

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anela KAURIN

**RAZVOJ IN UPORABA NOVIH MIKROSATELITNIH MARKERJEV ZA
ANALIZO GENETSKE VARIABILNOSTI FITOPATOGENIH GLIV RODU**

Verticillium

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anela KAURIN

**RAZVOJ IN UPORABA NOVIH MIKROSATELITNIH MARKERJEV ZA
ANALIZO GENETSKE VARIABILNOSTI FITOPATOGENIH GLIV RODU
*Verticillium***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF NEW MOLECULAR MARKERS FOR
ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN *Verticillium* species**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za agronomijo, na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Po sklepu komisije za dodiplomski študij Oddelka za biotehnologijo z dne 04.04.2011 je bil za mentorja diplomskega dela imenovan doc. dr. Jernej Jakše in za somentorja dr. Sebastjan Radišek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: dr. Sebastjan Radišek
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin

Član: prof. dr. Franci Aco Celar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 13.9.2011

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

Anela Kaurin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 601.4:577.21:575.22:632.4(043.2)
KG	molekularna biologija/biotehnologija/mikrosatelitni markerji/genetska variabilnost/glive/ <i>Verticillium</i>
AV	KAURIN Anela
SA	JAKŠE, Jernej (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	RAZVOJ IN UPORABA NOVIH MIKROSATELITNIH MARKERJEV ZA ANALIZO GENETSKE VARIABILNOSTI FITOPOATOGENIH GLIV RODU <i>Verticillium</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 46, [5] str., 10 pregl., 7 sl., 3 pril., 43 vir.
IJ	sl
JI	sl/ en
AI	Eno najpomembnejših bolezni hmelja predstavlja hmeljeva uvelost, ki jo povzročata glivi <i>Verticillium albo-atrum</i> in <i>Verticillium dahliae</i> , ki spadata med parazite prevodnega sistema hmelja in številnih drugih rastlin. Z namenom pregleda genetske variabilnosti med izolati gliv iz hmelja in ostalimi gostiteljskimi rastlinami smo razvili nove pare začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje izbranih mikrosatelitnih regij. Mikrosateliti so kratki, tandemsko ponovljivi motivi DNA, katerih je enota ponovitve dolga od 2 do 8 bp. Nove mikrosatelitne lokuse smo najprej preizkusili na 16 izbranih vzorcih in nato med njimi izbrali 12 takih, ki so dali najboljše rezultate. Le-te smo nato uporabili za karakterizacija hmeljnih in drugih izolatov gliv vrst <i>V. albo-atrum</i> in <i>V. dahliae</i> ter naredili preizkus medvrstnega pomnoževanja razvitih lokusov pri vrstah <i>V. tricorpus</i> , <i>V. longisporum</i> , <i>V. lecanii</i> , <i>V. nigrescens</i> , <i>V. fungicola</i> in <i>V. nubilum</i> . Mikrosatelitne lokuse smo namnožili s pomočjo PCR tehnike. S statističnimi metodami smo določili 54 alelov pri 12 lokusih, kar predstavlja 4,5 alela na posamezni lokus. Med izbranimi lokusi je bil najbolj polimorfen lokus 1566 z devetimi aleli, najmanj pa lokus 1468 z dvema aleloma. S programom NTSYS, ki na podlagi Diceovih koeficientov podobnosti izdela dendrogram. Ločili smo tri glavne razvejitve: v prvo skupino uvrščamo <i>V. albo-atrum</i> , v drugo <i>V. dahliae</i> in <i>V. longisporum</i> v tretjo pa lucernine izolate <i>V. albo-atrum</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 601.4:577.21:575.22:632.4(043.2)
CX	molecular biology/biotechnology/molecular markers/genetic diversity/ <i>Verticillium</i>
AU	KAURIN Anela
AA	JAKŠE, Jernej (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotehnology
PY	2011
TI	DEVELOPMENT AND APPLICATION OF NEW MOLECULAR MARKERS FOR ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN <i>Verticillium SPECIES</i>
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	XI, 46 [5] p., 10 tab., 7 fig., 3 ann., 43 ref.
LA	sl
AL	sl/ en
AB	<p>Verticillium wilt is one of the most important diseases caused by plant pathogens <i>Verticillium albo-atrum</i> and <i>V. dahliae</i> infecting vascular system of hops and many other plants. In order to examine genetic variability between isolates from hop and other host plants new molecular markers for the amplification of selected microsatellite regions have been developed. Microsatellites are short tandem DNA repeats, with basic unit repeat of 2 to 8 bp. The new markers were first tested on 16 selected fungal samples, and then 12 which gave the best results were chosen. The newly developed and selected markers were used to analyse the genetic diversity of the collections of <i>V. albo-atrum</i> in <i>V. dahliae</i> isolates obtained from hop and other plants. We also made an interspecies amplification test of developed loci within other <i>Verticillium</i> species: <i>V. tricorpus</i>, <i>V. longisporum</i>, <i>V. lecanii</i>, <i>V. nigrescens</i>, <i>V. fungicola</i> in <i>V. nubilum</i>. Amplification of microsatellite loci was achieved by using PCR technique. With the use of statistic methods 54 alleles at 12 loci were identified, representing 4,5 alleles per locus. The most polymorphic locus was locus 1566 with nine alleles and the least polymorphic was locus 1468 with only two alleles. The NTSYS software package was employed to calculate Dice coefficient of similarity, which were used for dendrogram construction. This analysis separate isolates into three well separated groups presenting <i>V. albo-atrum</i>, <i>V. dahliae</i> with <i>V. longisporum</i> and alfalfa isolates of <i>V. albo-atrum</i>.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ROD VERTICILLIUM.....	4
2.1.1 Taksonomija in morfologija	4
2.1.2 Bolezenska znamenja	5
2.1.3 Gostiteljske rastline	6
2.2 MOLEKULARNI MARKERJI	6
2.2.1 Mikrosateliti	6
2.2.1.1 Razvoj in značilnosti mikrosatelitov.....	6
2.2.1.2 Ničti aleli.....	8
2.2.1.3 Homoplazija.....	8
2.2.1.4 Izolacija mikrosatelitnih lokusov	8
2.2.1.5 Vrednotenje mikrosatelitnega polimorfizma	9
2.2.1.6 Uporabnost mikrosatelitov za določanje variabilnosti pri glivah rodu <i>Verticillium</i>	9
2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	10
2.3.1 TAIL začetni oligonukleotidi (fluorescenčno označeni PCR fragmenti)	10
3 METODE IN MATERIALI	12
3.1 ZBIRANJE MATERIALA	12
3.2 IZOLACIJA GLIVNE DNA ZA PCR ANALIZE	15
3.2.1 Nacepljanje izolatov v tekoče gojišče	15

3.2.2	Ekstrakcija genomske DNA.....	15
3.2.3	Merjenje koncentracije DNA	17
3.2.4	Agarozna elektroforeza	17
3.2.5	Določevanje nukleotidnega zaporedja izbranih alelov.....	18
3.3	MIKROSATELITNI MARKERJI.....	20
3.3.1	Razvoj mikrosatelitnih markerjev	20
3.3.2	Izbor in uporaba mikrosatelitnih markerjev za določanje polimorfizma	
	21	
4	REZULTATI	23
4.1	RAZVOJ SPECIFIČNIH MIKROSATELITNIH LOKUSOV	23
4.2	UPORABA MIKROSATELITNIH LOKUSOV ZA KARAKTERIZACIJO	
	IZOLATOV <i>V. albo-atrum</i> IN <i>V. dahliae</i>	24
4.3	KAPILARNA ELEKTROFOREZA.....	27
4.4	ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV	27
4.4.1	Določanje dolžin alelov in nukleotidno zaporedje	27
4.4.2	Analiza dvanajstih izbranih lokusov	29
4.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	31
4.5.1	Program identity	31
4.5.2	Program NTSYS	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1	IZOLACIJA GLIVNE DNA ZA PCR ANALIZE	37
5.2	ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV	38
6	POVZETEK.....	41
VIRI		
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam izolatov gliv uporabljenih v raziskavi.....	12
Preglednica 2: Prikaz potrebnih reagentov za PCR reacijo	21
Preglednica 3: Rezultati iskanja mikrosatelitov	23
Preglednica 4: Prikaz števila ponovitev za posamezno velikost motiva	23
Preglednica 5: Seznam vseh 60-ih lokusov preizkušenih na 16-ih izolatih s številom alelov na lokus.....	24
Preglednica 6: Seznam 16-ih izolatih uporabljenih v pred-testiranju.....	25
Preglednica 7: Seznam izbranih lokusov uporabljenih za genotipizacijo izolatov iz gliv rodu <i>Verticillium</i> , oznaka fragmenta pred številko označuje uporabljeno fluorescentno oznako začetnega oligonukleotida TAIL.....	26
Preglednica 8: Izbranih 12 lokusov	27
Preglednica 9: Prikaz alelov za posamezen lokus razčlenjeno po posameznih vrstah glive	32
Preglednica 10: Število alelov na lokus pri posameznih vrstah oz. skupinah analiziranih gliv rodu <i>Verticillium</i>	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Mikrosklerocij (levo) (<i>Verticillium</i> sp., 2011) in tosonosec (desno) (Radišek, 2001)	4
Slika 2: Verticilijska uvelost na hmelju: levo prevodno tkivo okužene in desno zdrave trte (<i>Verticillium albo-atrum</i> ..., 2007).....	5
Slika 3: Vezava TAIL začetnega oligonukleotida: prikaz uporabe fluorescentnih začetnih oligonukleotidov z M13 (-21) sekvenco v PCR (Schuelke, 2000).....	11
Slika 4: Primer vzorcev na agaroznem gelu	18
Slika 5: Standard LIZ 600 s fragmenti od 20 do 600 bp	28
Slika 6: Prikaz štirih lokusov označenih z različnimi fluorescentnimi barvil v programu Genemapper. Na sliki je izolat iz lucerne (Luc) <i>V. albo-atrum</i> na lokusih 598 (FAM – moder), 959 (VIC-zelen), 228 (NED – črn) in 1004 (PET – rdeč)	28
Slika 7: Dendrogram 86-ih izolatov gliv rodu <i>Verticillium</i> na osnovi koeficiente podobnosti	36

KAZALO PRILOG

PRILOG A: Pregled alelov za posamezen lokus

PRILOGA B: Binarna mtrika prisotnosti oz. odsotnosti določenega alela – vhodna tabela za program NTSYS

PRILOGA C: Poravnavo zaporedij mikrosatelitnih lokusov 1566 in 1706

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Alel	alternativna oblika gena oz. DNA zaporedja na določenem mestu v kromosomu
bp	bazni par
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi nukleotid trifosfat
EDTA	etylendiamin tetraacetna kislina
EtBr	etidijev bromid
Genetski markerji	Izbrani deli DNA, katerih dedovanje lahko sledimo
KI	kloroform-izoamilalkohol
Lokus	mesto markerja v molekuli DNA
MgCl ₂	magnezijev klorid
NaCl	natrijev klorid
PCR	(ang. the polymerase chain reaction) verižna reakcija s polimerazo
Primer 1	začetni oligonukleotid 1
Primer 2	začetni oligonukleotid 2
Primer TAIL	začetni oligonukleotid z zaporedjem M13 (-21)
SSR	(ang. Simple Sequence Repeats), drugo ime za mikrosatelitni marker
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-boratni-EDTA elektroforetski pufer
Tris	tris hidroksimetil aminometan

SLOVARČEK

Genotipizacija	Proces ugotavljanja genotipa posameznika, pri katerem se lahko ugotavlja genotip enega ali pa večih genov.
Verticilijska uvelost hmelja	Bolezen, ki jo povzročata talni glivi <i>Verticillium albo-atrum</i> in <i>V. dahliae</i> na hmelju. Izrazi se v obliki venenja in odmiranja rastlin.
Konidiofor	Je trosonosec. Tanka in dolga pokončna hifa, na kateri se razvijejo konidiji (trosi).
Konidij	Nespolen, haploiden tros, značilen za nekatere vrste gliv. Oblikujejo se na vrhu konidiofora.
Marker	Znano zaporedje nukleotidov na DNK, ki se na kromosomu nahaja tako blizu nekega gena, da se marker in gen dedujeta skupaj. Marker se uporablja za sledenje določenemu genu.
Micelij	Vegetativni del glice, ki ga sestavlja splet hif.
Mikrosatelit	So kratki, tandemsko ponovljivih motivov DNA, ki so prisotni pri večini organizmov.
Ničti alel	Določeni aleli se zaradi nukleotidnih substitucij, insercij in delecij na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov ne pomnožujejo.
PCR	Verižna reakcija s polimerazo, znana tudi pod angleško kratico PCR (Polymerase Chain Reaction), je metoda, ki omogoča kopiranje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze.
Polimorfizem	Prisotnost dveh ali več različnih alelov enega gena v populaciji. Posledica tega je prisotnost več različnih fenotipov.
TAIL začetni oligonukleotidi	Začetni oligonukleotid označen s fluorescenčno molekulo.
Začetni oligonukleotid	Oligonukleotid je krajša veriga DNA ali RNA oziroma oligomer iz nukleotidnih enot – običajno do 20 nukleotidov. Oligonukleotidni začetniki, se uporabljajo pri verižni reakciji s polimerazo in omogočijo začetek sinteze komplementarne verige.

1 UVOD

V rodu *Verticillium* najdemo širok spekter gliv, ki lahko parazitirajo rastline, žuželke, nematode, ostale gliche ali pa živijo kot talni saprofiti (Hastie in Heale, 1984).

Skupina rastlinskih patogenov v rodu *Verticillium* vključuje 6 vrst gliv; *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* in *V. theobromae*, od katerih prvi dve povzročata veliko gospodarsko škodo v kmetijstvu. Ostale vrste spadajo med manj pomembne patogene, ki le redko povzročijo bolezni. Glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* spadata med talne gliche in imata traheomikozni način parazitizma. Prevodno tkivo rastline kolonizirata preko koreninskega sistema ter povzročita uvelost in v večini primerov njen propad. Razširjeni sta predvsem v zmernem zemeljskem pasu in imata izredno širok spekter gostiteljskih rastlin med dvokaličnicami, ki zajema več kot 300 rastlinskih vrst iz 43 družin (Pegg in Brady, 2002).

Glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* na hmelju povzročata bolezen, ki jo imenujemo verticilijska uvelost hmelja in pri tem izzoveta blago ali letalno obliko obolenja. Katera oblika se bo razvila je odvisno od patotipa glive, občutljivosti kultivarja in ekoloških razmer. Leta 1974 je bila v Sloveniji prvič identificirana blaga oblika hmeljeve uvelosti kot posledica okužb z glivama *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Leta 1997 pa se je bolezen pojavila v letalni obliku (Radišek in sod., 2003). Bolezen predstavlja omejujoč dejavnik hmeljarske pridelave, saj še vedno ne poznamo ustrezne fitofarmacevtskega pripravka za preprečevanje ali zdravljenje obolelih rastlin (Radišek, 2004).

Genetsko variabilnost lahko preučujemo z uporabo klasičnih in molekularnih tehnik. Klasična diagnostika temelji na morfoloških lastnostih, uporabi selektivnih gojišč, testih patogenosti, analizah vegetativne kompatibilnosti in razlikah v biokemičnih lastnostih. Uporaba teh metod ima pomembne pomanjkljivosti, saj so večinoma delovno zahtevne, dolgotrajne in podvržene vplivom okolja, kar otežuje zanesljivost identifikacije. Z molekularnimi metodami neposredno analiziramo genom proučevanega organizma. Prednost tovrstne identifikacije je neodvisnost od zgoraj omenjenih dejavnikov. Molekularne tehnike lahko uporabimo v diagnostiki za analiziranje specifičnih DNA in RNA sekvenč organizmov ter za vrednotenje polimorfizma med organizmi. To nam omogoča merjenje genetske variabilnosti, populacijske študije in določanje filogenetskih povezav. V ta namen so bili razviti različni molekularni markerji (RFLP - restriction fragment length polymorphism, SSR - simple sequence repeat, RAPD - random amplification of polymorphic dna, SCAR - sequence characterized amplified region, AFLP - amplified fragment length polymorphism) (Radišek, 2004).

Mikrosatelitna zaporedja so lahko zelo variabilna tako znotraj vrst, kot med vrstami. Do polimorfizma med posamezniki prihaja večinoma zaradi sprememb v številu ponovitev osnovnega motiva (Eisen, 1999). Velika variabilnost mikrosatelitov je povezana tudi z dejstvom, da je v genomu evkariontov naključno razporejenih od 10^4 do 10^5 mikrosatelitskih lokusov. Veliko število mikrosatelitskih lokusov pomeni veliko število potencialnih polimorfnih mest, ki jih lahko uporabimo za genetske markerje. Zaradi visoke mutacijske stopnje predstavljajo mikrosateliti visoko informativne molekulske markerje z največjo stopnjo polimorfizma. Odkrivanje mikrosatelitskega polimorfizma s PCR tehniko namnoževanja je hitro, nezahtevno in učinkovito že pri zelo majhni količini DNA (Štajner, 2010).

Mikrosateliti se uporabljajo v genetskih raziskavah za študije raznolikosti, filogenetske analize sorodnosti, izdelavo genetskih kart, za identifikacijo klonov, za genotipizacijo, itd. Vsestranska uporabnost mikrosatelitov je možna zaradi visoke pogostosti pojavljanja v evkariontskih genomih, kodominantnosti, hipervariabilnosti, robustnosti in visoke informativnosti (Bandelj, 2006).

Namen predstavljene naloge je bil:

- analiza 94-ih izolatov glive rodu *Verticillium* iz kolekcije gliv Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu,
- karakterizacija genomskega zaporedja glive *V. albo-atrum* na prisotnost različnih tipov mikrosatelitov,
- razviti nove pare začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje izbranih mikrosatelitnih regij in optimizacija pomnoževanja v PCR,
- karakterizacija večjega števila izolatov vrst *V. albo-atrum* in *V. dahliae* z novimi markerji s poudarkom na izolatih iz hmelja kot gostiteljske rastline,
- preizkus medvrstnega pomnoževanja razvitih lokusov pri vrstah *V. tricorpus*, *V. longisporium*, *V. lecanii*, *V. nigrescens*, *V. fungicola* in *V. nubilum*,
- statistično ovrednotiti genetsko variabilnost analiziranih vzorcev.

Hipoteza – v raziskavi predpostavimo, da:

- bomo s preiskovanjem genoma lahko potrdili obstoj mikrosatelitnih zaporedij v genomu glive *V. albo-atrum*, ki nam bodo služili za razvoj novih markerjev
- da bomo uspešno ocenili nivo genetske variabilnosti glive in
- da bomo potrdili ali zavrgli zmožnost uporabe markerjev razvitih na osnovi vrste *V. albo-atrum* pri drugih vrstah istega rodu.

Naloga zajema:

- zbiranje in precepljanje različnih izolatov glive rodu *Verticillium*,
- izolacijo glivne genomske DNA iz 94 izolatov,
- izdelavo začetnih oligonukleotidov s programskimi orodji,
- optimizacijo PCR in fluorescentno analizo mikrosatelitnih markerjev in
- preizkus specifičnosti razvitih začetnih oligonukleotidov na različnih izolatih gliv rodu *Verticillium* z uporabo različnih statističnih orodij.

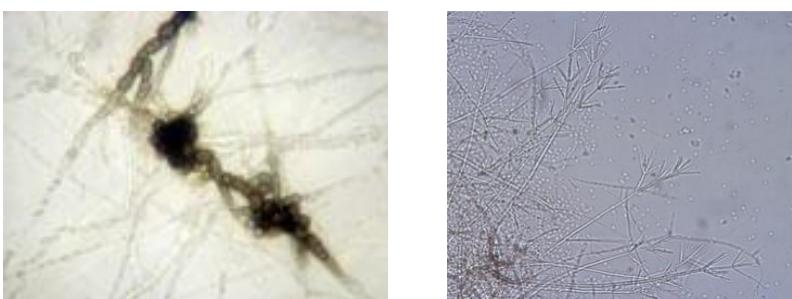
2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD VERTICILLIUM

2.1.1 Taksonomija in morfologija

Rod *Verticillium* je prvi opisal leta 1816 nemški mikolog Nees von Esenbeck. Ime *Verticillium* je izpeljanka iz latinske besede *verticillus*, kar v prevodu pomeni vretenec. Dokončna potrditev rodu *Verticillium* sovpada s prvim opisom glive *V. albo-atrum*, ki sta jo leta 1879 izolirala nemška znanstvenika Reinke in Berthod iz uvelikih rastlin krompirja. Sledil je opis vrste *V. dahliae*, ki jo je Klebahn leta 1913 izoliral iz obolelih dalij (Klosterman in sod., 2009). Rod *Verticillium*, ki ga je leta 1973 opisal Ainsworth uvrščamo v poddebelo Deuteromycotina, razred Hyphomycetes, red Hyphomycetales in družino Moniliaceae (cit. po Radišek, 2001).

Glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* sta predstavnici gliv, za katere so značilni vretenasto razvejani trosonosci (konidiofori) s fialidami. Na njih so sluzaste sferične glave, v katerih se nahajajo konidiji ali trosi (Heale, 2000). Glivi tvorita bel puhat micelij sestavljen iz hialinih ali steklasto obarvanih hif na katerih nastajajo vretenasti konidiofori značilni za rod *Verticillium*. Najlažje ju ločimo po trajnih organih, s katerimi preživita neugodne pogoje. *V. dahliae* tvori melanizirane mikrosklerocije, ki izhajajo iz ene hife z deljenjem in večanjem globularnih celic. Medtem ko ima *V. albo-atrum* temno rjav do črn trajni micelij, sestavljen iz melaniziranih in nabreklih hif (Klosterman in sod., 2009).



Slika 1: Mikrosklerocij (levo) (*Verticillium* sp., 2011) in tosonosec (desno) (Radišek, 2001)

Posebno vrsto seva *V. dahliae* je leta 1961 opisal Stark kot vrsto, ki tvori mikrosklerocije, vendar ima daljše konidije in jo poimenoval *V. dahliae* var. *longisporum*. Krapapa in sod. so leta 1997 sev uvrstili kot novo vrsto, *V. longisporum*. Sledila je domneva, da je nova vrsta hibrid med *V. dahliae* in *V. albo-atrum*, ki okužuje lucerno (Klosterman in sod., 2009). Leta 2011 so Interbitzin in sod. s filogenetsko analizo dokazali, da je *V.*

longisporium diploidni hibrid, ki izhaja iz treh različnih starševskih vrst, izmed katerih je ena *V. dahliae*.

2.1.2 Bolezenska znamenja

Pri večini gostiteljskih rastlin se pojavi: izguba turgorja in s tem venenje v spodnjem delu rastline, nazadovanje v rasti, pojav kloroze in nekroze listov in nastanek rjavega prevodnega tkiva. Pojav bolezenskih znamenj in razvoj bolezni je odvisen od interakcij med gostiteljsko rastlino, patogenom in okoljskimi dejavniki, kjer igra pomembno vlogo temperatura (Pegg in Brady, 2002). Na hmelju se bolezen pojavlja v blagi ali letalni obliki, odvisno od virulence povzročitelja, občutljivosti kultivarja in ekoloških razmer, kjer sta najbolj pomembni nizka temperatura tal in gnojenje z dušikovimi gnojili (Radišek in sod., 2003). Največ bolezenskih izbruhov povzroča gliva *V. albo-atrum*, ki lahko inducira obe oblike obolenja, medtem ko se *V. dahliae* pojavlja samo v povezavi z blažjo obliko hmeljeve uvelosti (Burgess, 1964). Samo ime bolezni, hmeljeva uvelost pove, da glivi povzročata venenje in s tem povezano odmiranje rastlin, saj parazitirata prevodni sistem rastlin. Rastlina se kot odgovor na okužbo, brani s tvorbo novega prevodnega tkiva (hiperplazijo), kar opazimo kot nenormalno odebujene trte (Radišek, 2001).



Slika 2: Verticilijska uvelost na hmelju: levo prevodno tkivo okužene in desno zdrave trte (*Verticillium albo-atrum* ..., 2007)

2.1.3 Gostiteljske rastline

Obe glivi sta zelo razširjeni po svetu. *Verticillium dahliae* prevladuje v subtropskih in tropskih klimatih, medtem ko se *V. albo-atrum* prevladuje v zmernem pasu, kjer povprečna dnevna temperatura ne presega 24 °C. Glivi imata širok spekter gostiteljskih rastlin med dvokaličnicami. Od gojenih rastlin *V. albo-atrum* najbolj ogroža hmelj, lucerno, krompir, kumare in paradižnik. *V. dahliae* pa povzroča uvelost na bombažu, jajčevcu, krompirju, papriki, jagodah, paradižniku, meti in na nekaterih lesnatih rastlinah (Heale, 2000).

2.2 MOLEKULARNI MARKERJI

Do razvoja molekularnih markerjev so raziskave genskih virov temeljile na uporabi klasičnih metod z opisovanjem morfoloških markerjev. Fenotipsko vrednotenje je metodološko zapleteno, odvisno od okoljskih dejavnikov, kar omejuje njihovo uporabo v genetskih študijah. Razvoj številnih DNA markerjev je omogočil revolucionaren pristop pri preučevanju genetske raznolikosti in strukture genoma (Bandelj, 2006).

V zadnjih letih so se uveljavile različne tehnike za karakterizacijo kultivarjev, od izoencimskih analiz do analiz na nivoju DNA (RFLP, RAPD, AFLP, SCAR in SSR markerji). Najbolj so se uveljavili mikrosateliti, ki kažejo največjo informacijsko vrednost polimorfizma in so večinoma zelo variabilni (Štajner, 2010).

2.2.1 Mikrosateliti

2.2.1.1 Razvoj in značilnosti mikrosatelitov

Mikrosateliti z mononukleotidnim polimorfizmom predstavljajo močno orodje za populacijske študije (Taylor in sod., 1999, cit. po Cooke in Lees, 2004). Mikrosateliti so enolokusni, kodominantni, visoko variabilni in reproducibilni markerji, ki jih z lahkoto sledimo (Cooke in Lees, 2004).

Termin mikrosatelit je v začetku označeval samo ponovitve dinukleotidnega motiva CA/GT (Weber in May, 1989). Ostala ponovljiva zaporedja so bila poimenovana z različnimi imeni kot npr. SSRs (short sequence repeats - enostavna zaporedja), STRs (short tandem repeats - kratke tandemske ponovitve), SSLPs (simple sequence lenght polymorphism – polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij) in VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats - spremenljivo število tandemskih ponovitev, označuje variabilnost v dolžini ponovitev med posamezniki na enem lokusu) (Bandelj, 2006).

Številni mikrosateliti so zelo variabilni tako znotraj vrst, kot med vrstami. Dolžinska variabilnost mikrosatelitov je posledica sprememb in različnega števila repetitivnih enot (Štajner in sod., 2004). Sestavljeni so iz kratkih, tandemsko ponovljivih motivov DNA, ki so prisotni pri večini organizmov. Satelitno DNA so odkrili pri ultracentrifugiranju DNA v gradientnem mediju, ko se je le ta porazdelila v več plasti. Prva plast je vsebovala gensko DNA, drugo pa so poimenovali satelitna plast (Bandelj, 2006). Glede na dolžine ponovitve so ta zaporedja razdeljena v tri razrede: na satelite (enota ponovitve dolga nekaj tisoč baznih parov), minisatelite (enota ponovitve daljša od 10 bp) in mikrosatelite (enota ponovitve dolga od 2-8 bp) (Armour in sod., 1999).

Mikrosatelite največkrat delimo na popolne, nepopolne, prekinjene in sestavljene. Popolni so sestavljeni samo iz enega motiva osnovne ponovitve, ki se ponavlja brez prekinitve (npr. CTCTCTCTCTCTCTCTCTCT), nepopolni pa iz ene ali več ponovitev, ki vsebuje bazo, ki ne odgovarja osnovnemu motivu ponovitve (npr. CTCTCTCTGTCTCTCT). Prekinjeni mikrosateliti vsebujejo krajšo insercijo baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnim motivom ponovitve (npr. CTCTCTCTGGGCTCTCT). Sestavljeni mikrosateliti vključujejo dva ali več mikrosatelitov, ki pa se med seboj razlikujejo po tipu ali motivu ponovitve (npr. CTCTCTCTCTGATGATGATGAT) (Štajner, 2010).

Mikrosateli se tvorijo iz regij kjer so različni motivi enostavnih, ponavljačih se DNA zaporedij prisotni v večji meri (Tautz in sod., 1986). Do variabilnosti pri mikrosatelitih v večini primerov pride zaradi zdrsa DNA polimeraze in posledično nepravilnega parjenja med replikacijo (Levinson in Gutman, 1987, cit. po Štajner, 2010) in neučinkovitega DNA replikacijskega popravljalnega mehanizma (Strand in sod., 1993). Z *in vitro* raziskavami je bilo dokazano, da je takšen zdrs DNA polimeraze zelo pogost pojav (Schlötterer in Tautz, 1992), vendar pa se je izkazalo, da je mutacijska stopnja mikrosatelitov v *in vitro* pogojih veliko večja od dejanske mutacije *in vivo*. Vzrok temu je *in vivo* delovanje replikacijskega popravljalnega mehanizma (Schlötterer, 2000).

Nastanek novega mikrosatelita je posledica kombinacije dveh mutacij. Pri prvi mutaciji se mikrosatелit začne razvijati (nastanejo dovolj dolge ponovitve). Drugo mutacijo povzroči nepravilno parjenje zaradi zdrsa DNA polimeraze (pride do dolžinskega polimorfizma). Propad mikrosatelita je prav tako povezan s kombinacijo dveh mutacij. Prva mutacija prekine popoln mikrosatelite (prepreči nepravilno parjenje zdrsnjene viačnice, stabilizira ponovitev), pri drugi pa pride do delecije večjega odseka ponovitve. Končen rezultat je neprepoznavna homologno zaporedje DNA, ki vsebuje le majhen del motiva osnovne ponovitve. Takšen proces imenujemo 'smrt' mikrosatelita (Taylor in sod., 1999).

Mikrosateli se nahajajo predvsem v evkariontskih genomih. Dinukleotidne ponovitve se nahajajo v nekodirajočih regijah DNA, nekatere trinukleotidne pa tudi v kodirajočih. Zelo

nizko frekvenco mikrosatelitov so odkrili tudi v organelih. Dokazano je bilo tudi, da se mikrosateliti sestavni del kodirajoče DNA ali regulatornih elementov, saj so jih našli v zgornjih promotorskih področjih (Jakše, 2000).

2.2.1.2 Ničti aleli

V obrobnih regijah mikrosatelitskih lokusov pogosto nastajajo mutacije (Orti in sod., 1997, cit. po Štajner, 2010), zaradi česar lahko pride do nastanka ničnih alelov. Lažna smrt mikrosatelita se lahko pojavi kadarkoli in je posledica nukleotidnih substitucij, insercij in delecij, ki nastanejo v obrobnih regijah. To je razlog, da začetni oligonukleotidi ne prepoznaajo mest prileganja (Callan in sod., 1993).

2.2.1.3 Homoplazija

Mikrosateliti so običajno različno dolgi, vendar obstajajo tudi aleli enake dolžine, ki so strukturno in evolucijsko popolnoma različni. Ker variabilnost mikrosatelitov običajno vrednotimo na osnovi elektroforetskih profilov PCR produktov (glede na dolžino) lahko takšen pojav, imenovan dolžinska homoplazija, privede do napačne interpretiranje rezultatov. Na genskem nivoju rečemo, da med dvema aleloma obstaja homoplazija, če sta identična po svoji pojavnih oblikih (dolžini), ne pa tudi po izvoru (Estoup in sod., 1999).

2.2.1.4 Izolacija mikrosatelitnih lokusov

Mikrosatelitna zaporedja lahko izoliramo iz preiskovanega organizma na dva načina. Prvi način - laboratorijska izolacija zajema uporabo sodobnih molekularnih metod kot so izdelava genomske knjižnic, Southern pregled knjižnic, določevanje nukleotidnega zaporedja klonov in izdelavo specifičnih parov začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje v PCR. V začetku so mikrosatelite izolirali s pregledom velikega števila klonov genomske knjižnice. Novejše tehnike obogativitve genomske knjižnice pa temeljijo na povečanju deleža DNA fragmentov z mikrosatelitskimi ponovitvami (Jakše in Javornik 2001). Na osnovi obogativnega postopka izolacije mikrosatelitov je mogoče dobiti tudi do 40-krat več uporabnih začetnih oligonukleotidov za namnoževanje mikrosatelitov (Brondani in sod., 1998). S pomočjo sekvenciranja lahko določimo nukleotidno zaporedje obrobne regije mikrosatelita in izdelamo lokusno specifične začetne oligonukleotide. Na osnovi komplementarnosti med začetnimi oligonukleotidi in mikrosatelitskimi obrobnimi regijami lahko v procesu PCR pri osebkih namnožujemo produkte različnih dolžin (Štajner, 2010). Pri drugem načinu pa lahko uporabimo že določena zaporedja DNA našega organizma in jih pregledamo na prisotnost mikrosatelitov ter uporabimo pri izdelavi parov začetnih oligonukleotidov. Ta drugi pristop smo uporabili tudi mi.

2.2.1.5 Vrednotenje mikrosatelitnega polimorfizma

Metode za vizualizacijo in vrednotenje PCR produktov so se v zadnjih 20 letih zelo izboljšale. Najprej se je uporabljala detekcija namnoženih fragmentov s pomočjo radioaktivno označenih oligonukleotidnih začetnikov in barvanje PCR produktov s srebrom ali etidijevim bromidom ter ročno vrednotenje dobljenih fragmentov. Kasneje so se začeli uporabljeni fluorescenčno označeni začetni oligonukleotidi, fragmente oz. namnožene alele pa je bilo možno vrednotiti avtomatsko, s pomočjo priloženih programskih aplikacij. PCR vzorce mikrosatelitskih lokusov lahko ločujemo v poliakrilamidnem denaturacijskem gelu na različnih sekvenčnih napravah (npr. ABI sekvenator - Applied Biosystems). Zaradi različnih sistemov elektroforeze prihaja do razlik med dolžinami detektiranih alelov. Če želimo dobljene rezultate primerjati med različnimi laboratoriji, jih je potrebno standardizirati (This in sod., 2004). Za natančno določanje dolžine mikrosatelitskih alelov uporabimo dolžinski (eksterni) standard, notranje (interne) standarde, pa uporabimo za poravnavo fragmentov enake dolžine, saj med elektroforezo pride do odklona potovanja v različnih delih gela (Štajner, 2010).

2.2.1.6 Uporabnost mikrosatelitov za določanje variabilnosti pri glivah rodu *Verticillium*

V dosedanjih študija so bili za detekcijo variabilnosti izolatov znotraj *V. dahliae* razviti številni molekularni markerji, med katerimi v zadnjem času prevladujejo mikrosatelitne sekvence. Deset mikrosatelitnih markerjev je bilo izoliranih in razvitih iz amfihaploidnega izolata *V. dahliae* z uporabo genomske knjižnice, obogatene za (AGT)_n, (GAC)_n, (GCC)_n, (TAC)_n in (TTA)_n repetitivne mikrosatelitne ponovitve (Barbara in sod. 2005). Za določanje genetske variabilnosti izolatov iz artičoke in nekaterih drugih okuženih rastlin v Španiji, so bili med drugim razviti tudi mikrosatelini markerji (Berbegal in sod., 2009). Berbegal in sodelavci so leta 2011 za analizo genetske raznolikosti patogene glive *V. dahliae* razvili nove mikrosatelitne markerje z uporabo zaporedij iz genomske knjižnice obogatene z mikrosateliti. Glavni namen raziskave je bil razviti visoko polimorfne in lahko sledljive molekulske markerje za uporabo pri določanju genetske variabilnosti in populacijske strukture *V. dahliae*. Omenjene markerje so uporabili za identifikacijo genetske raznolikosti med izolati iz dveh različnih gostiteljskih rastlin, artičoke in krompirja. Mikrosatelitni markerji so bili uporabljeni tudi pri določanju genetskih faktorjev, kot so rekombinacija, genski tok, genetski zdrs itd. (Almany in sod., 2009, cit. po Atallah, 2010). V MER podatkovni bazi (Molecular Ecology Resources Database) je objavljenih 22 mikrosatelitnih začetnih oligonukleotidov izoliranih iz *V. dahliae* (Atallah, Maruthachalam, Davis, Klosterman, Subbarao), ki so bili testirani tudi z *V. albo-atrum*.

2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) dopolnjuje kloniranje DNA in omogoča enake rezultate v veliko krajšem času (do nekaj ur). Metoda PCR kloniranja ne more povsem nadomestiti, saj ima nekatere omejitve. Najpomembnejša omejitev je, da moramo poznati obrobne regije dela fragmenta, ki ga želimo pomnožiti. Kljub tej pomanjkljivosti je metoda PCR nepogrešljiva na veliko raziskovalnih področij molekularne biologije. Pri reakciji PCR poteka kopiranje z uporabo termostabilne DNA-polimeraze iz mikroorganizma *Thermis aquaticus*. Da reakcija PCR lahko poteče, je potrebno tarčni DNA dodati Taq DNA-polimerazo, par začetnih oligonukleotidov (primerjev), deoksinukleotide (dNTP), PCR pufer in MgCl₂ kot kofaktor. Količino uporabljene DNA je lahko zelo nizka, saj je reakcija PCR zelo občutljiva metoda. Začetni oligonukleotidi z znanim zaporedjem so potrebni za začetek sinteze DNA, ki poteče s pomočjo Taq-polimeraze. Začetni oligonukleotidi se morajo pritrdati na obe strani DNA-segmenta, ki bo kopiran.

Faze PCR reakcije:

- denaturacija: začetek reakcije s segrevanjem reakcijske mešanice na 94 °C. Pri tej temperaturi se vodikove vezi v dvojni vijačnici prekinejo;
- prileganje začetnih oligonukleotidov: temperaturo spustimo na 50-65 °C, kar omogoča, da se začetna oligonukleotida vežeta na komplementarna mesta DNA-fragmenta;
- podaljševanje: začetek sinteze DNA, temperatura se dvigne na 72 °C (optimum za delovanje Taq-polimeraze). Ta začetna stopnja reakcije PCR pokaže rezultate v seriji produktov, ki se sintetizirajo iz obeh enovijačnih DNA verig.

S ponavljanjem denaturacije in sinteze delujejo produkti reakcije kot šablona za nadaljno sintezo DNA. V naslednjih ciklih poteka namnoževanje DNA fragmentov eksponentno, dokler ne zmanjka ene izmed komponent, potrebne za to reakcijo (Brown, 2007).

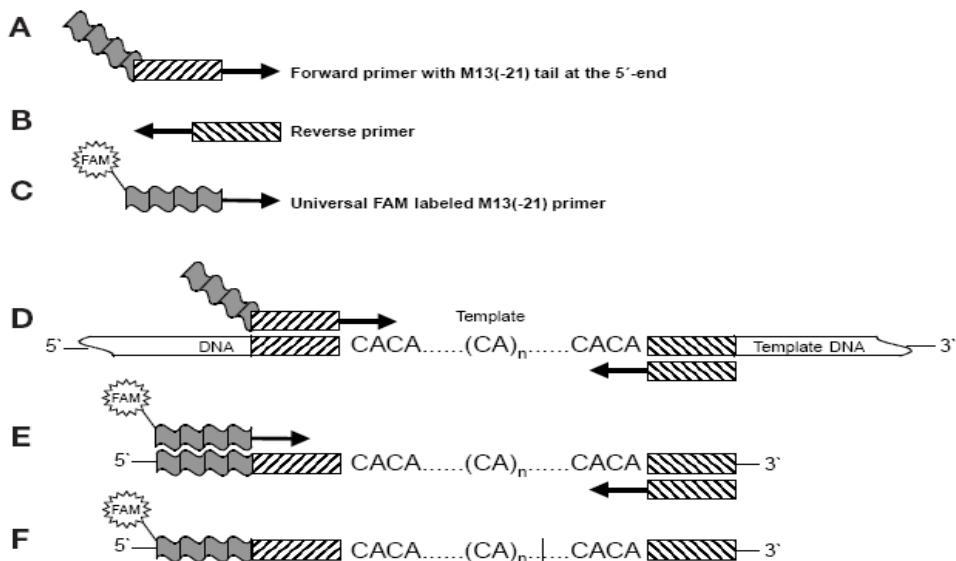
2.3.1 TAIL začetni oligonukleotidi (fluorescenčno označeni PCR fragmenti)

Genotipizacijo z mikrosatelitnimi markerji sta prvič opisala Litt in Luty (1989). Za genotipizacijo večinoma uporabljamo PCR reakcijo z definiranimi oligonukleotidnimi začetniki. Za analizo dolžin PCR produktov z elektroforezo in laserskim detekcijskim sistemom mora biti eden izmed začetnih oligonukleotidov označen s fluorescenčno značko. Glavni namen razvoja fluorescenčnih TAIL začetnih oligonukleotidov je bolj ekonomičen postopek analize saj potrebujemo samo en označen oligonukleotid za vse lokuse, ki jih

pomnožujemo. Krajši oligonukleotid od lokusno specifičnega para podaljšamo za univerzalno zaporedje, ki ga uporabljamo.

Zaporedje za M-13 (-21) univerzalni začetni oligonukleotid je sledeče: 5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-3'.

V mešanico za PCR dodamo poleg lokusno specifičnega para začetnih oligonukleotidov TAIL začetni oligonukleotid označen s fluorescenčno molekulo. V procesu sinteze pride v prvem ciklu do vezave forward začetnega oligonukleotida na PCR produkt, kasneje se na del reverse začetnega oligonukleotida veže TAIL začetni oligonukleotid, kot kaže spodnja slika (Schuelke, 2000).



Slika 3: Vezava TAIL začetnega oligonukleotida: prikaz uporabe fluorescentnih začetnih oligonukleotidov z M13 (-21) sekvenco v PCR (Schuelke, 2000)

Uporabili smo štiri različne TAIL oligonukleotidne začetnike označene s fluorescenčnimi barvili (Applied Biosystems), ki se komercialno imenujejo 6-FAM, VIC, NED in PET. Vsako od teh štirih barvil oddaja fluorescenco pri različni valovni dolžini. Najkrajšo valovno dolžino odda FAM (modra barva), sledijo VIC (zelena), NED (rumena), PET (rdeča) in standard LIZ 600 (oranžna). Na ta način je omogočeno ločevanje vseh štirih barvil naenkrat in posledično lahko analiziramo kombinacijo štirih lokusov v eni analizi, kar še dodatno zniža stroške.

3 METODE IN MATERIALI

3.1 ZBIRANJE MATERIALA

V raziskavo smo zajeli izolate gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, ki smo jih analizirali z novimi markerji. Izolati so bili izolirani iz obolelega hmelja na območjih Slovenije, Nemčije, Anglije, Poljske in Belgije. V raziskavo smo vključili tudi izolate iz drugih obolelih rastlinskih vrst, prikazanih v preglednici 1. Za preizkus medvrstnega pomnoževanja razvitih lokusov smo za raziskavo uporabili še izolate iz *Verticillium lecanii*, *Verticillium longisporum*, *Verticillium fungicola*, *Verticillium nubilum*, *Verticillium tricorpus* in *Verticillium nigrescens*. Večino izolatov smo pridobili iz Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu.

Preglednica 1: Seznam izolatov gliv uporabljenih v raziskavi

Kultura	Oznaka	Virulanca	Gostitelj	Izvor
<i>V.albo atrum</i>	P10	Letalen	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	P114/1	Letalen	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	P34/1	Letalen	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	P15	Letalen	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	P55	Blag	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	P83	Blag	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	6/99	Blag	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	14/93	Blag	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	15/98	Blag	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	P84/2	Blag	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	16/00	Blag	hmelj	Nemčija
<i>V.albo atrum</i>	TABOR2	Letalen	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	TABOR 6	Letalen	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	Ciz (Dedec)	Letalen	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	BIZ	Letalen	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	VranBis09	Letalen	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	Sent4	Letalen	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	MO 3	Blag	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	OrCer	Blag	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	Zupanc	Blag	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	Rec91	Blag	hmelj	Slovenija

Se nadaljuje

Nadaljevanje

<i>V.albo atrum</i>	KRES 98	Blag	hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	Ledina09		hmelj	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	1985a	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11041	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11055	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11047	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11097	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11100	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	1974	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	298099	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	298100	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	298101	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	298102	Letalen	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11052	Blag	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	1953	Blag	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	298092	Blag	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	298095	Blag	hmelj	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	Sol	Blag	hmelj	Poljska
<i>V.albo atrum</i>	CBS 393.91	Blag	hmelj	Belgija
<i>V.albo atrum</i>	kum		kumare	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	Surf		surfinija	Slovenija
<i>V.albo atrum</i>	11077		rogovilček	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11081		krizantema	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	CBS 102.464		artičoka	Italija
<i>V.albo atrum</i>	CBS 241.82		katalpa	Italija
<i>V.albo atrum</i>	CBS 454.51		krompir	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	11066		krompir	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	T 179	Avirulenten	paradižnik	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	CBS 321.91		paradižnik	Nizozemska
<i>V.albo atrum</i>	AR01/067	Virulenten	paradižnik	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	AR0/140	Virulenten	paradižnik	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	AR01/JS1		paradižnik	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	PD 83/53a		paradižnik	Nizozemska
<i>V.albo atrum</i>	PD 2000/4186a		paradižnik	Nizozemska
<i>V.albo atrum</i>	11		lucerna	Kanada
<i>V.albo atrum</i>	41		lucerna	Kanada

Se nadaljuje

Nadaljevanje

<i>V.albo atrum</i>	Luc	Virulenten	lucerna	Anglija
<i>V.albo atrum</i>	CBS 392.91		lucerna	Nizozemska
<i>V.albo atrum</i>	107		lucerna	USA
<i>V.albo atrum</i>	314193		krompir	Avstralija
<i>V.albo atrum</i>	340646		krompir	Španija
<i>V.albo atrum</i>	PD693		krompir	Iran
<i>V.dahliae</i>	JKG 2		katalpa	Nizozemska
<i>V.dahliae</i>	JKG1		krompir	Nizozemska
<i>V.dahliae</i>	JKG 8		krompir	Nizozemska
<i>V.dahliae</i>	DJK		krizantema	Nizozemska
<i>V.dahliae</i>	MAI		krizantema	Nizozemska
<i>V.dahliae</i>	GAJ09		hmelj	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	PDRENU		hmelj	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	CasD		hmelj	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	KresD		hmelj	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	MoD		hmelj	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	CIG3		hmelj	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	Oset		hmelj	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	12099		hmelj	Anglija
<i>V.dahliae</i>	12042		hmelj	Anglija
<i>V.dahliae</i>	PAPmb		paprika	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	PAP		paprika	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	Pap99		paprika	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	Pap2008		paprika	Slovenija
<i>V.dahliae</i>	Mint		meta	USA
<i>V.dahliae</i>	PD335		meta	
<i>V.dahliae</i>	PD584		zelje	
<i>V.dahliae</i>	V-136I	Letalen-patotip D	bombaž	Španija
<i>V.dahliae</i>	V176I	Blag-patotip ND	bombaž	Španija
<i>V.fungicola</i>	CBS 171.80		<i>Agraricus bitorquis</i>	Nizozemska
<i>V.nubilum</i>	CBS 456.51		krompir	Anglija
<i>V.tricorpus</i>	JKG 20		lipa	Nizozemska
<i>V.lecanii</i>	CBS 122.175		<i>Hylurgops alliatus</i>	Španija
<i>V.lecanii</i>	B 560		čriček	Slovenija
<i>V.nigrescens</i>	CBS123.176		Izolacijska volna	Finska
<i>V. longisporium</i>	CBS110218		<i>Brassica napus</i>	Švedska
<i>V. longisporium</i>	PD330		zelje	

3.2 IZOLACIJA GLIVNE DNA ZA PCR ANALIZE

3.2.1 Nacepljanje izolatov v tekoče gojišče

Pred izolacijo DNA je bilo potrebo izolate namnožiti v tekočem gojišču, ki je sestavljeno iz:

- pepton 2 g/l,
- kvasni ekstrakt 2 g/l,
- glukoza 20 g/l,
- kalijev nitrat 1 g/l.

V 50 ml erlenmajerice s sterilnim tekočim gojiščem smo z iglo nacepili izolate iz petrijevk. Inkubacija je potekala 3 dni v temi na temperaturi od 24 – 26 °C na stresalniku, ki je omogočal konstantno mešanje (120 – 140 obr/min). Po inkubaciji smo micelij iz gojišča odstranili s centrifugiranjem (3 min pri 4 °C in 3000 obr/min; Eppendorf centrifuges 5804/R).

3.2.2 Ekstrakcija genomske DNA

Pri izolaciji genomske DNA smo najprej uporabili metodo, ki so jo razvili Molle in sod. (1992).

Reagenti:

- TES pufer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 2% SDS),
- 5 M NaCl,
- 10 % CTAB (10 g CTAB, 90 ml dH₂O),
- 5 M amonijev acetat.

Protokol:

- Približno 0,3 g micelija smo v terilnici zdrobili skupaj s pomočjo kremenčevega peska ob uporabi tekočega dušika.
- Zdrobljenemu miceliju smo dodali 300 µl TES pufra, prenesli v mikrocentrifugirke (v 3 mikrocentrifugirke po 1 ml) in dodali 5 µl proteinaze K. Inkubirali smo 30-60 min z občasnim mešanjem pri 55-60 °C.

- Koncentracijo soli smo uravnali na 1,4 M z 5 M NaCl (dodali smo 280 µl raztopine) in 10 % CTAB (130 µl) in inkubirali 10 min pri 65 °C.
- Dodali smo 1 volumen kloroforma:izoamilalkohola (KI) v razmerju 24:1, rahlo premešali in inkubirali 15 min pri 0 °C, nato centrifugirali pri maksimalni hitrosti (14000 obratih/min) na 4 °C, 10 min.
- Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 450 µl 5 M amonijevega acetata, premešali, inkubirali na ledu 15 min, centrifugirali 10 min.
- Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 530 µl izopropanola, postavili v zamrzovalnik za 15 – 30 min, da se DNA obori ter centrifugirali 10 min.
- Pelet DNA smo sprali s 70 % etanolom, posušili in raztopili v 50 µl TdE. Iste vzorce smo združili v eno mikrocentrifugirko.

Tretiranje z RNazo:

- Dodali smo 3 µl RNaze in inkubirali čez noč na 37 °C.
- Vzorcu smo dodali 200 µl TdE pufra in 300 µl KI 24:1, premešali, centrifugirali.
- Suernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 40 µl 3 M natrijevega acetata pH 5,2 in 0,6 volumna (300 µl) ledenohladnega izopropanola, premešali, inkubirali 20 min v zamrzovalniku.
- Centrifugirali smo 10 min, odlili supernatant, sprali usedlo DNA z 1 ml 70 % etanola (2-3 min), ponovno centrifugirali 10 min.
- Supernatant smo odlili, kratko centrifugirali, s pipeto odpipetirali preostali etanol. Mikrocentrifugirko smo pustili odprto nekaj minut, da se pelet posuši. Dodali smo 70 µl TdE in pelet raztopili.

Metoda z drobljenjem micelja v terilnici s kermenčevim peskom in tekočim dušikom ni bila vedno uspešna, zato smo za del izolatov uporabili postopek izolacije DNA iz protoplastov, prirejen po Bagar in sod. (2009).

Reagenti:

- SP pufer (NaCl 0,8 % m/V (Merck), NaH₂PO₃ 10 mM (Sigma), pH 6,0),
- KMC pufer (CaCl₂ 25 mM (Merck), KCl 1 M (Sigma), MES 10 mM (Sigma), pH 5,8),
- STC pufer (CaCl₂ 50 mM (Merck), Sorbitol 1,2 mM (Sigma), Tris 10 mM (Duchefa), pH 7,5).

Postopek:

- Micelij smo prenesli v mikrocentrifugirke do 0,5 ml in dodali 1 ml SP pufra in centrifugirali 5 min na 700 obratov/min.

- Supernatant smo odlili in dodali 1,5 ml raztopine encima iz glive *Trichoderma harzianum* (Glucanex) (0,03 g/ml v KMC pufru).
- 3,5 h smo inkubirali na 30 °C s stresanjem in nato filtrirali skozi lij z membrano ter centrifugirali 5 min na 4 °C, 5000 obratov/min.
- Supernatant smo odlili in usedlino sprali z 1 ml STC pufra ter ponovno centrifugirali.

Naprej smo delali po protokolu Molle in sod. 1992 s to razliko, da smo dodali 500 µl TES pufra in na koncu nismo tretirali z RNazo.

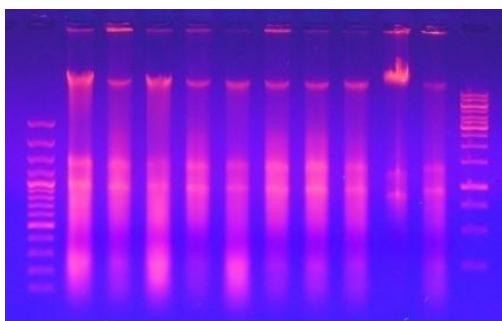
3.2.3 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo izolirane genomske DNA v pufru smo izmerili s pomočjo fluorometra (DyNA Quant™ 200; GE Healthcare).

Za delo s fluorometrom smo potrebovali delovno raztopino, ki smo jo pripravili iz 10x TNE pufra (100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7), ki smo ga 10-krat razredčili v destilirani vodi in filtrsko sterilizirali. Dodali smo barvilo HSS (Hoechts 33258 v končni koncentraciji 0,1 µg/ml). Steklenico z delovno raztopino smo ovili z alufolijo, saj je barvilo občutljivo na svetlobo. Pri kalibraciji aparature smo uporabili DNA telečega timusa (1 mg/ml DNA v 1 x TNE pufru). Pri merjenju smo v steklene kivete odpipetirali 2 ml raztopine in dodali 2 µl izolirane DNA. Izmerjene raztopine DNA smo do uporabe hranili v hladilniku na temperaturi – 20 °C.

3.2.4 Agarozna elektroforeza

Kakovost izolirane DNA smo preverili na 1 % agaroznem gelu, v katerega smo dodali etidijev bromid (EtBr, 10 mg/ml) v koncentraciji 0,05 µl/ml. Gel smo pripravili iz agaroze in 5x TBE pufra (TRIS, borova kislina, EDTA) in destilirane vode. V mikrovalovni pečici smo zmes segrevali do vreliska, da se je agarosa v celoti raztopila in jo ohladili na 60 °C, dodali EtBr in vlili v kalup ter počakali, da se gel strdi. Na gel smo poleg DNA vzorcev, ki smo jim dodali 1/5 volumna nanašavnega barvila (12,5 % (w/v) Ficoll tip 400, 0,2 % (w/v) brom fenol modro) nanesli tudi dolžinski lestvici 100 bp in 1000 bp. Elektroforeza je potekala v horizontalni elektroforetski napravi BioRad SubCell 192, pri 120 V proti pozitivno nabiti anodi. Elektroforetske vzorce smo opazovali s transiluminatorjem UVP TFM-30 in jih fotografirali s pomočjo digitalnega fotoaparata Olympus.



Slika 4: Primer vzorcev na agaroznem gelu

3.2.5 Določevanje nukleotidnega zaporedja izbranih alelov

Z namenom določanja dolžine alelov na mikrosatelitnem lokusu, smo določili nukleotidno zporedje alela na lokusu 1566 in 1413 pri izolatu iz hmelja (T2) in izolatu iz lucerne (107), oba izolirana iz *V. albo-atrum*. Vzorca smo izbrali zatradi tega, ker je tu zelo izrazit dolžinski polimorfizem, pri lucerni imamo alel dolžine 157 bp (lokus 1566) in 243 bp (lokus 1413), medtem ko pri hmelju imamo dolžino alela 111 bp (lokus 1566) in 198 bp (lokus 1413). Namen je bil ugotoviti, ali je razlika v dolžini izključno posledica dolžine ponovljive regije mikrosatelita. Uspešnost PCR pomnoževanja (postopek PCR reakcije je bil enak kot pod točko 3.3.2.1 le da nismo dodali označenih TAIL oligonukleotidnih začetnikov) smo preverili z agarozno elektroforezo (postopek pod točko 3.2.4.). Elektroforeza je potekala pri maksimalni napetosti 140V. Po pregledu s transiluminatorjem UVP TFM-30 smo s pomočjo skalpela izrezali del gela v katerem se je nahajal DNA fragment. Izrezane fragmente smo dali v 1,5 ml centrifugirke in jih očistili, saj se v gelu poleg fragmenta nahajajo tudi začetni oligonukleotidi, primesi in morebitni DNA fragmenti, ki se pomnožujejo skupaj z željeno DNA. Za čiščenje DNA fragmenta smo uporabili komercialni komplet Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (proizvajač Fermentas).

Postopek čiščenja DNA fragmenta:

- K izrezanemu fragmentu iz agaroznega gela smo dodali 720 µl raztopine “binding buffer” (BB) in 80 µl raztopine “TBE conversion buffer” (CB). Sledil je inkubacija v vodni kopeli pri 55 °C 5-10 min oziroma dokler se rezina gela popolnoma ni stopila. pH raztopine smo določili preko barve - rumenaobarvanost je pomenila optimalen pH za vezavo DNA. V primeru oranžnega ali vijoličnega obarvanja, smo dodali 10 µl 3M Na-acetata pH 5,2, premešali in barva je postala rumena.
- Raztopini smo dodali 5 ul suspenzije silicijevega prahu, premešali, inkubirali 5-10 min v kopeli pri 55 °C in premešali. Silicij mora biti stalno v raztopini, saj se DNA veže nanj.

- Vzorce smo centrifugirali 5 s (Eppendorf centrifuges 5804/R), da so se silicijevi delci usedli in odlili supernatant.
- Dodali smo 500 µl ledeno hladne raztopine »Washing buffer« (WB) in vzortec pretresli, da se je usedel silicij popolnoma »razbil« in centrifugirali 5 s ter odlili supernatant. Postopek smo ponovili še dvakrat. Po zadnjem spiranju in odlitju supernatanta smo kratko centrifugirali, odpipetirali preostalo raztopino in posuši na zraku (10 min), da se je odstranil ves etanol.
- Usedlino silicija smo nato raztopili v 25 µl TdE raztopine (10 mM Tris-HCl pH 8,0 in 0,1 mM EDTA pH 8,0), inkubirali pri 55 °C 5 min, centrifugirali in odpipetirali supernatant s prečiščenim vzorcem DNA v novo mikrocentrifugirko.

Za določevanje nukleotidnega zaporedja smo uporabili Sangerjevo metodo, ki uporablja dideoksi terminatorje za zaustavljanje izgradnje verige DNA in so po navadi fluorescenčno označeni. Sekvenčna reakcija temelji na uporabi BigDye 3.1 kemije (naprava ABI 3130XL) in enega začetnega oligonukleotida, s katerim smo pomnožili PCR fragment. 10 µl pripravljene sekvenčne reakcije smo termostatirali v PCR napravi po naslednjem protokolu:

- 96 °C 3 min,
- sledi 99 ciklov: 96 °C 10 s, 50 °C 10 s, 60 °C 4 min,
- končna inkubacija: 72 °C 7 min,
- ohladimo vzorce na 12 °C.

V novo mikrocentrifugirko smo nato odpipetirali 3,5 µl očiščenega PCR produkta in dodali:

- začetni oligonukleotid (1566 for ali 1566 rev oziroma 1413 for ali 1413 rev) v koncentraciji 2 pmol: 1 µl,
- BigDye: 0,5 µl,
- 5x BD buffer: 2 µl,
- voda: do 10 µl.

Pred elektroforezo je bilo potrebno vzorce očistiti, da odstranimo nevgrajene fluorescentne terminatorje. Zaradi slabo očiščenih sekvenčnih reakcijah ima lahko program težave pri pravilni določitvi zaporedja. Za čiščenje sekvenčne reakcije smo uporabili precipitacijo z etanolom in EDTA:

- Vzorce smo kratko centrifugirali, dodali 2,5 µl 125 mM EDTA pH 8,0 in 30 ul absolutnega etanola.

- Kratko smo centrifugirali, da sta EDTA in etanol prišla v stik z vzorcem.
- Vzorec smo nato odpipetirali v 96-mestno PCR ploščo, jo prekrili s folijo in premešali.
- Sledila je 15 min inkubacija na sobni temperaturi (zaščiteni pred svetlobo).
- Ploščo smo centrifugirali pri maksimalni hitrosti 55 min in 4°C.
- Po centrifugiranju smo izlili etanol.
- Nato smo ploščo centrifugirali obrnejno navzdol pri 190x g, na papirnati brisači, 2 min.
- Na sobni temperaturi smo inkubirali 5 min, zaščiteni pred svetlobo.
- V 12 µl formamida smo raztopi DNA, prelepili s folijo in vzorce poslali za nadaljnjo analizo na napravi ABI 3130XL. Za pregledovanje kromatogramov smo uporabili program CodonCode Aligner 3.7.1. S primerjanjem alelov smo ugotvili vzrok dolžinskega polimorfizma.

3.3 MIKROSATELITNI MARKERJI

3.3.1 Razvoj mikrosatelitnih markerjev

Z namenom razvoja novih parov začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje izbranih mikrosatelitnih regij fitopatogenih izolatov glive *V.albo-atrum*, smo izdelali 60 specifičnih parov začetnih oligonukleotidov na osnovi izbranih lokusov, ki smo jih odkrili pri pregledu zaporedja genoma glive *Verticillium albo-atrum*.

Mikrosatelitna zaporedja smo iskali znotraj glive *V. albo-atrum*, katere nukleotidno zaporedje je dostopno na spletnem naslovu Broad instituta (Broad Institute, Cambridge): http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiDownloads.html.

Za iskanje mikrosatelitnih zaporedij znotraj *V. albo-atrum* smo uporabili program PERL skripto MISA s katero smo pregledali celoten genom, vse gene, transkripte in tudi mitohondrijsko zaporedje.

Iskalni parametri mikrosatelitov so bili sledeči:

- definirana velikost ponovitvene enote (npr. 2 – dinukleotid) in minimalno število zahtevanih ponovitve (npr. 10): 2-10, 3-8, 4-6, 5-6, 6-6, 7-6, 8-6, 9-6 in 10-6 (iskali smo vse od dinukleotidnih do 10-nukleotidnih ponovitev);
- prekinitev (maksimalna razlika med 2 ponovitvama) lahko znaša največ 80 bp.

3.3.2 Izbor in uporaba mikrosatelitnih markerjev za določanje polimorfizma

Za detekcijo mikrosatelitov smo uporabili razvite lokusno specifične pare začetnih oligonukleotidov (preglednica 7). Začetne oligonukleotide smo za PCR reakcijo redčili do koncentracije 10 µM.

Najprej smo preizkusili vseh 60 mikrosatelitnih lokusov na 16 izolatih (preglednica 4): 13 *Verticillium albo-atrum*, od tega 6 hmeljnih izolatov in 7 izolatov drugih vrst (artičoka, krompir, rogovilček, krizantema, lucerna in 2 iz paradižnika) ter 3 izolati *Verticillium dahliae* (katalpa, krizantema in paprika). Izmed teh 60 lokusov smo potem izbrali 12 najboljših, ki smo jih uporabili za karakterizacijo vseh 94 izolatov: 63 *Verticillium albo-atrum*, 23 *Verticillium dahliae*, 2 *Verticillium lecanii*, 2 *Verticillium longisporium*, 1 *Verticillium fungicola*, 1 *Verticillium nubilum*, 1 *tricorpus* in 1 *Verticillium nigerscens*. V preglednici 7 je navedenih vseh 12 uporabljenih lokusov.

3.3.2.1 PCR (verižna reakcija s polimerazo)

Za namnoževanje DNA fragmentov smo uporabili PCR reakcijo. V mikrocentrifugirke za PCR smo z avtomatsko pipeto dali po 5 µl za vsakega izmed izoliranih DNA vzorcev, ki smo ga predhodno redčili. Vsi vzorci DNA so bili redčeni po sledečem principu: 98 µl dH₂O in 2 µl izolirane DNA. V 1,5 ml epicah smo pripravili mešanico za PCR, ki je vsebovala reagente prikazane v preglednici 2.

Preglednica 2: Prikaz potrebnih reagentov za PCR reacijo

Komponente PCR reakcije	Delovna koncentracija	Volumen/vzorec (µl)
dH ₂ O		3,55
5x PCR pufer		3
MgCl ₂	2 mM	1,2
dNTP 10 mM (2,5 mM vsakega)	200 µM	1,2
Primer1	0,2 µM	0,3
Primer2	0,2 µM	0,3
Primer TAIL	0,25 µM	0,375
encim TAQ	1,25 U/reakcijo	0,075
DNA		5

V mikrocentrifugirko smo najprej odpipetirali dH₂O (prosto nukleaz), 5x PCR pufer (Promega), MgCl₂ (Promega), dNTP (dATP, dCTP, dGTP in dTTP) ter premešali in centrifugirali. Nato smo dodali primer1, primer2 (10 uM raztopina lokusno specifičnega para začetnih oligonukleotidov) in primer TAIL (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3') na 5' koncu označen s FAM, VIC, NED ali PET fluorescentno značko (podjetje Applied

Biosystems). Po kratkem vorteksiranju in centrifugiraju smo dodali še encim GoTa^q® DNA polimerazo (Promega). Končni volumen PCR reakcije je znašal 15 µl. Encim in mešanico za PCR po dodatku encima smo ves čas priprave hranili na ledu. Količine za en vzorec, prikazane v tabeli, smo pomnožili z željenim številom vzorcev in s 5 % prebitkom. 10 µl mešanice smo nato z avtomatsko pipeto nanesli v mikrocentrifugirke za PCR, v katere smo pred tem nanesli razredčene vzorce DNA. Tako pripravljeno mešanico smo premešali, centrifugirali in dali v napravo za PCR. V eni PCR napravi smo lahko naenkrat pomnožili 96 vzorcev. Pomnoževali smo v 96-mestnih PCR ploščah (Applied Biosystems) s pomočjo PCR naprav za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems), GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems) ali Biometra T Gradient (Biometra).

Vse lokuse smo pomnoževali s protokolom TD55: 5 minut pri 94 °C, sledilo je 5 ciklov pri temperaturi 94 °C v 45 sekundah, nato 30 sekund pri 60 °C, pri vsakem ciklu od petih se temperatura zniža za 1 °C. Sledilo je 25 ciklov pri 55 °C, kar je temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov in na koncu še 8 minutno podaljševanje pri 72 °C.

Prvih pet ciklov t. i. »touch down« je faza prileganja začetnih oligonukleotidov, kjer spuščamo temperaturo v vsakem ciklu za 1 °C. Na ta način dosežemo večjo specifičnost pomnoževanja. Številka protokola (55) pove kolikšna mora biti končna temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov po prvih petih ciklih.

3.3.2.2 Priprava vzorcev za nanos na kapilarno elektroforezo

Po končani PCR reakciji smo vzorce na 96-mestni PCR plošči premešali in centrifugirali 1 min pri 10000 obratih/min. Ker smo pri genotipizaciji uporabili štiri različna barvila lahko po štiri različne lokuse, označene z različnimi barvili, združimo. Zato smo 4 µl vsakega vzorca prenesli v nove mikrocentrifugirke za PCR, premešali, centrifugirali in iz tega 1 µl prenesli na ploščo MicroAmp (Applied Biosystems). V 2 ml mikrocentrifugirki smo pripravili mešanico formamida in LIZ 600 standarda (GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard podjetja Applied Biosystems) in sicer 10,6 µl/vzorec formamida in 0,5 µl/vzorec LIZ 600 standarda. Mešanico smo premešali, centrifugirali in dali 11 µl/vzorec na ploščo MicroAmp. Plošče z vzorci smo prelepili s samolepilnimi folijami (Brand), premešali, centrifugirali in poslali na Oddelek za zootehniko (Groblje 3, Domžale), kjer so jih analizirali na avtomatskem sekvenatorju ABI 3130XL (Applied Biosystems).

4 REZULTATI

4.1 RAZVOJ SPECIFIČNIH MIKROSATELITNIH LOKUSOV

Z uporabo skripte MISA smo v genomu našli 628 mikrosatelitnih zaporedij. Glede na ocenjeno velikost genoma glive *V. albo-atrum*, ki znaša okrog 35 Mb, to pomeni, da imamo mikrosatelitni lokus vsakih 55 kb. Od tega je bilo največ takih z dinukleotidnimi (332, kar predstavlja 52,9 % vseh zaporedij v genomu) in tinukleotidnimi ponovitvami (191; 30,4 %), izmed katerih prevladuje AG/CT motiv. Največ ponovitev, 37, je imel dinukleotidni motiv AG/CT, sledi mu AC/GT motiv. V genih smo odkrili 170 mikrosatelitnih sekvenc, kjer pa prevladujejo trinukleotidne ponovitve (60,6 % vseh zaporedij v genih). Motiv AGC/CGT se ponovi osemkrat. V transkriptih so bile nadene 104 ponovitve, kjer izrazito prevladuje trinukleotidna ponovitev AGC/CGT (86,5 %). Element se ponovi največ dvajsetkrat.

Preglednica 3: Rezultati iskanja mikrosatelitov

	Št. pregledanih sekvenc	Dolžina (bp)	Št. najdenih SSR	Št. Sekvenc>1 SSR
Genom	4147	30299901	628	106
Geni	10221	16148255	170	8
Transkriptom	10221	13429871	104	6
Mitohondrij	1	29493	9	1

Preglednica 4: Prikaz števila ponovitev za posamezno velikost motiva

Genom		Geni		Transkripti		Mitohondrij	
Velikost ponovitve	Št. SSRs						
2	332	2	48	2	1	2	2
3	191	3	103	3	90	3	5
4	51	4	5	4	1	4	1
5	11	5	3	5	2	5	1
6	27	6	6	6	6		
7	5	7	3	7	2		
8	4	9	2	9	2		
9	7						

4.2 UPORABA MIKROSATELITNIH LOKUSOV ZA KARAKTERIZACIJO IZOLATOV *V. ALBO-ATRUM* IN *V. DAHLIAE*

Preizkusili smo vseh 60 parov začetnih oligonukleotidov (izbrani lokusi) (preglednica 5) na 16 izolatih: 13 izolatov *Verticillium albo-atrum* (6 hmeljnih in 7 izolatov drugih vrst - artičoka, krompir, rogovilček, krizantema, lucerna, 2 iz paradižnika) in 3 izolate *Verticillium dahliae* (katalpa, krizantema in paprika) (preglednica 6). Na podlagi dobljenih rezultatov smo izbrali 12 lokusov, ki so prikazani v preglednici 7. Te lokuse smo analizirali na vseh izolatih gliv rodu *Verticillium*.

Preglednica 5: Seznam vseh 60-ih lokusov preizkušenih na 16-ih izolatih s številom alelov na lokus

Ime lokusa	Št. Alelov	Ime lokusa	Št. Alelov	Ime lokusa	Št. Alelov
FAM74	4	FAM1524	4	PET2630	2
VIC159	3	VIC1539	1	FAM2747	4
NED228	2	NED1566	4	VIC2756	3
FAM598	2	PET1572	1	NED3039	2
VIC724	4	FAM1519	5	PET3402	4
NED738	2	VIC1647	2	FAM3102	5
PET798	2	NED1706	4	VIC3111	2
FAM886	3	PET1912	1	NED3181	2
VIC959	3	FAM1945	2	PET3214	2
NED998	2	VIC1994	3	FAM3229	3
PET1004	2	NED2035	2	VIC3297	2
FAM1068	2	PET2083	3	NED3507	3
VIC1158	3	FAM2110	2	PET3632	3
NED1235	2	VIC2130	1	FAM3706	1
PET1309	2	NED2260	4	VIC3835	2
FAM1388	1	PET2262	3	NED3863	2
VIC1413	3	FAM2390	4	PET3994	2
NED1464	2	VIC2458	3		
PET1468	2	NED2480	3		

Preglednica 6: Seznam 16-ih izolatov uporabljenih v pred-testiranju

Vrsta	Genotip	Gostitelj	Država
<i>V. albo-atrum</i>	P10	hmelj	Nemčija
<i>V. albo-atrum</i>	CD15	hmelj	Nemčija
<i>V. albo-atrum</i>	T2	hmelj	Slovenija
<i>V. albo-atrum</i>	Rec91	hmelj	Slovenija
<i>V. albo-atrum</i>	11100	hmelj	Velika Britanija
<i>V. albo-atrum</i>	298092	hmelj	Velika Britanija
<i>V. albo-atrum</i>	102.464	artičoka	Italija
<i>V. albo-atrum</i>	11066	krompir	Velika Britanija
<i>V. albo-atrum</i>	11077	rogovilček	Velika Britanija
<i>V. albo-atrum</i>	11081	krizantema	Velika Britanija
<i>V. albo-atrum</i>	107	lucerna	ZDA
<i>V. albo-atrum</i>	ARO1JS1	paradižnik	Velika Britanija
<i>V. albo-atrum</i>	PD83-53A	paradižnik	Nizozemska
<i>V. dahliae</i>	JKG2	katalpa	Nizozemska
<i>V. dahliae</i>	MAI	paradižnik	Nizozemska
<i>V. dahliae</i>	PAP2008	paprika	Slovenija

Preglednica 7: Seznam izbranih lokusov uporabljenih za genotipizacijo izolatov iz gliv rodu *Verticillium*, oznaka fragmenta pred številko označuje uporabljeno fluorescentno oznako začetnega oligonukleotida TAIL

Fragment	Oznaka	Zaporedje v smeri 5'-3'	SSR	Dolžina (bp)
FAM598	CONT598-FOR CONT598-REV	TGTGAGGGCACTGACATGAT AGAACAGCCTTCCGTCAA	(AG)16	177
VIC959	CONT959-FOR CONT959-REV	CCAACCCTTCATCACATT TGGAGGCAGTGATGAGTTG	(GA)19	213
NED228	CONT228-FOR CONT228-REV	CCGGACGAGAGAGTCTGAAG TTTGAGCAGATTATGCGTCG	(AGA)14	200
PET1004	CONT1004-FOR CONT1004-REV	CCCTTTCCCATCTCAACA TGACCGAGGAGGAGTTGAC	(CT)21	188
FAM886	CONT886-FOR CONT886-REV	CAGCAAGGAAGCACTGTCAA TCCAGACTACACTCTCGCCC	(TG)25	160
VIC2756	CONT2756-FOR CONT2756-REV	TACGATGCGCTCTCAGAATG CTCCTGTCAGAAGGTCCAGC	(GT)17	226
NED3507	CONT3507-FOR CONT3507-REV	AGAGGATGGCATGTCTGGAT AGACAGTCTGCCCTGCCAAT	(GA)17	197
PET1468	CONT1468-FOR CONT1468-REV	GATGCGGTTCTTGTGGACT CAAAGGGTCATGGTGTCAAG	(TCT)10	171
FAM2390	CONT2390-FOR CONT2390-REV	CCATGGTCGTATCTCGTGTG GGCGGCTCTACTTCAATCAG	(CT)17	145
VIC3111	CONT3111-FOR CONT3111-REV	TGTAAGCTTGCCTGACCTG CCCTGAGCCAATTATCGAA	(GA)24	200
NED1566	CONT1566-FOR CONT1566-REV	TCGGATCCCAGGAGTAAGTTT GCACGAGCTGGAAATTCTGT	(CT)16	130
PET3632	CONT3632-FOR CONT3632-REV	GACGTGGAGAAGGTGGAGAG GCCGCCTATGTAAGCAAAGA	(GA)15	230

Preglednica 8: Izbranih 12 lokusov

Ime lokusa	Motiv za ponovitev	Dolžina (bp)	TAIL
598	(AG)16	177	FAM
959	(GA)19	213	VIC
228	(AGA)14	200	NED
1004	(CT)21	188	PET
886	(TG)25	160	FAM
2756	(GT)17	226	VIC
3507	(GA)17	197	NED
1468	(TCT)10	171	PET
2390	(CT)17	145	FAM
3111	(GA)24	200	VIC
1566	(CT)16	130	NED
3632	(GA)15	230	PET

4.3 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Za ločevanje in analizo smo vzorce poslali na Oddelek za zootehniko, kjer imajo sistem 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), namenjen sekvenciranju in drugim tehnikam fragmentnih analiz. Detekcija fragmentov poteka na podlagi fluorescence. Sistem ima 16 kapilar, kar omogoča hkratno analizo 16-ih vzorcev. Za analizo smo predložili operaterju ustrezno tabelo s podatki - imena izolatov in uporabljene lokuse. Obdelane datoteke podatkov v FSA formatu smo uvozili v programske paket GeneMapper® 4.0 (Applied Biosystems). Program omogoča analiziranje mikrosatelitnih lokusov, pri čemer smo dobili podatke o prisotnosti, dolžinah alelov in velikosti fluorescenčnega signala. Podatke o dolžinah alelov smo prekopirali v Excelovo datoteko.

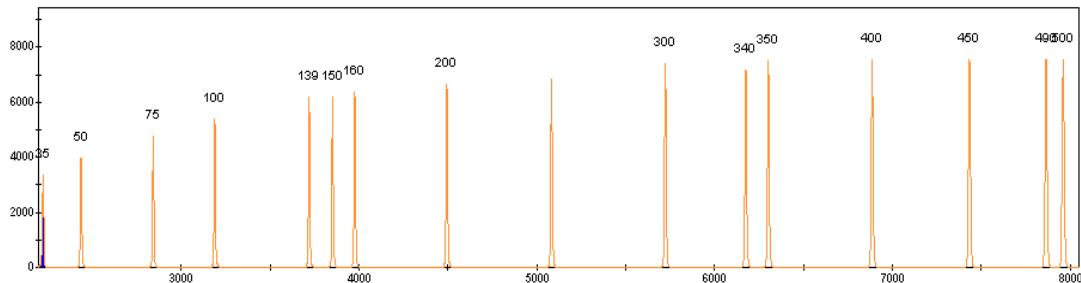
4.4 ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV

4.4.1 Določanje dolžin alelov in nukleotidno zaporedje

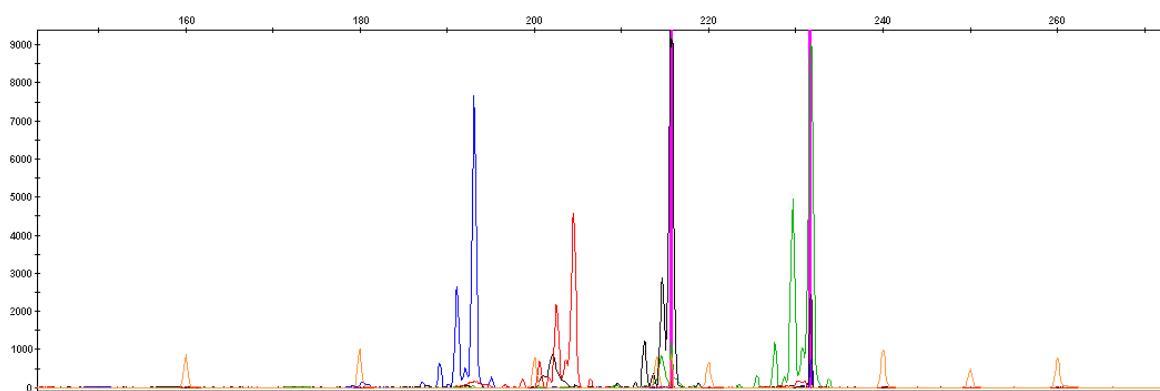
Natančna analiza fragmentov je bila narejena na kapilarni elektroforezi. S pregledom elektroforetskih krivulj smo za posamezne genotipe določili mikrosatelitne markerje. Posamezen marker je bil določen z vrhom krivulje, ki se mu je s pomočjo dolžinskega standarda določila dolžina. Za analizo smo uporabili Genemapper 4.0 (Applied Biosystems). V programu smo določili standard LIZ 600, ki je oranžnoobarvan (slika 5).

Standard LIZ 600 s, 36 fragmenti v rangu velikosti od 20bp do 600bp, je bil razvit za uporabo pri kapilarni elektroforezi. Dolžine fragmentov standarda LIZ 600: 20, 40, 60, 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440, 460, 480, 500, 514, 520, 540, 560, 580 in 600 bp.

V programu smo nastavili parametre za analizo mikrosatelitov. V primeru, da standard ni bil pravilno določen smo z ročnim popravljanjem določili posamezne vrhove, kjer je to bilo mogoče. Program Genemapper omogoča določanje štirih lokusov na enkrat, kar zaradi vezave štirih različnih barvil vidimo kot različno obarvane vrhove: 6-FAM modro, VIC zeleno, NED črno in PET rdeče ter standard LIZ 600 oranžno obarvan (Applied Biosystems).



Slika 5: Standard LIZ 600 s fragmenti od 20 do 600 bp



Slika 6: Prikaz štirih lokusov označenih z različnimi fluorescentnimi barvil v programu Genemapper. Na sliki je izolat iz lucerne (Luc) *V. albo-atrum* na lokusih 598 (FAM – moder), 959 (VIC – zelen), 228 (NED – črn) in 1004 (PET – rdeč)

Določili smo tudi nukleotidno zaporedje alelov lokusov 1566 in 1413 izolatov iz lucerne (107) in hmelja (T2). Nukleotidno zaporedje je predstavljeno v prilogi C. Rezultati potrjujejo, da razlika v dolžini alelov izvira iz dolžinskega polimorfizma mikrosatelitnega zaporedja. Pri lokus 1413 ima izolat hmelja izrazito kratko mikrosatelitno ponovitev in tudi nekoliko različno obrobno regijo v primerjavi z izolatom iz lucerne.

4.4.2 Analiza dvanajstih izbranih lokusov

Lokus (FAM) 598: lokus z dinukleotidnim mikrosatelitnim motivom (AG)16 ima 3 alele (188, 193, 215). Pri vrsti *V. albo-atrum* sta prisotna alela 188 in 193. Tako za hmeljne kot večino ne-hmeljnih izolatov je značilen alel 188. Le pri izolatih iz lucerne je značilen alel 193. Pri *V. dahliae* je pri 12 izolatih prisoten alel 188, medtem ko ima hmeljni izolat CIG3 alel 215. Pri ostalih 11 izolatih ni prišlo do pomnoževanja. Izmed ostalih vrst rodu *Verticillium* je prišlo do pomnoževanja le pri *V. lecanii* (188). Alel 188 je tako najbolj pogost prav pri vseh vrstah, saj se pojavlja s frekvenco 0,9041, najmanj pogost pa alel 215 s frekvenco 0,0137 (priloga A).

Lokus (VIC) 959: ima dinukleotidni motiv (AC)18 in 3 alele (209, 214, 215) izmed katerih ima alel 209 najvišjo (0,6022) in 214 najnižjo frekvenco (0,0108). Vsi hmeljni izolati vrste *V. albo-atrum* imajo alel 209. Alel 215 je značilen za izolate iz artičoke (102.464), krompirja (PD693, Iran) in lucerne (Luc, 41, 11, 392.91 in 107). Pri *V. dahliae* imajo vsi izolati alel 215, razen MoD, ki ima alel 214. Do pomnoževanja je prišlo pri vseh ostalih vrstah rodu *Verticillium*, razen pri *V. nubilum*. Omenjeni izolati imajo alel 215.

Lokus (NED) 228: prisoten je trinukleotidni motiv (AGA)14 in 4 aleli (110, 155, 188, 216). *V. albo-atrum*: pri vseh hmeljnih izolatih je prisoten alel 188, lucernini izolati pa imajo alel 216. Do pomnoževanja ni prišlo le pri izolatu iz krompirja iz Irana (PD693) in slovenskemu izolatu iz hmelja (Ledina). *V. dahliae*: prisotna 2 alela – 110 in 155 (V136I, bombaž). Ostale vrste: *V. fungicila*, *V. tricorpus*, *V. lecanii* imajo alel 188, medtem ko imajo vrste *V. nubilum*, *V. nigrescens* in *V. longisporium* alel 110. Najvišjo frekvenco ima v tem primeru alel 188, ki znaša 0,6778, najnižjo pa alel 156 s frekvenco 0,0111.

Lokus (PET) 1004: ima dinukleotidni motiv (CT)21 in 4 alele (203, 204, 205, 207). *V. albo-atrum*: pri večini hmeljnih izolatov je prisoten alel 205. Izolat 298095 ima daljši alel - 207. Rogovilček 11077, krizantema 11081 in paradižnik ARO1/067 imajo alel 203, medtem ko imajo ostali paradižnikovi izolati alel 205, tako kot večina ne-hmeljnih izolatov. Lucerna izolata Luc in 107 imata alel 205, medtem ko imajo 41, 11 in 392.91 alel 204. *V. dahliae*: vsi razen 2 izolatov (MoD in PAPRIKA) imajo alel 205. Omenjena izolata imata alel 204. Ostale vrste: izolati, pri katerih je prišlo do pomnoževanja, imajo alel 205

(*V. fungicila*, *V. lecanii*, *V. nigrescens* in *V. longisporium*). Najnižjo frekvenco (0,0119) zasledimo pri alelu 207, najvišjo (0,8809) pa pri alelu 205.

Lokus (FAM) 886: vsebuje dinukleotidni motiv (TG)25 in ima 4 alele (131, 136, 168, 171) izmed katerih ima najvišjo frekvenco alel 136 (0,7143), najmanjšo pa 131 (0,0119). Znotraj *V. albo-atrum* sta prisotna 2 alela. Skoraj vsi, tako hmeljni kot ostali izolati imajo alel 136. Alel 171 je prisoten pri 241.82 (katalpa) in pri lucernah (Luc, 41, 11, 392.91, 107). Izolati *V. dahliae* imajo alel dolžine 168, le pri hmeljnima izolatoma 12099 in CIG3 imamo alel 136. Pri ostalih vrstah je prišlo do amplifikacije le pri *V. fungicila* (131), *V. lecanii* (136) in *V. longisporium* (136).

Lokus (VIC) 2756: pri lokusu z dinukleotidnim motivom (GT)17 je opazna večja polimorfost. Lokus ima 6 alelov (222, 223, 235, 237, 239 in 240). Največjo pogostost najdemo pri alelu 235 (0,5955), sledi mu alel 222 (frekvanca 0,2697), medtem ko se ostali 4 pojavljajo s povprečno frekvenco 0,0337. Znotraj *V. albo-atrum* se nahaja 5 alelov. Pri hmelju najdemo alela 235 (večina izolatov) in 240 (1974, 298092, oba iz Anglije). Ne-hmeljni izolati imajo 5 alelov 222 (PD693, krompir, Iran), 235 (pri večini izolatov), 237 (T179, paradižnik), 239 (lucerne) in 240 (ARO1/JS1, paradižnik). *V. dahliae* ima prisoten alel 222 pri vseh izolatih. *V. fungicola* in *V. lecanii* imata alel 235, *V. longisporium* pa alel 223. Pri ostalih vrstah ni prišlo do amplifikacije.

Lokus (NED) 3507: ima dinukleotidni motiv (GA)17 in 3 alele (187, 193, 214). *V. albo-atrum*: hmeljni izolati imajo alel 193. Pri ne-hmeljnih izolatih prav tako prevladuje alel 193. Omenjen alel ima tudi najvišjo frekvenco pojavitve, in sicer 0,6087, medtem ko ima najnižjo alel 214 s frekvenco 0,0652. Pri lucernah in katalpi najdemo alel 214 in pri PD693 (krompir, Iran) alel 187. Vsi izolati *V. dahliae* imajo alel 187. Ta alel je prisoten tudi pri vrstah (*V. fungicola*, *V. nubilum*, *V. lecanii*, *V. nigrescens* in *V. longisporium*).

Lokus (PET) 1468: lokus s trinukleotidnim motivom (TCT)10 ima le 2 alela (174 s frekvenco 0,9348 in 190 s frekvenco 0,0652) in je med vsemi 12 lokusi najmanj polimorfen. Alel 174 je prisoten pri vseh izolatih in vseh vrstah rodu *Verticillium*. Izjemne le pri izolatih iz *V. albo-atrum*: pri katalpi (241.82) in lucernah (Luc, 41, 11, 392.91, 107). Ti izolati imajo alel 190.

Lokus (FAM) 2390: lokus z dinukleotidnim mikrosatelitnim motivom (CT)17, ki ima 7 alelov (126, 149, 151, 161, 172, 174, 191) in je eden med najbolj polimorfnimi lokusi. Najvišjo frekvenco opazimo pri alelu 126 (0,6322), sedi mu alel 149 z veliko nižjo pogostostjo (0,1839). Ostali aleli se pojavljajo s povprečno frekvenco 0,0368, med katerimi imata najnižjo alela 172 in 174 (0,01149). *V. albo-atrum*: največ izolatov ima alel 126, ki je značilen za vse hmeljne izolate. Pri ne-hmeljnih izolatih imajo katalpa in izolati lucerne alel 161, medtem ko ima PD693 (krompir, Iran) alel 149. Znotraj *V. dahliae* je

nekoliko večja variabilnost: štirinajst izolatov ima alel 149 (krizantema, meta, hmelj, paprika, zelje), pet izolatov alel 151 (katalpa, krompir, 2 hmelja) in trije 191 (bombaž, hmelj). Do pomnoževanja je prišlo še pri vrstah *V. fungicola* (149) in *V. longisporum* (alela 172 in 174).

Lokus (VIC) 3111: ima dinukleotidni motiv (GA)24 in 4 alele (145, 187, 194, 213). *V. albo-atrum*: 2 alela, 194 (večina izolatov) in 213 (241.82 - katalpa, vse lucerne). Pri *V. dahliae* je prišlo do pomnožitve le pri CIG3 – hmelj in V136I - bombaž (145). Do pomnoževanja je prišlo le še pri *V. longisporum* (187). Alel z najvišjo frekvenco je alel 194 (0,8594), z najnižjo pa alel 145 (0,0156).

Lokus (NED) 1566: je najbolj polimorfen lokus, ki vsebuje dinukleotidni motiv (CT)16 in ima 9 alelov (105, 111, 114, 157, 160, 167, 182, 185, 236). *V. albo-atrum*: vsi izolati iz hmelja imajo alel 111, ki je s frekvenco 0,6235 tudi najbolj pogost alel tega lokusa. Le pri hmeljnem izolatu 298099 je prisoten alel 114. 241.82 (katalpa) in lucernini izolati imajo alel 157. Ostali ne-hmeljni izolati imajo alel 111. Znotraj *V. dahliae* se je kazal večji polimorfizem: 160 (katalpa – JKG2, krompir – JKG1 in JKG8, hmelj - KresD in CIG3, bombaž - V136I), 167 (hmelj, MAI – krizantema, paprike, meta, zelje), 182 (V176I - bombaž), 185 (12042 – hmelj), 236 (DIJK – krizantema, 12099 - hmelj). Ostale vrste: *V. fungicola* alel 111, *V. tricorpus* 160 in *V. longisporum* 105. Najnižjo frekvenco, 0,0118 opazimo pri alelih 114, 182 in 185.

Lokus (PET) 3632: ima dinukleotidni motiv (GA)15 in 5 alelov (204, 235, 237, 240, 252). Pri vrsti *V. albo-atrum* prevladujejo izolati z aleлом 237. Alel 252 je prisoten pri izolatih iz lucerne in katalpe (241.82), 235 pa pri 298099 (hmelj). Pri vseh izolatih iz *V. dahliae* je prisoten alel 235. Ostale vrste: amplifikacija le pri *V. nubilum* (204) in *V. longisporum* (240). Pogostost je bila najvišja pri alelu 237 (0,6471), najnižja pa pri alelu 204 (0,0118).

4.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

4.5.1 Program identity

V programu IDENTITY 1.0 (Wagner in Sefc, 1999), ki je namenjen analizi mikrosatelitnih markerjev, smo določili število (preglednica 10) in frekvenco alelov za posamezen lokus (priloga A).

Frekvenca je delež posameznega alela v populaciji, ki se izračuna po formuli:

$$p_i = \frac{\text{pogostnost - tega alela v populaciji}}{\text{pogostnost vseh alelov v populaciji}} \quad \dots (1)$$

Program je bil napisan ravno za analizo mikrosatelitov pri proučevanju kultivarjev vinske trte. Omogoča analizo lokusov in sicer določanje števila in frekvence alelov, pričakovano in dejansko heterozigotnost, frekvenco ničnih alelov, verjetnost izključitve napačnega roditelja in verjetnost enakosti genotipov (Wagner in Sefc, 1999).

Pri uporabi programa IDENTITY smo podatke o dolžini alelov zapisali v obliki dvo kolonskega formata, saj je program narejen za diploidne organizme, zato smo alelno vrednost posameznega lokusa zapisali dvakrat. Excelovo datoteko smo shranili v obliki .csv formata. Vhodno datoteko smo pripravili kot tabelo s sledečimi podatki: zaporedno število, kultivar, lokus1, lokus1, lokus2, lokus2. Rezultati so prikazani v preglednici 9 in 10 ter v prilogi 1.

Preglednica 9: Prikaz alelov za posamezen lokus razčlenjeno po posameznih vrstah glive

aleli lokus	št. alelov	Vsi izolati (94) aleli	št. alelov	V.albo-atrum (63) aleli
FAM_598	3	188, 193, 215	2	188, 193
VIC_959	3	209, 214, 215	2	209, 215
NED_228	4	110, 156, 188, 216	2	188, 216
PET_1004	4	203, 204, 205, 207	4	203, 204, 205, 207
FAM_886	4	131, 136, 168, 171	2	136, 171
VIC_2756	6	222, 223, 235, 237, 239, 240	5	222, 235, 237, 239, 240
NED_3507	3	187, 193, 214	3	187, 139, 214
PET_1468	2	174, 190	2	174, 190
FAM_2390	7	126, 149, 151, 161, 172, 174, 191	4	126, 149, 161, 191
VIC_3111	4	145, 187, 194, 213	2	194, 213
NED_1556	9	105, 111, 114, 157, 160, 167, 182, 185, 236	3	111, 114, 157
PET_3632	5	204, 235, 237, 240, 252	3	235, 237, 252

Se nadaljuje

Nadaljevanje

aleli lokus	V.albo-atrum hmelj (41)		V.albo-atrum drugi (22)	
	št. alelov	aleli	št. alelov	aleli
FAM_598	1	188	2	188, 193
VIC_959	1	209	2	209, 215
NED_228	1	188	2	188, 216
PET_1004	2	205, 207	3	203, 204, 205
FAM_886	1	136	2	136, 171
VIC_2756	2	235, 240	5	222, 235, 237, 239, 240
NED_3507	1	193	3	187, 193, 214
PET_1468	1	174	2	174, 190
FAM_2390	1	126	3	126, 149, 161
VIC_3111	1	194	2	194, 213
NED_1556	2	111, 114	2	111, 157
PET_3632	2	235, 237	2	237, 252

aleli lokus	Verticillium dahliae (23)		V.dahliae hmelj (9)	
	št. alelov	aleli	št. alelov	aleli
FAM_598	2	188, 215	2	188, 215
VIC_959	2	214, 215	2	214, 215
NED_228	2	110, 156	1	110
PET_1004	2	204, 205	2	204, 205
FAM_886	2	136, 168	2	136, 168
VIC_2756	1	222	1	222
NED_3507	1	187	1	187
PET_1468	1	174	1	174
FAM_2390	3	149, 151, 191	3	126, 149, 151
VIC_3111	2	145, 194	1	194
NED_1556	5	160, 167, 182, 185, 236	4	160, 167, 185, 236
PET_3632	1	235	1	235

Se nadaljuje

Nadaljevanje

aleli lokus	V. dahliae drugi (14)			Verticillium drugi (8)	
	št. alelov		aleli	št. alelov	aleli
FAM_598	1		188	1	188
VIC_959	1		215	1	215
NED_228	2		110, 156	2	110, 188
PET_1004	2		204, 205	1	205
FAM_886	1		168	2	131, 136
VIC_2756	1		222	2	223, 235
NED_3507	1		187	1	187
PET_1468	1		174	1	174
FAM_2390	3		149, 151, 191	3	149, 172, 174
VIC_3111	1		145	1	187
NED_1556	4		160, 167, 182, 236	3	105, 111, 160
PET_3632	1		235	2	204, 240

4.5.2 Program NTSYS

Podatki so bili nadalje statistično obdelani s programom NTSYS, ki omogoča uporabo metod numerične taksonomije. Iz podatkov prisotnosti ali odsotnosti določenega alela (priloga C) pri posameznem genotipu smo sestavili binarno matriko. Za razvrščanje genotipov v sorodstvene skupine smo uporabili metodo neponderirane aritmetične sredine (UPGMA) in razvrstili enote v skupine na osnovi koeficientov sorodnosti in izdelali dendrogram.

Datoteko za program NTSYS smo najprej pripravili v Excelovi datoteki obliki matrike. Prisotnost alela na posameznem lokusu smo označili z 1, odsotnost pa z 0. V primeru, da smo imeli izolat, pri katerem ni prišlo da pomnoževanja določenega lokusa, smo takemu izolatu dodelili število 9 za vse alele tega lokusa. Izolate z več kot 35 % manjkajočih podatkov smo izločili, saj so le-ti motili razvrščanje v skupine. Takih genotipov je bilo 8: 102.464, PD693 (oba *V. albo-atrum*), PAPmb (*V. dahliae*), 456.51 (*V. nubilum*), JKG20 (*V. tricorpus*), 122.175, B560 (oba *V. lecanii*) in 123.176 (*V. nigrescens*). Treba je poudariti, da manjkajoči podatki izvirajo iz nepomnoževanja lokusov in ne zaradi tehnične napake. Tako nam je na koncu izmed 94 ostalo 86 izolatov iz katerih program je izdelal matriko vrednosti koeficientov, iz njih pa dendrogram (slika 7).

DICE-ov koeficient (1945), ki smo ga uporabili, smo izračunali po sledeči formuli:

$$\text{DICE} = \frac{2a}{2a+b+c} = \frac{2n_{11}}{2n_{11}+n_{10}+n_{01}} \quad \dots (2)$$

n₁₁ - število opazovanj, kjer imata oba osebka vrednost 1,
n₁₀ - število opazovanj, kjer ima prvi osebek vrednost 1, drugi pa vrednost 0 in
n₀₁ - število opazovanj, kjer ima prvi osebek vrednost 0, drugi pa vrednost 1.

Za preverjanje in potrditev rezultata, smo dobljen dendrogram uporabili za pretvorbo v novo matriko kofenetičnih vrednosti, ki omogoča primerjavo z originalno matriko Dicovih vrednosti. Za to smo uporabili program MXCOMP. Rezultat primerjave pa je korelacijski koeficient, ki ga upoštevamo kot merilo skladnosti med matrikama. V našem primeru je bil korelacijski koeficient 0,98164, kar kaže na dobro predstavitev podatkov.



Slika 7: Dendrogram 86-ih izolatov gliv rodu *Verticillium* na osnovi koeficiente podobnosti

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V preteklosti je bilo narejenih veliko fitopatoloških in genetskih raziskav za glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, predvsem za proučevanju njune variabilnosti. V nalogi smo se osredotočili na razvoj novih parov začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje izbranih mikrosatelitnih regij in proučevanje molekularne variabilnosti izolatov iz hmelja in nekaterih drugih gostiteljskih rastlin. Naredili smo tudi preizkus medvrstnega pomnoževanja razvitih lokusov pri vrstah *V. lecanii*, *V. longisporum*, *V. fungicola*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* in *V. nigrescens*.

5.1 IZOLACIJA GLIVNE DNA ZA PCR ANALIZE

Celična stena gliv je zelo kompleksna. Sestavljena je iz hitina, (1–3)- β - D-glukana, (1,6) β -glukanov, lipidov in peptidov. Manjši in sod. leta 2001 navajajo, da za izolacijo glivne DNA ni univerzalne metode, saj vsaka vrsta zahteva specifično metodo za učinkovito ekstrakcijo DNA (cit. po Karakousis, 2005). Tradicionalne metode ekstrakcije glivne DNA vključujejo mehansko razgradnjo, homogenizacijo, sonifikacijo, stiskalnice ali kroglečne mline (Van Burik in sod., 1998). Metoda izolacije DNA po postopku Molle in sod. (1992) temelji na uporabi kremenčevega peska in tekočega dušika (mehanske metode) in proteinaze K (encimska liza) za razgradnjo celične stene ob dodatku soli (5 M NaCl) in 10 % CTAB. Omenjena metoda se za izolacijo DNA gliv rodu *Verticillium* ni izkazala za dovolj učinkovito (veliko izpadov, degradirana DNA), zato smo namesto mehanske razgradnje uporabili metodo izolacije DNA iz protoplastov. Metoda protoplastiranja temelji na uporabi litičnih encimov iz glive *Trichoderma harzianu* (Glucanex) za razgradnjo celične stene in različnih pufrov (SP, KMC, STC). Postopek izolacije smo potem nadaljevali po protokolu Moller in sod. (1992). Sol (5 M NaCl) ustvari pogoje visoke ionske moči, v katerem CTAB (ne-ionski detergent) tvori komplekse s proteini in večino kislih polisaharidov, nukleinskih kislin pa ne obori (Moller in sod. 1992).

Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom in agarozna elektroforeza sta potrdili uspešnost izolacije. Koncentracije izmerjene DNA so se gibale v območju od 19 ng/ul do 2537 ng/ul.

5.2 ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV

Izmed 60 lokusov (preglednica 5), ki smo jih izbrali in preizkusili, smo jih za nadaljnjo analizo izbrali 12, ki so se izkazali za najboljše v predhodnih testiranjih. Izbor je potekal glede na velikost vrhov, nagnjenost k zdrsom, pomnoževanje oziroma ne pomnoževanje mikrosatelitnih sekvenc. Npr. lokusi 1388, 1539, 1572, 1912, 2130 in 3706 so bili pomnoženi le pri izolatu 107 iz lucerne, zato smo take lokuse izločili. Izbrani lokusi so predstavljeni v preglednici 7.

V programu IDENTITY 1.0 (Wagner in Sefc, 1999), ki je namenjen analizi mikrosatelitnih markerjev, smo določili število (preglednica 10) in frekvenco alelov za posamezen lokus (priloga A). Določili smo 54 alelov pri 12 lokusih, kar predstavlja 4,5 alela na posamezni lokus. Berbegal in sod. so lea 2009 za karakterizacijo izolatov *V. dahliae* uporabili 4 mikrosatelitne markerje in pri tem dobili 10 alelov, kar znaša 2,5 alela na lokus. Leta 2011 pa so Berbegal in sod. ravno tako pri izolatih iz *V. dahliae* določili 3,5 alela na lokus. Tokrat so v poskusu na petih lokusih določili 19 alelov. V našem primeru je največ alelov bilo določenih pri lokusu 1566, ki je z 9 aleli najbolj polimorfen. Najmanj polimorfen pa je lokus 1468 z le 2 aleloma.

Preglednica 10: Število alelov na lokus pri posameznih vrstah oz. skupinah analiziranih gliv rodu *Verticillium*

Lokus	Št. Alelov	aleli	Vaa	Vaa hmelj	Vaa drugi	Vd	Vd hmelj	Vd drugi	V drugi
598	3	188, 193, 215	2	1	2	2	2	1	1
959	3	209, 214, 215	2	1	2	2	2	1	1
228	4	110, 156, 188, 216	2	1	2	2	1	2	2
1004	4	203, 204, 205, 207	4	2	3	2	2	2	1
886	4	131, 136, 168, 171	2	1	2	2	2	1	2
2756	6	222, 223, 235, 237, 239, 240	5	2	5	1	1	1	2
3507	3	187, 193, 214	3	1	3	1	1	1	1
1468	2	174, 190	2	1	2	1	1	1	1
2390	7	126, 149, 151, 161, 172, 174, 191	4	1	3	3	3	3	3
3111	4	145, 187, 194, 213	2	1	2	2	1	1	1
1566	9	105, 111, 114, 157, 160, 167, 182, 185, 236	3	2	2	5	4	4	3
3632	5	204, 235, 237, 240, 252	3	2	2	1	1	1	2

S programom NTSYS smo izdelali dendrogram (slika 7), na katerem se na podlagi Diceovega koeficiente opazil razdelitev v tri glavne razvejitve: v prvo skupino uvrščamo *V. albo-atrum*, v drugo *V. dahliae* in *V. longisporium* v tretjo pa lucernine izolate *V. albo-atrum*.

V prvi skupini, ki jo nadalje razdelimo na tri podskupine, se nahajajo vsi hmeljni izolati. Iz dendrograma je razvidno, da med hmeljnimi izolati, ne glede na to ali gre za blago ali letalno obliko oziroma geografski izvor, skoraj ni polimorfizma. V zgornjem delu dendrograma smo opazili veliko skupino z vrednostjo razmejitve Diceovega koeficiente v dendrogramu 1,00 (vsi so bili identični), v katero poleg večine izolatov hmelja spadajo še izolati paradižnika iz Nizozemske, vsi izolati krompirja (ne glede na geografski izvor), surfinije in kumar. Minimalno raznolikost pri hmeljnih izolatih opazimo le med izolati iz Anglije (druga podskupina), kjer najbolj izstopa 298099 (vrednost Diceovega koeficiente 0,80), ni pa možna ločitev glede na patotip. V to podskupino uvrščamo tudi izolate paradižnika iz Anglije (z izjemo ARO1/140A), rogovilčka in krizanteme. V tretji podskupini pa najdemo le izolat 171.80 vrste *V. fungicola*. Izmed slovenskih izolatov izstopat CIG3, ki ga uvrščamo v skupino z izolati vrste *V. dahliae*. V prvo skupino spada tudi izolat Ledina, za katerega smo predvidevali, da gre za izolat *V. dahliae* iz hmelja. CIG3 in Ledina sta nova izolata, ki sta bila vrstno uvrščena le na podlagi morfoloških značilnosti. Na podlagi analize z mikrosatelitnimi markerji pa smo izolat Ledina identificirali kot izolat iz *V. albo-atrum*, CIG3 pa kot izolat *V. dahliae*.

Iz dendrograme vidimo, da je v skupini *V. dahliae* prisoten večji polimorfizem glede na število izoliranih izolatov kot v prvi skupini izolatov iz *V. albo-atrum*. Znotraj vrste *Verticillium dahliae* naj bi obstajali medvrstni hibridi, označeni kot amfihaploidi. Krapapa in sod. (1997) so predlagali, da se amfihaploidne izolate uvrsti v novo vrsto, *Verticillium longisporium*. Glede na rezultate, ki smo jih dobili in ki so prikazani v dendrogramu, bi lahko potrdili domnevo, da je eden izmed staršev teh izolatov *V. dahliae*. Domnevo, da je *V. longisporium* hibrid med vrstama *V. dahliae* in lucernnim izolatom *V. albo-atrum*, s to študijo ne moremo potrditi.

Zelo pomembno je izpostaviti, da smo v skupini *V. dahliae* uspeli ločiti dva različno virulentna izolata iz bombaža iz območja Španije in sicer V-1316, ki povzroča letalna bolezenska znamenja (patotip D) in izolat V 1761, ki inducira blažja znamenja na bombažu (patotip ND). To nakazuje, da lahko kljub neodkritju polimorfizma med različno virulentnimi izolati glive *V. albo-atrum* iz hmelja mikrosateliti zaznajo razlike tudi na nivoju virulence. Razvoj novih mikrosatelitnih markerjev bi lahko tako v prihodnosti odkrili polimorfizem tudi med različno virulentnimi izolati *V. albo-atrum*.

Zadnjo, tretjo skupino predstavljajo izolati *V. albo-atrum* iz lucerne in katalpe. Pri izolatih iz lucerne opazimo večji polimorfizem v primerjavi s hmeljnimi izolati. Pri lucerni smo imeli 4 izolate za katere Diceov koeficient znaša 0,92, medtem ko je pri hmelju izmed 40-ih izolatov bilo 34 takih s koeficientom 1,00. Da je razvoj pri lucerni dejansko šel v drugo smer, kot pri hmelju in drugih izolatih, smo dokazali tako, da smo določili nukleotidno zaporedje mikrosatelitnih alelov lokusa 1566 in 1413 izolata iz lucerne (107) in izolata hmelja (T2). Iz sekvenc (priloga C) je razvidno, da ima lucernin izolat daljši mikrosatellit

kot hmeljev. Tudi pri ostalih začetnih oligonukleotidih imamo pri izolatih iz lucerne razen pri lokusu 1004, tudi daljše alele. To lahko pojasnimo tudi z dejstvom, da smo mikrosatelitne lokuse razvili na podlagi genomskega zaporedja izolata VaMs.102, ki je bil izoliran lucerne. Ponavadi so mikrosatelitni lokusi najbolj polimorfni ravno pri organizmu ali populacijah, iz katerih so bili izolirani (Ellegren in sod., 1995).

PCR tehnika z uporabo mikrosatelitnih markerjev se je izkazala za zelo uporabno pri določanju genetskega polimorfizma gliv rodu *Verticillium*. Metoda je pokazala visoko stopnjo ponovljivosti in občutljivosti pri detekciji polimorfizmov ozko sorodnih organizmov.

6 POVZETEK

Gospodarsko najpomembnejši vrsti gliv znotraj rodu *Verticillium* sta *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, ki okužujeta številne rastline. Večina izolatov obeh vrst je haploidnih, vendar naj bi znotraj vrste *V. dahliae* obstajali medvrstni hibridi, ki imajo ohranjen večji del obeh genomov v fuzijskem jedru. Za te amfihaploidne hibride je bila prelagana uvrstitev v novo vrsto, *Verticillium longisporium*.

Večino izolatov gliv smo dobili iz Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Iz njih smo DNA najprej izolirali po metodi Molle in sod. (1992), ki za razgradnjo celične stene poleg Proteinaze K določa tudi uporabo finega peska. Ker se postopek z uporabo peska ni pokazal kot učinkovit, smo DNA izolirali iz protoplastov. Izoliranim vzorcem DNA smo koncentracije izmerili s pomočjo fluorometra Dyna Quant™ 200 (GE Healthcare) in njihovo kakovost preverili na 1 % agaroznem gelu.

Za detekcijo genetske variabilnosti smo uporabljali mikrosatelitne markerje. Mikrosateliti so kratki, tandemno ponovljivi motivi DNA, katerih je enota ponovitve dolga od 2 do 8 bp. Pri fitopatogenih glivah rodu *Verticillium* so najpogosteje prisotni dinukleotidni in trinukleotidni motivi, najdemo pa tudi ponovitve višjega razreda (do 9 bp).

Eden izmed ciljev naloge, je bil razviti nove mikrosatelitne lokuse, ki smo jih najprej preizkusili na 16-ih izbranih vzorcih in nato med njimi izbrali 12 takih, ki so dali najboljše rezultate. Namnoževanje fragmentov DNA je potekalo s pomočjo PCR tehnike. Plošče z vzorci smo nato poslali na Oddelek za zootehniko (Groblje 3, Domžale) na analizo z avtomatskim sekvenatorjem ABI 3130XL (Applied Biosystems).

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programe Genemapper 4.0 (Applied Biosystems), IDENTITY 1.0 (Wagner in Sefc, 1999) in NTSYS.

Po analizi fragmentov na kapilarni elektroforezi smo s programom Genemapper določili lokuse za posamezen genotip. Nato smo v programu IDENTITY 1.0 (Wagner in Sefc, 1999), ki je namenjen analizi mikrosatelitnih markerjev, določili število in frekvenco alelov za posamezen lokus. Za razvrščanje genotipov v sorodstvene skupine smo uporabili program NTSYS, ki z metodo aritmetične sredine (UPGMA) razvrstil enote v skupine na osnovi koeficientov sorodnosti in izdelali dendrogram.

Med izbranimi lokusi je bil najbolj polimorfen lokus 1566 z devetimi aleli, najmanj pa lokus 1468 z dvema aleloma. Določili smo 54 alelov pri 12 lokusih, kar predstavlja 4,5 alela na posamezni lokus. Na dendrogramu smo opazili tri velike glavne skupine: v prvo skupino uvrščamo *V. albo-atrum*, v drugo *V. dahliae* in *V. longisporium* v tretjo pa

lucernine izolate *V. albo-atrum*. Na podlagi analize z mikrosatelinimi markerji smo identificirali nova izolata Ledina in CIG3, ki sta do sedaj bila okarakterizirana le na podlagi morfoloških značilnosti in ju uvrstili v vrsti *V. albo-atrum* (Ledina) in *V. dahliae* (CIG3). Iz dendrograma vidimo tudi, da je v skupini *V. dahliae* zastopana večja heterogenost glede na število izolatov kot v prvi skupini izolatov *V. albo-atrum*.

Pomembno odkritje v tej skupini predstavlja odkritje polimorfizma med različno virulentnima izolatoma iz bombaža iz območja Španije, ki pripadata letalnemu patotipu D in blažjem patotipu ND, kar še dodatno potrjuje vrednost mikrosatelitskih analiz. Z razvojem novih mikrosatelitnih markerjev bi lahko tako v prihodnosti odkrili polimorfizem tudi med različno virulentnimi izolati glive *V. albo-atrum*.

Pri glivi *V. albo-atrum* lahko glede na dolžino alelov sklepamo, da je razvoj pri lucerni šel v drugo smer, kot pri hmelju in drugih izolatih, kar smo dokazali tako, da smo posekvencirali genom izolata iz lucerne in genom izolata hmelja. Iz sekvenc razvidno, da ima lucernin izolat daljši mikrosatelit kot hmelj.

7 VIRI

- Armour J.A.L., Alegre S.A., Miles S., Williams L.J., Badge R.M. 1999. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. V: Microsatellites – evolution and applications. Goldstein D.B., Schlötterer C. (ur). Oxford, Oxford University Press: 24-33
- Atallah Z., Maruthachalam K., Davis M.R., Klosterman S.J., Subbarao K. 2009. Characterization of 22 highly polymorphic microsatellite loci in the cosmopolitan fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. Molecular Ecology Resources, 9: 1460-1466
- Bandelj Mavsar D. 2006. Mikrosatelitski markerji in njihova uporabnost v oljkarstvu. Series Historia Naturalis, 16, 2: 209-222
- Bagar T., Altenbach K., Read N.D., Bencina M. 2009. Live-cell imaging and measurement of intracellular ph in filamentous fungi using a genetically encoded ratiometric probe. Eukaryotic Cell, 8, 5: 703-712
- Barbara D.J., Morton A., Miller N.J. 2005. Isolation of microsatellite markers from an interspecific hybrid isolate of the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. Molecular Ecology Notes, 5: 854–856
- Berbegal M., Ortega A., Olivares-García C., Armengol J., Jimenez-Diaz R.M., Jimenez-Gasco M.M. 2009. Genetic diversity and host range of *Verticillium dahliae* isolates from artichoke and other vegetable crops in Spain. Plant Disease, 94, 4: 396-404
- Berbegal M., Garzon C.D., Ortega A., Armengol J., Jimenez-Diaz R.M., Jimenez-Gasco M.M. 2011. Development and application of new molecular markers for analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations. Plant Pathology: 1-12
- Brondani R.P.V., Brondani C., Tarchini R., Grattapaglia D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Theoretical and Applied Genetics, 97: 816- 827
- Brown T. A. 2007. Genoms 2. New York, Garland Science Publishing, 55-71
- Burgess A.H. 1964. Hops. London, Leonard Hill, Interscience Publishers: 300 str.

- Callan D.F., Thompson A.D., Shen Y., Philips H.A., Richards R.I., Mulley J.C., Sutherland G.R. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)n microsatellite markers. American Journal of Human Genetics, 52: 922-927
- Cooke D.E.L., Lees A.K. 2004. Markers, old and new, for examining Phytophthora infestans diversity. Plant Pathology, 53: 692–704
- Eise, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. V: Microsatellites – evolution and applications. Goldstein D.B., Schlötterer C. (ur.). Oxford, Oxford University Press: 34-48
- Ellegren H, Primmer C.R., Sheldon B.C. 1995. Microsatellite 'evolution': directionality or bias? Nature Genetics, 11, 4: 360-2
- Estoup A., Cornuet J.M., Rousset F., Guyomard R. 1999. Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: theoretical aspects. Molecular Biology and Evolution, 16:898–908
- Hastie A.C., Heale J.B. 1984. Genetics of *Verticillium*. Phytopathologia Mediterranea, 23: 130-162
- Heale J.B. 2000. Diversification and speciation in *Verticillium*-an overview. V: Advances in *Verticillium*, research and disease management. Tjamos E.C., Rowe R.C., Heale J.B., Fravel D. R. (ur.). St. Paul, Minnesota, APS Press: 1-14
- Jakše J. 2000. Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja (*Humulus lupulus L.*) z mikrosatelitnimi markerji. Magistrsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 89 str.
- Jakše J., Javornik B. 2001. High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus L.*). Plant Molecular Biology Reporter, 19: 217-226
- Karakousis A., Tan L., Ellis D., Alexiou H., Wormald P. J. 2005. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. Journal of Microbiological Methods, 65: 38– 48
- Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E., Subbarao F.V. 2009. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. The Annual Review of Pathology, 47: 39-62

- Karapapa V.K., Bainbridge B.W., Heale J.B. 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. Mycological research, 101:1281–94
- Pegg G.F., Brady B.L. 2002. *Verticillium* Wilts. Wallingford, CABI Publishing: 552 str.
- Litt M., Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. The American Society of Human Genetics, 44: 397-401
- Moller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Research, 20, 22: 6115-6116
- Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. 2007. OEPP/EPPO Bulletin, 37: 528–535
- Radišek S. 2004. Molekularna variabilnost pri glivah (*Verticillium albo-atrum* in *V. dahliae*) in razvoj patotipsko specifičnih markerjev. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, 108 str.
- Radišek S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. 2003. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. Plant Disease, 87: 633-638
- Radišek S. 2001. Analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) z molekulskimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. Magistersko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 61 str.
- Schlötterer C., Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, 20: 211-215
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma, 109: 365-71
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature America, 18: 233-234
- Strand M., Prolla T.A., Liskay R.M., Petes T.D. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature, 365: 274–276

Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Acta agriculturae Slovenica, 95, 2: 183-192

Štajner N., Jakše J., Kozjak P., Javornik B. 2004. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science, 168, 1: 213-221

Taylor J.S., Durkin J.M.H., Breden F. 1999. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. Molecular Biology and Evolution, 16: 567-572

Tautz D., Trick M., Dover G.A. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. Nature, 322: 652–656

This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith X.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1148-1158

Van Burik J.A.H., Schreckhise R.W., White T.C., Bowden R.A., Myerson D. 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. Medical Mycology, 36: 299–303

Verticillium group. 2010. Broad Institute, Cambridge (11. avg. 2011).
http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiDownloads.html (5. avg. 2011)

Verticillium sp. 2011. Warwich.
<http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/wcc/research/disease/verticillium> (20. avg. 2011)

Wagner H.W., Sefc K.M. 1999.
<http://www.boku.ac.at/zag/identity.htm>

Weber J.L., May P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics, 44: 388-396

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Jerneju Jakšetu in somentorju dr. Sebastjan Radišek za vso pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

PRILOG A
pregled alelov za posamezen lokus

lokus	Vsi izolati (94)			V.albo-atrum (63)			V.albo-atrum hmelj (41)			V.albo-atrum drugi (22)			Verticillium dahliae (23)			V.dahliae hmelj (9)			V. dahliae drugi (14)			Verticillium drugi (8)											
	št. alelov	aleli	frekvenca sd	št. alelov	aleli	frekvenca sd	št. alelov	aleli	frekvenca	št. alelov	aleli	frekvenca	št. alelov	aleli	frekvenca sd	št. alelov	aleli	frekvenca	št. alelov	aleli	frekvenca	št. alelov	aleli	frekvenca									
FAM_598	3	188 193 215	0,90411 0,08219 0,0137	0,02437 0,02273 0,00962	3	188 193 215	0,88333 0,1 0,01667	0,02931 0,02739 0,01169	3	188 193 215	0,94872 0,02564 0,02564	2	188 193 215	0,7619 0,2381 /	1	188	100.000	1	188 214 215	1	188 0,11111 0,11111 0,77778	1	188 /	1	188 /								
VIC_959	3	209 214 215	0,60215 0,01075 0,3871	0,03589 0,00756 0,03571	2	209 /	0,87302 215	0,02966 0,12698	2	209 /	0,95122 /	2	209 /	0,72727 /	3	209 214 215	0,04348 0,04348 0,91304	3	209 214 215	0,11111 0,11111 1	/	1	/	1	/								
NED_228	4	110 156 188 216	0,24444 0,01111 0,67778 0,06667	0,03203 0,00781 0,03483 0,01859	2	/	/	/	2	/	/	2	/	/	3	110 156 188 216	0,90000 0,05000 0,05000 0,2381	2	110 /	0,85714 /	2	110 156 188	0,92308 0,07692 0,50000	2	110 /	0,50000							
PET_1004	4	203 204 205 207	0,03571 0,07143 0,88095 0,0119	0,01432 0,01987 0,02499 0,00837	4	203 204 205 207	0,04839 0,06452 0,87097 0,01613	0,01927 0,02206 0,03011 0,01131	3	/	/	3	203 204 205 207	0,13636 0,13636 0,72727 0,025	2	/	/	2	204 205	0,11111 0,88889	2	/	204 205	0,12500 0,87500	1	/	205						
FAM_886	4	131 136 168 171	0,0119 0,71429 0,20238 0,07143	0,03485 0,031 0,01987 0,01987	2	/	/	/	2	/	/	2	/	/	2	/	/	1	/	/	2	131 136	0,33333 0,66667	2	131 136	0,33333 0,66667							
VIC_2756	6	222 223 235 237 239 240	0,26966 0,02247 0,59551 0,01124 0,06742 0,03371	0,03326 0,01111 0,03679 0,0079 0,01879 0,01353	5	222 /	0,03226 235	0,01587 0,80645	4	222 /	0,025 0,9	5	222 /	0,04545 /	2	222 /	0,95652 /	2	222 235	0,88889 0,11111	1	222 /	1	2	/	223 235	0,50000 0,50000						
NED_3507	3	187 193 214	0,32609 0,6087 0,06522	0,03456 0,03598 0,0182	3	187 193 214	0,03175 0,87302 0,09524	0,01562 0,02966 0,02615	3	187 193 214	0,02439 0,95122 0,02439	3	187 193 214	0,04545 0,72727 0,22727	2	187 193	0,95652 0,04348	2	187 /	0,88889 0,11111	1	187 /	1	1	187 /	1							
PET_1468	2	174 190	0,93478 0,06522	0,0182 0,0182	2	174 190	0,90476 0,09524	0,02615	2	174 190	0,97561 0,02439	2	174 190	0,77273 0,22727	2	174 /	1	1	174 /	1	1	174 /	1	174 /	1								
FAM_2390	7	126 149 151 161 172 174 191	0,63218 0,18391 0,05747 0,06897 0,01149 0,01149 0,03448	0,03656 0,02937 0,01764 0,01921 0,00808 0,00808 0,01383	4	126 149 151 161 172 174 191	0,87097 0,01613 0,01131 0,09677 0,02655 /	0,03011 /	3	126 149 151 161 172 174 191	0,95122 /	3	126 149 151 161 172 174 191	0,71429 0,04762 0,22727 0,2381 /	4	126 149 151 161 172 174 191	0,04545 0,63636 0,22222 /	3	126 149 151 172 174 191	0,11111 0,66667 0,22222 /	3	126 149 151 172 174 191	0,11111 0,61538 0,23077 /	3	126 149 151 172 174 191	0,33333 0,33333 0,33333 0,33333							
VIC_3111	4	145 187 194 213	0,01563 0,03125 0,85938 0,09375	0,01096 0,01538 0,03073 0,02576	2	/	/	/	2	/	/	2	/	/	2	145 194 213	0,50000 0,50000 0,25	1	/	/	1	/	187 /	1	187 /	1							
NED_1556	9	105 111 114 157 160 167 182 185 236	0,02353 0,62353 0,01176 0,07059 0,08235 0,14118 0,01176 0,01176 0,02353	0,01163 0,03716 0,00827 0,01964 0,02108 0,02671 0,00827 0,00827 0,01163	4	/	/	/	4	/	/	2	/	/	6	/	/	5	/	1	111 111 114 157 160 167 182 185 236	0,04545 0,04545 0,54545 0,55556 0,22727 0,54545 0,04545 0,04545 0,09091	1	/	/	4	/	1	111 111 114 157 160 167 182 185 236	0,11111 0,11111 0,11111 0,11111 0,11111 0,11111 0,07692 0,11111 0,07692	3	105 111 114 157 160 167 182 185 236	0,50000 0,25000 0,25000 0,25000 0,30769 0,53846 0,07692 0,07692 0,07692
PET_3632	5	204 235 237 240 252	0,01176 0,24706 0,64706 0,02353 0,07059	0,00827 0,03308 0,03665 0,01613 0,01964	3	/	/	/	3	/	/	2	/	/	2	/	/	2	/	1	/	/	2	204 235	0,33333 1 /								

PRILOGA B

binarna mtrika prisotnosti oz. odsotnosti določenega alela – vhodna tabela za program NTSYS

Se nadaljuje

Nadaljevanje

393-91-Vaa-hmelj-B-B	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Kum-Vaa-kumare-SI	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Surf-Vaa-surfinia-SI	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
11077-Vaa-rogovilcek-GB	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
11081-Vaa-krizantema-GB	9	9	9	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
241-82-Vaa-catalpa-IT	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
454-51-Vaa-krompir-GB	9	9	9	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
11066-Vaa-krompir-GB	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
T179-Vaa-parad-GB-AVIR	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
321-91-Vaa-parad-NL	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
ARO1-067-Vaa-parad-GB-VI	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
ARO1-140A-Vaa-parad-GB-1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
ARO1JS1-Vaa-parad-GB	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
PD83-53A-Vaa-parad-NL	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
PD2000-4186a-Vaa-parad-N	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Luc-Vaa-lucerna-GB-VIR	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
41-Vaa-lucerna-CAN	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
314193-Vaa-krompir-AU	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
340646-Vaa-krompir-E	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
392-91-Vaa-lucerna-NL	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
107-Vaa-lucerna-USA	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
JKG2-Vd-catalpa-NL	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
JKG1-Vd-krompir-NL	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	9	9	9	9	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
JKG8-Vd-krompir-NL	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
DJK-Vd-kriz-NL	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MAI-Vd-kriz-NL	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	9	9	9	9	0	0	1	0	1	0	0	9	9	9	0	0	0
Mint-Vd-meta-USA	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
GAJSEK-Vd-hmelj-SI	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PDRENU-Vd-hmelj-SI	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CasD-Vd-hmelj-SI	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
KresD-Vd-hmelj-SI	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
MoD-Vd-hmelj-SI	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ledina-Vd-hmelj-SI	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Oset-Vd-hmelj-SI	9	9	9	0	0	1	9	9	9	9	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
12099-Vd-hmelj-GB	1	0	0	0	0	1	9	9	9	9	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	9	9	9	9	9
12042-Vd-hmelj-GB	1	0	0	0	0	1	9	9	9	9	0	0	1	0	9	9	9	9	1	0	0	0	0	0	0	1	0
PAP-Vd-paprika-SI	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	9	9	9	9	0	0
PAP99-Vd-paprika-SI	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	9	9	9	9	0	0
PAP2008-Vd-paprika-SI	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	9	9	9	9	0	0
PD335-Vd-meta	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	9	9	9	9	9	9	1	0	0	1	0	0	9	9	9	9	0
PD584-Vd-zelje	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	9	9	9	9	0	1	0	0	1	0	0	0	9	9	9	9	0
V-136l-Vd-bombaž	9	9	9	0	0	1	0	0	0	0	9	9	9	9	9	1	0	0	0	1	0	0	9	9	9	9	0
V176l-Vd-bombaž	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	9	9	9	9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
171-80-Vfung-agraricus-NL	9	9	9	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	9	9	9	9	9
110218-Vlong-ogrčica-S	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
PD330-Vlong-zelje	9	9	9	0	0	1	1	0	0	0	9	9	9	9	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

PRILOGA C

Poravnavo zaporedij mikrosatelitnih lokusov 1566 in 1413, mikrosatelitna ponovitev je podčrtana, zvezdica označuje ujemanje

Lokus 1566

>hmelj
TTGTAAAAGNNNGGCCAGTGGCATGGTCCTACAAGGTGCGACACGGATTCCCTCGCGTCTGCTTCTTCTTCTTCTTCTT
>lucerna
TTGTAAAAAGANNGNCCAGTGGCATGGTCCTACAAGGTGCGACACGGATTCCCTCGCATCTGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
***** * *** ***** ***** * ***

>hmelj
CTACTCCTGCTCCGCCGCCGCCTACGCTTCCTGACGAATCGCGACAGGCCGGCCGAGGTCGGCCTCGACCTTGCCTTCTTCTTCTGAGNNNTTGCTG
>lucerna
CTTCTGCTCTGCTCCGCCGCCCTACGCTTCCTGACGAATCTGACAGGCCGGCCGAGGTCGGCCTCGACCTTGCCTTCTTCTTCTGAGNTTGTG
** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****

Lokus 1413

>lucerna CCGCATATCGCACGTTCAAGTCCCTGTCGGCAGTCTCCGCTCTCTCTCTCT
>hmelj CCGCATATCGCACGTTCAAGTCCCTGTCGGCAGTCTCCGCTCTCTCTTCTT

>lucerna CTCACCGCATGGGGTGTACGAGATGCTGC
>hmelj CACCGCATGGGGCGTACGAGATGCTGC
