jezera in kamnite povr-ine ob obali. Na spremembe v okolju se kot ostale rne kvasovke odzove s kompleksnim fivljenjskim krogom, kjer se izmenjujeta hidrofilna kvasna oblika in hidrofobna rast v obliki hif. Pri loveku povzro a povr-inske okuffbe dlani in stopal, znane pod imenom *tinea nigra*, vendar le v tropskih in subtropskih predelih. Raznolik izvor sevov, tako s loveka kot iz ekstremne naravne ekolo-ke ni-e - solin, pa postavlja vpra-anje, ali se izolati iz okolja in iz loveka razlikujejo.

V okviru diplomskega dela smo seve *H. werneckii*, izolirane iz razli nih habitatov in lokacij, od tropskega do zmernega pasu primerjali na mikromorfolo-kem in makromorfolo-kem nivoju, primerjali smo sposobnost rasti na goji-ih z razli nimi koncentracijami NaCl ter ugotavljali znotrajvrstno variabilnost na nivoju genoma. Uporabili smo dve molekularno genetski metodi, in sicer metodo raznolikosti dolffin pomnoflenih fragmentov (AFLP) in metodo prstnega odtisa z nukleotidnim za etnikom bakteriofaga M13.

Razlik v uspe-nosti rasti na goji-ih s povi-ano koncentracijo NaCl med sevi osamljenimi s love-ke kofle in solinskimi sevi nismo opazili. Ve ina sevov je rastla v razponu od 0 do 25 odstotkov dodanega NaCl. Z molekularno genetskimi metodami smo ugotovili, da se solinski in ostali okoljski sevi ter sevi izolirani s loveka niso lo evali v razli ne filogenetske skupine, ampak so bili zdrufleni. To je lahko pokazatelj, da vrsta ni posebej prilagojena na rast na love-ki koffi, ampak jo naseljuje zgolj zaradi podobnosti s svojim primarnim okoljem ó solinami.

8 VIRI

- Abliz P., Fukushima K., Takizawa K., Miyaji M., Nishimura K. 2003. Specific oligonucleotide primers for identification of *Hortaea werneckii*, a causative agent of *tinea nigra*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46: 89-93
- Andrews, S., Pitt, J. I. 1987. Further studies on the water relations of xerophilic fungi, including some halophiles. *Journal of general microbiology*, 133: 233-238
- Blomberg A., Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in microbial physiology*, 33: 145-212
- Blomberg A. 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 1-8
- Bonifaz A., Badali H., Hoog G.S. de, Cruz M., Araiza J., Cruz M.A., Fierro L., Ponce R.M. 2008. *Tinea nigra* by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. *Studies in mycology*, 61: 77-82
- Buchalo A.S., Nevo E., Wasser SP., Oren A., Molitoris H.P. 1998. Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead sea: first records. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 256: 1461-1465
- Cabanes J. F., Bragulat R. M., Castella G. 2012. *Hortaea WHortaea werneckii* isolated from silicone scuba diving equipment in Spain. *Medical Mycology*, 50: 8: 852-857
- Castellani A., 1966. *Tinea nigra*; Some remarks and annotations, chiefly historical. *Mycopathologia*, 30: 193-199
- Chen J., Xing X. K., Zhang L. C., Xing Y. M., Guo S. X. 2012. Identification of *Hortaea WHortaea werneckii* isolated from mangrove plant *Aegiceras comiculatum* based on morphology and rDNA sequences. *Mycopathologia*, 174, 5-6: 457-466
- de Cock A.W.A.M. 1994. Population biology of *Hortaea werneckii* based on restriction patterns of mitochondrial DNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 65: 21-28
- Denning D.W., Clemons K.V., Hanson L.H., Stevens D.A. 1990. Restriction Endonuclease Analysis of Total Cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* Isolates of Geographically and Epidemiologically Diverse Origin. *The Journal of Infectious Diseases*, 162: 1151-1158
- Fuchs Vivian, 1995. Enciklopedija nefive narave. Ljubljana, DZS: 349 str.

- Göttlich E., Hoog G.S. de, Yoshida S., Takeo K., Nishimura K., Miyaji M., 1995. Cell surface hydrophobicity and lypolysis as essential factors in human *tinea nigra*. *Mycoses*, 38: 489-494
- Gerrits van den Ende A.H.G., de Hoog G.S. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophiala bantiana*. *Studies in Mycology*, 43: 151-162
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog G.S., Plemenita- A., 2000, Hypersaline waters in salterns ó natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240
- Gunde-Cimerman N., Sonjak S., Zalar P., Frisvad J.C., Diderichsen B., Plemenita- A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and watre activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28: 1273-1278
- Gunde-Cimerman N., Ramos J., Plemenita- A., 2009. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113: 1231-1241
- Haase, G., Sonntag, L., Melzer-Krick, B., Hoog, G.S. de 1999. Phylogenetic inference by SSU-gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. *Studies in mycology*, 43: 80-97
- de Hoog G.S., Hermandies-Nijhof E.J. 1977. The black yeasts and allied hypomyces. *Mycologia*, 69: 1242-1244
- de Hoog G.S., Gerrtis van den Ende A.H.G. 1992. Nutritional pattern and eco-physiology of *Hortaea WHortaea werneckii*, agent of human *tinea nigra*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 62: 321-329
- de Hoog G.S., 1993 Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63: 105-109
- de Hoog G.S., Zalar P., Urzi C., de Leo F., Yurlova N.A. Sterflinger K. 1999. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology*, 43: 33-40
- de Hoog G. S., Guarro J., Gené, J., Figueras, M. J. 2000. Atlas of clinical fungi, Washington, ASM Press: 1160 str.

<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> (20. jun. 2007)

<http://web.natur.cuni.cz/flegr/programs/freetree.htm> (20. jun. 2007)

- Javor B. 1989. Hypersaline environments, Microbiology and Biogeochemistry. Springer, Berlin, Heidelberg: 328 str.
- Kejflar A., Gobec S., Plemenita- A., Lenassi M. 2013. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. Fungal Biology, 117: 3686379
- Kejflar A., Gibic M., Grötli M., Plemenita- A., Lenassi M. 2015 The unique characteristics of HOG pathway MAPKs in the extremely halotolerant *Hortaea werneckii*. FEMS Microbiology Letters, 362: doi: 10.1093/femsle/fnv046: 9 str.
- Kis-Papo T., Oren A., Wasser S.P., Nevo E. 2003. Survival of Filamentous Fungi in Hypersaline Dead Sea Water. Microbial Ecology, 45: 183-190
- Kogelj T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A. A., Galinski E. A., Ginde-cimerman N. 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea WHortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. Microbiology, 153: 4261-4273
- Lenassi M., Gostin ar C., Jackman S., Turk M., Sadowski I., Nislow C., Jones S., Birol I., Gunde-Cimmerman N., Plemenita- A. 2013. Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by *de novo* genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. PLoS ONE, 8, 8: e71328, doi: 10.137/journal.pone.0071328: 18 str.
- McKinlay J.R., Barrett T.L., Ross E.V. 1999. Picture of the month. *Tinea nigra*. Archives of pediatrics & adolescent medicine, 153: 305-306
- Neves, J.A, Costa O.G., 1947. *Tinea nigra*. Archives of Dermatology, 55: 67-84
- Ng K. P., Soo-Hoo T. S., Na S. L. Tay S. T., Hamimah H., Lim P. C., Chong P. P., Seow H. F., Chavez A. J., Messer S. A., 2005. The mycological and molecular study of *Hortaea werneckii* isolated from blood and splenic abscess. Mycopathologia, 159: 495-500
- Nishimura, K., Miyaji, M. 1984. *Hortaea*, a new genus to accomodate *Cladosporium werneckii*. Japanese journal of medical mycology, 25: 139-146
- Norbeck J., Blomberg A. 1996. Protein expression during exponential growth in 0.7 M NaCl medium of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Letters, 137, 1: 1-8
- Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. Microbial and molecular biology rewievs, 63, 2: 334-348

- Oren, A. 2002. Halophilic microorganisms and their environments. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 575 str.
- Page R.D.M. 2000 TreeView software. Glasgow, Institute of Biomedical and Life Sciences, Division of Environmental and Evolutionary Biology.
http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview/treeview_manual.html (20. jun. 2007)
- Pavli ek A., Hrda S., Flegr J. 1999 Freetree ó freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/jackknife analysis of the trees robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica*, 45: 97-99
- Perez C., Colella M.T., Olaizola C., Capriles C.H. de, Magaldi S., Mata-Essayag S. 2005. *Tinea nigra*: Report of twelve cases in Venezuela. *Mycopathologia*, 160: 235-238
- Pitt, J.I., Hocking A.D. 1977 Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relationship of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology*, 101: 35-40
- Plemenita- A., Vaupoti T., Lenassi M., Kogelj T., Gunde-Cimerman N. 2008. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea WHortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, 61: 67-75
- Raper K.B., Thom C. 1949. A manual of the *Penicillia*. Baltimore, Williams and Wilkins: 875 str.
- Ryskov A.P., Jincharadze A.G., Prosnjak M.I., Ivanov P.L., Limborska S.A. 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Letters*, 233: 388-392
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor: 854 str.
- Savelkoul, P. H. M., Aarts H. J. M., de Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker L. W., Schouls L., Lenstra J. A. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3083-3091
- Sharmin S., Haritani K., Tanaka R., Abliz P., Takizawa K., Sano A., Fukushima K., Nishimura K., Miyaji M. 2002 The first isolation of *Hortaea werneckii* from a household guinea pig. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 43: 175-180
- Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimmerman N. 2007. Genetic variation among *Penicillium crustum* isolates from Arctic and other ecological niches. *Microbial Ecology*, 54: 298-305

- Sterflinger K., 1998. Temperature and NaCl- tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74: 271-281
- Sterflinger, K., Hoog de, G.S., Haase G., 1999. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in mycology*, 43: 5-22
- Sterflinger K. 2006. Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*: 501-514
- Turk M., Plemenita- A. 2002. The HOG Pathway in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: isolation of the *HOG1* homolog gene and activation of HwHog1p. *FEMS Microbiology Letters*, 216: 193-199
- Uijthof J.M., de Cock A.W., de Hoog G.S, Quint W.G., van Belkum A. 1994. Polymerase chain reaction-mediated genotyping of *Hortaea werneckii*, causative agent of *tinea nigra*. *Mycoses*, 37: 307-312
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee van de T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kupier M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. 1990. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535
- Zalar, P. 1999. Halofilne rne kvasovke v vodah solin. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehni-ka fakulteta, Oddelek za biologijo: 96 str.
- Zalar, P., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. 1999a. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology*, 43: 38-48
- Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Scripta, ^Tudentstva: 92 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman, brez katere diplomske naloge ne bi bilo.

Hvala recenzentki prof. dr. Ani Plemenita-za hiter in tehten pregled naloge.

Za vso pomo v laboratoriju, ko sem jo najbolj potreboval, se iskreno zahvaljujem doc. dr. Cenetu Gostin arju in doc. dr. Martini Turk.

Velika hvala gre dr. Silvi Sonjak za pomo in protokole pri AFLP.

Levji delefl zahvale pripada predsednici komisije in »delovni mentorici« doc. dr. Poloni Zalar, ki je vedno na-la as zame, me spremljala skozi celoten prakti ni del naloge, mi pomagala pri -tevilnih vpra-anjih in zapletih, za vse predloge ter za hiter in temeljit pregled naloge.

Posebna zahvala gre doma im, ki so mi stali ob strani in mi dajali inspiracijo, posebej mali Maks in Petra, kateri gre tudi zahvala za odli ne, skoraj profesionalne fotografije sevov.

PRILOGE

PRILOGA A

VELIKOSTI KOLONIJ V MILIMETRIH NA GOJI™ U MEA Z RAZLI NIMI KONCENTRACIJAMI NaCl, PO ENEM, DVEH IN TREH TEDNIH INKUBACIJE

| | teden | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
|--------------|------------|----------|------|------|----------|------|------|-----------|------|------|-----------|-----|-----|-----------|-----|-----|
| EXF -t. seva | Konc. NaCl | 0 % NaCl | | | 5 % NaCl | | | 15 % NaCl | | | 20 % NaCl | | | 25 % NaCl | | |
| 9 | | 5 | 9 | 12 | 9 | 20 | 30 | 3 | 10 | 18,5 | 2 | 4 | 6 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | | 2,5 | 6 | 11 | 3,5 | 18 | 30 | 2 | 3 | 12,5 | 1 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | | / | / | / | 7,5 | 19,5 | 30 | 2 | 10 | 19 | 2 | 3 | 4,5 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | | 3,5 | 10 | 17,5 | 7,5 | 16,5 | 19,5 | 2,5 | 6,5 | 15 | 1,5 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1,5 |
| 18 | | 4,5 | 11,5 | 19 | 3 | 10 | 27 | 2 | 7,5 | 19 | 0 | 1,5 | 4,5 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | | 4 | 7,5 | 15,5 | 3,5 | 12 | 27 | 2 | 4,5 | 13 | 2 | 3 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| 20 | | 3 | 10 | 17 | 5 | 17 | 26 | 2 | 7 | 18 | 0 | 1,5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | | 2,5 | 4,5 | 8 | 5,5 | 18 | 27 | 1,5 | 5 | 11 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | | / | 5 | 8 | 10 | 25 | 42 | 3 | 12 | 23 | 0 | 2,5 | 10 | 0 | 0 | 2,5 |
| 96 | | / | / | / | 3,5 | 10 | 23 | 2 | 8,5 | 19,5 | 0 | 2 | 6,5 | 0 | 0 | 1 |
| 100 | | 3,5 | 8 | 12 | 9 | 20 | 33 | 2 | 9,5 | 19 | 0 | 2,5 | 5 | 0 | 0 | 1 |
| 108 | | / | / | / | 3 | 6,5 | 13 | 1,5 | 2,5 | 8 | 0 | 1,5 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |
| 112 | | 3 | 6 | 9 | 3 | 11 | 21 | 2,5 | 3,5 | 13 | 0 | 2 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |
| 120 | | 3 | 6 | 9 | 2,5 | 6,5 | 16,5 | 1,5 | 3 | 7 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 151 | | 3,5 | 6,5 | 13 | 7 | 16 | 26,5 | 2 | 5,5 | 12 | 0 | 1,5 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 154 | | / | / | / | 4 | 6,5 | 11,5 | 2,5 | 3,5 | 8,5 | 0 | 1,5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 155 | | 4 | 10 | 16 | 9,5 | 21,5 | 31 | 5 | 11,5 | 21,5 | 1 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| 157 | | 1,5 | 9 | 12 | 3 | 10 | 18 | 1 | 2 | 10,5 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 166 | | 3 | 6 | 9 | 5 | 15 | 27 | 1,5 | 6,5 | 14,5 | 1 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 171 | | 5,5 | 14 | 25 | 11 | 21 | 37 | 1 | 5 | 11 | 0 | 0 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 177 | | 1 | 7 | 14,5 | 9,5 | 20,5 | 36,5 | 3,5 | 10,5 | 21 | 0 | 3 | 9,5 | 0 | 0 | 1 |
| 239 | | 3,5 | 7,5 | 10,5 | 3 | 12 | 20 | 2 | 9,5 | 20 | 0 | 3 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 225 | | / | / | / | 3,5 | 15 | 26 | 1 | 3,5 | 11 | 0 | 2,5 | 3,5 | 0 | 0 | 0 |
| 241 | | 3 | 6 | 8,5 | 4 | 8 | 20 | 1 | 4 | 12 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 |
| 247 | | 3 | 6 | 9 | 4 | 6 | 15 | 2,5 | 3,5 | 10,5 | s | 2 | 3 | 0 | 0 | 1,5 |
| 562 | | 4 | 11 | 14 | 7,5 | 17,5 | 33 | 2 | 9 | 21,5 | 1 | 2,5 | 8,5 | 0 | 1,5 | 3 |
| 2514 | | / | / | / | 6 | 20,5 | 33 | 2,5 | 9 | 20 | 1 | 3,5 | 5,5 | 0 | 0 | 0 |
| 2579 | | 4,5 | 9 | 13,5 | 9,5 | 21 | 35 | 3,5 | 8,5 | 17,5 | 1 | 2 | 5,5 | 0 | 0 | 0 |
| 2781 | | 3,5 | 7,5 | 12,5 | 4 | 9,5 | 20,5 | 1 | 2,5 | 9 | 1 | 2,5 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 2782 | | 1 | 7 | 13 | 3 | 8 | 24 | 0 | 3 | 12 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 2783 | | 5,5 | 10 | 15 | 11 | 23 | 34 | 2 | 9,5 | 16,5 | 1 | 3 | 7 | 0 | 0 | 1,5 |
| 2784 | | 3,5 | 6,5 | 9,5 | 4 | 7 | 10 | 1,5 | 3 | 4 | 0 | 2 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |

Se nadaljuje.

Nadaljevanje - PRILOGA A: velikosti kolonij v milimetrih na goji- u mea z razli nimi koncentracijami NaCl, po enem, dveh in treh tednih inkubacije

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|--|-----|-----|------|-----|------|------|-----|-----|------|---|-----|-----|---|-----|---|
| 2785 | | 4,5 | 7,5 | 12,5 | 4 | 11 | 24 | 2 | 10 | 20 | 0 | 2,5 | 8,9 | 0 | 0 | 1 |
| 2786 | | 3,5 | 7,5 | 8,5 | 3 | 6 | 17 | 1 | 3 | 8,5 | 1 | 2 | 3,5 | 0 | 0,5 | 1 |
| 2787 | | / | / | / | 4 | 8,5 | 20 | 1,5 | 3,5 | 13 | 0 | 1,5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 2788 | | 4,5 | 11 | 14 | 8 | 19 | 32 | 1,5 | 8 | 16 | 1 | 3 | 7 | 0 | 0 | 1 |
| 2683 | | / | / | / | 9 | 29 | 35 | 2,5 | 14 | 20 | 0 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| 2684 | | 5 | 11 | 13 | 9,5 | 24 | 30 | 4 | 13 | 18 | 1 | 3,5 | 5,5 | 0 | 0 | 0 |
| 2685 | | / | / | / | 2,5 | 7 | 11,5 | 1,5 | 3,5 | 5 | 0 | 2,5 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |
| 2686 | | / | / | / | 1,5 | 14,5 | 24 | 1 | 13 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 2687 | | 2 | 16 | 22 | 1,5 | 20 | 26 | 0 | 4 | 8,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2688 | | 4 | 14 | 19 | 8 | 20,5 | 29 | 1,5 | 9,5 | 14,5 | 0 | 1,5 | 2,5 | 0 | 0 | 0 |
| 2689 | | 1 | 12 | 17 | 5 | 21 | 30 | 1 | 7 | 10 | 1 | 2,5 | 3,5 | 0 | 0 | 0 |
| 2690 | | 3,5 | 10 | 14,5 | 6 | 19 | 25 | 2 | 12 | 17,5 | 1 | 2 | 3,5 | 0 | 0 | 0 |

Legenda: / - ni podatka