

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Daša PERKO

**UPORABA MOLEKULARNIH MARKERJEV ZA
DETEKCIJO POVZROČITELJEV VERTICILIJSKE
UVELOSTI HMELJA
(*Verticillium albo-atrum* IN *V. dahliae*) V TLEH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Daša PERKO

**UPORABA MOLEKULARNIH MARKERJEV ZA DETEKCIJO
POVZROČITELJEV VERTICILIJSKE UVELOSTI HMELJA
(*Verticillium albo-atrum* in *V. dahliae*) V TLEH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MOLECULAR MARKERS FOR DETECTION OF
VERTICILLIUM WILT AGENTS (*Verticillium albo-
atrum* and *V. dahliae*) OF HOP IN SOIL**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu na Oddelku za varstvo rastlin.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 16. 6. 2010 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Jerneja Jakšeta, za somentorja dr. Sebastjana Radiška, za recenzenta pa izr. prof. dr. Francija Aca Celarja.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Datum zagovora: 9. 9. 2011

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

DAŠA PERKO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606:632.4:57.052(043.2)
KG	<i>Verticillium</i> spp./hmeljeva uvelost/molekularni markerji/izolacija DNA/PCR/začetni oligonukleotidi
AV	PERKO, Daša
SA	JAKŠE, Jernej (mentor)/RADIŠEK, Sebastjan (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	UPORABA MOLEKULARNIH MARKERJEV ZA DETEKCIJO POVZROČITELJEV VERTICILIJSKE UVELOSTI HMELJA (<i>Verticillium albo-atrum</i> in <i>V. dahliae</i>) V TLEH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 69 str., 30 pregl., 26 sl., 37 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V Sloveniji eno od večjih tveganj hmeljarske pridelave predstavlja karantenska bolezen verticilijska uvelost hmelja, ki jo povzročata talni glivi <i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold in <i>Verticillium dahliae</i> Klebahn. V nalogi smo poiskali najpogosteje uporabljene začetnike v diagnostiki gliv rodu <i>Verticillium</i> in preverili njihovo delovanje, specifičnost in nivo detekcije. Ugotovili smo, da 5 od 14 preizkušenih začetnikov ne deluje na naših vzorcih. V drugem delu naloge smo pridobili vzorce zemlje iz lokacij, kjer je bila najdena in potrjena verticilijska uvelost. Vzeli smo 22 kužnih vzorcev in 4 negativne ter prisotnost oziroma odsotnost gliv rodu <i>Verticillium</i> v vzorcih potrdili še z mikrobiološkim testiranjem. Iz znanstvenih člankov smo povzeli različne protokole za izolacijo DNA iz zemlje, da bi našli najbolj primerno metodo. Prva metoda je temeljila na uporabi stresalnika, kamor se vpnejo epruvete z zemljo in kroglicami. Druga metoda je temeljila na uporabi pestila in možnarja ter dodatka raztopine posnetega mleka v prahu, ki veže nase huminske snovi iz zemlje. Tretja metoda pa je bila uporaba komercialnega kita MoBio, ki prav tako temelji na uporabi stresalnika in kroglic. Prva in tretja metoda sta bili zaradi nezadostne opreme rahlo spremenjeni. Pri direktnem nanosu izolirane DNA na gel se je izkazalo, da je tretja metoda zelo učinkovita, saj je bila celokupna DNA vidna pri vseh vzorcih, prva metoda je bila malo manj učinkovita, saj DNA ni bila vidna pri vseh vzorcih. Druga metoda se je izkazala za popolnoma neprimerno. Sledilo je preverjanje uspešnosti izolacij DNA iz zemlje s paroma splošnih glivnih začetnikov (ITS1/ITS4 in 18sRNA-forward/18sRNA-reverse). Z obema paroma smo uspeli namnožiti vse vzorce DNA izolirane s prvo in tretjo metodo, pri drugi metodi pa do nastanka produktov ni prišlo. Nato smo preizkusili začetnik, specifičen za glive iz rodu <i>Verticillium</i> in začetnike, ki so specifični za <i>Verticillium albo-atrum</i> . Tako smo uporabili začetnike VITS1/VITS2, VR-NL1/VR-NL2, VAITS1/VAITS2 in 9-1Efor/9-1Erev. Izkazalo se je, da sta para VAITS1/VAITS2 ter VR-NL1/VR-NL2 popolnoma neprimerna za namnoževanje DNA gliv rodu <i>Verticillium</i> iz zemlje, saj je prišlo do nastanka produktov tudi pri nekužnih vzorecih. Pri parih VITS1/VITS2 ter 9-1Efor/9-1Erev nikjer ni prišlo do nastanka produktov. Vseeno sta oba para primerna za nadaljne analize in PCR na izolatih iz zemlje. Razlog za neuspeh pomnoževanja je verjetno izolacija, s katero nismo uspešno razbili trajnih organov glive in izolirali iskane DNA. V naslednjih raziskavah bi bilo potrebno pridobiti stresalnik za večje vzorce in narediti ekstrakciji direktno po protokolu. Izvedli bi lahko tudi nested PCR.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 606:632.4:57.052(043.2).
CX *Verticillium* spp./verticillium wilt/molecular markers/DNA isolation/PCR/primers
AU PERKO, Daša
AA JAKŠE, Jernej (mentor)/RADIŠEK, Sebastjan (somentor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
PY 2011
TI MOLECULAR MARKERS FOR DETECTION OF VERTICILLIUM WILT
AGENTS (*Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*) OF HOP IN SOIL
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO XIV, 69 p., 30 tab., 26 fig., 37 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Verticillium wilt of hops, a quarantine disease caused by the soil fungi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold and *Verticillium dahliae* Klebahn, represents one of the major risks of hop production in Slovenia. In the graduation thesis work we searched for the most commonly used primers in the fungal diagnostics of genus *Verticillium* and checked their performance, specificity and level of detection. We discovered that 5 out of 14 tested primers do not conform to our samples. In the second part, the samples of soil were collected from locations where verticillium wilt was found and confirmed. We collected 22 infected and 4 non-infected samples and confirmed the presence or absence of *Verticillium* spp. in samples with microbiological testing. To find the most appropriate procedure, different methods of isolating DNA from the soil were taken from scientific journals. The first method was based on the use of the bead beater, where test tubes with soil and beads were placed. The second method was based on the use of pestle and mortar with the addition of skimmed milk powder, which binds humic substances from the soil. Finally, the third method included the use of a commercial kit MoBio and was also based on the use of the bead beater and beads. The first and the third method were slightly modified due to insufficient equipment. With the direct loading of isolated DNA on the gel the third method was shown to be very efficient, because the entire DNA was visible in all samples. The first method was slightly less efficient, because DNA was not visible in all samples. The second method was proven to be unsuccessful. The testing was followed by checking the effectiveness of DNA isolations from soil with two pairs of general fungal primers (ITS1/ ITS4 and 18sRNA-forward/18sRNA-reverse). With both pairs we were able to amplify all the DNA samples isolated in the first and the third method. However, in the second method the formation of products did not occur. In the next step we used a primer that is specific for fungi of the genus *Verticillium* and primers specific for *Verticillium albo-atrum*. Thus, we used the following primers; VITS1/VITS2, VR-NL1/NL2-VR, VAITS1/VAITS2, and 9-1Efor/9-1Erev. Two pairs were shown to be completely inadequate for DNA amplification of *Verticillium* spp. from the soil due to the formation of products also in uninjected samples; VAITS1/VAITS2 and VR-NL1/VR-NL2. Pairs VITS1/VITS2, and 9-1Efor/9-1Erev did not result in the formation of products. However, both pairs are suitable for further analysis and PCR on the isolates from soil. The reason for ineffective amplification is probably the isolation with which we did not successfully break the resistant organs and isolated the DNA. In the following studies it would be necessary to use a bead beater for larger samples and to execute the extraction as suggested by protocol. We could also perform nested PCR.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 GLIVE RODU <i>Verticillium</i> spp.	2
2.1.1 Zgodovina, taksonomija in nomenklatura	2
2.1.2 Morfološke lastnosti	4
2.1.3 Razvojni krog glive <i>V. albo-atrum</i> in <i>V. dahliae</i>	4
2.1.4 Verticilijska uvelost	6
2.1.4.1 Bolezenska znamenja	6
2.1.4.2 Hmeljeva uvelost	7
2.1.4.3 Diagnostika	8
3 MATERIAL IN METODE	10
3.1 NAMNOŽEVANJE GLIVNIH IZOLATOV	10
3.1.1 Kuhanje trdnega in tekočega gojišča	10
3.1.1.1 Trdno češpljevo gojišče	10
3.1.1.2 Krompirjevo gojišče-PDA	10
3.1.1.3 Selektivno gojišče za izolacijo glive <i>V. albo-atrum</i> iz tal (CH2)	11
3.1.1.4 Tekoče gojišče (general fungal medium-GFM)	12
3.1.2 Precepljanje gliv	13
3.1.2.1 Nacepljanje na trdno gojišče	13
3.1.2.2 Precepljanje gliv na tekoče gojišče	13
3.2 IZOLACIJA DNA IZ MICELIJA GLIV	15
3.2.1 Priprava kemikalij	15
3.2.2 Izolacija	16

3.2.3 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom	17
3.3 PREIZKUS SPECIFIČNOSTI NAJPOGOSTEJE UPORABLJENIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV V DIAGNOSTIKI GLIV <i>V. albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i> IN <i>V. tricorpus</i>	18
3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	20
3.3.2 Preizkus nivoja detekcije začetnih oligonukleotidov	22
3.4 ZEMLJA-MIKROBIOLOŠKO TESTIRANJE IN IZOLACIJA	23
3.4.1 Mikrobiološko testiranje	24
3.4.2 Izolacija DNA iz zemlje	25
3.4.2.1 Metoda 1	25
3.4.2.2 Metoda 2	27
3.4.2.3 Metoda 3	28
3.5 PREVERJANJE USPEŠNOSTI POSTOPKOV IZOLACIJ IZ ZEMLJE S PCR	30
3.5.1 PCR izolatov zemlje z dvema paroma splošnih glivnih začetnih oligonukleotidov	30
3.5.2 PCR izolatov zemlje s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	31
3.5.2.1 Polimeraza Promega	31
3.5.2.2 Polimeraza Novagen	32
3.5.3 Preizkus inhibicije PCR	32
4 REZULTATI	34
4.1 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA IZOLIRANIH VZORCEV	34
4.2 PREIZKUS SPECIFIČNOSTI NAJPOGOSTEJE UPORABLJENIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV V DIAGNOSTIKI GLIV <i>V. albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i> IN <i>V. tricorpus</i>	34
4.2.1 Preizkus nivoja detekcije začetnih oligonukleotidov	40
4.3 ZEMLJA-MIKROBIOLOŠKO TESTIRANJE IN IZOLACIJA	43
4.3.1 Mikrobiološko testiranje	43
4.3.2 Izolacija DNA iz zemlje in preverjanje uspešnosti izolacije	45
4.3.2.1 Metoda 1	45
4.3.2.2 Metoda 2	46
4.3.2.3 Metoda 3	46
4.4 PREVERJANJE USPEŠNOSTI IZOLACIJE S PCR	47
4.4.1 PCR izolatov zemlje s splošnimi začetnimi oligonukleotidi za glive	47
4.4.1.1 PCR izolatov zemlje s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	49
4.4.1.2 Preizkus inhibicije PCR	52

5 RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1 RAZPRAVA	53
5.1.1 Preizkus specifičnosti in nivoja detekcije najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov v diagnostiki gliv <i>V. albo-atrum</i>, <i>V. dahliae</i> IN <i>V. tricorpus</i>	53
5.1.1.1 Preizkus specifičnosti začetnikov	53
5.1.1.2 Nivo detekcije	55
5.1.2 Tri metode izolacije DNA iz zemlje in preverjanje uspešnosti	55
5.1.2.1 Metoda 1	55
5.1.2.2 Metoda 2	56
5.1.2.3 Metoda 3	56
5.1.3 Preverjanje uspešnosti izolacij s PCR	57
5.1.3.1 PCR izolatov zemlje s splošnimi glivnimi začetnimi oligonukleotidi	57
5.1.3.2 PCR izolatov zemlje s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	57
5.2 SKLEPI	58
6 POVZETEK IN SUMMARY	60
6.1 POVZETEK	60
6.2 SUMMARY	62
7 VIRI	66
ZAHVALA	70

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava češpljevega gojišča	10
Preglednica 2: Sestava PDA gojišča.....	10
Preglednica 3: Sestava selektivnega gojišča za izolacijo glive <i>V. albo-atrum</i> (Christen, 1982).....	11
Preglednica 4: Sestava selektivnega gojišča za izolacijo glive <i>V. albo-atrum</i> , drugi del....	11
Preglednica 5: Antibiotiki in ustrezna topila	11
Preglednica 6: Antibiotiki v CH ₂ gojišču	12
Preglednica 7: Sestava tekočega gojišča (GFM) (Kayser, 1992)	12
Preglednica 8: Antibiotika v tekočem gojišču	12
Preglednica 9: Izbrani vzorci <i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i> in <i>V. tricorpus</i> iz genske banke IHPS	13
Preglednica 10: Sestavine za izolacijo DNA	15
Preglednica 11: Sestava SDS pufera (natrijev dodecil sulfat pufer)	15
Preglednica 12: Najpogosteje uporabljeni začetni oligonukleotidi v diagnostiki gliv <i>V. albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i> in <i>V. tricorpus</i> in navedba osnovnih virov	18
Preglednica 13: DNA vzorci za preizkus pomnoževanja začetnih oligonukleotidov	20
Preglednica 14: Sestavine za PCR.....	19
Preglednica 15: Sestava 1,5 % gela	21
Preglednica 16: Sestava TBE pufera	21
Preglednica 17: Količina DNA v reakciji.....	22
Preglednica 18: Uporabljeni vzorci in začetni oligonukleotidi	23
Preglednica 19: Lokacije kužnih in nekužnih vzorcev zemlje	23
Preglednica 20: Ekstrakcijski pufer	25
Preglednica 21: 20% SDS pufer-100 mL	25
Preglednica 22: Polietilenglikol/NaCl-50 mL	25
Preglednica 23: Raztopina mleka	27
Preglednica 24: 10% SDS pufer-100 mL	27
Preglednica 25: Dva para splošnih oligonukleotidnih začetnikov za glive	30
Preglednica 26: Sestavine za PCR.....	32
Preglednica 27: Preverjanje inhibicije	33
Preglednica 28: Koncentracija DNA izoliranih vzorcev	34
Preglednica 29: Uspešnost pomnoževanja preizkušenih začetnih oligonukleotidov	35
Preglednica 30: Število zraslih kolonij pri različnih redčitvah najbolj kužnih izbranih vzorcev.....	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvojni krog glive *V. dahliae* (Berlanger in Powelson, 2000) 6

Slika 2: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VAITS1 in VAITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 35

Slika 3: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VDITS1 in VDITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 36

Slika 4: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VTITS1 in VTITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 36

Slika 5: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VITS1 in ViITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 36

Slika 6: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VR1 in VR2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 37

Slika 7: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VR-NL1 in VR-NL2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042;

4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 37

Slika 8: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VD-RF1 in VD-RF2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 38

Slika 9: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov 9-1Efor in 9-1Erev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 38

Slika 10: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov 9-2E-for in 9-2E-rev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)..... 39

Slika 11: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum* PG2 Rožič 23 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VAITS1 in VAITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp). 40

Slika 12: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata vzorca *V. albo-atrum* PG1 Rečica 21 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VITS1 in VITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp) 41

Slika 13: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum* PG2 Cizej 25 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov 9-1E-for in 9-1E-rev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng

DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp) 41

Slika 14: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov 9-2Ezfor in 9-2Ezrev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp) 42

Slika 15: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. dahliae* Kresnik D z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VD-ITS1 in VD-ITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp) 42

Slika 16: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum*. PG2 Bizjak 24 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VR-NL1 in VR-NL2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp) 42

Slika 17: 0,8 % agarozni gel: Direkten nanos DNA izolirane iz vzorcev zemlje po prvi metodi (Yeates in sod., 1998). M: dolžinski marker (50bp); Številka 1 in 2: vzorec 13 (kužna zemlja); 3 in 4: vzorec 19 (kužna zemlja); 5 in 6: vzorec 19 (kužna zemlja); 7 in 8: vzorec 22 (kužna zemlja); 9 in 10: G (gozd); 11 in 12: T (travnik); 13 in 14: N1 (njiva pred IHPS 1); 15 in 16: N2 (njiva pred IHPS 2); M: marker (50bp)..... 45

Slika 18: 0,8 % agarozni gel: Direkten nanos DNA izolirane iz vzorcev zemlje po drugi metodi (Garcia-Pedrajas in sod., 1999). M: dolžinski marker (50bp); Številka 1: vzorec 13 (kužna zemlja); 2: vzorec 19 (kužna zemlja); 3: vzorec 19 (kužna zemlja); 4: vzorec 22 (kužna zemlja); 5: G (gozd); 6: T (travnik); 7: N1 (njiva pred IHPS 1); 8: N2 (njiva pred IHPS 2); M: marker (50bp) 46

Slika 19: 0,8 % agarozni gel: Direkten nanos DNA iz zemlje izolirane po tretji metodi (komercialni kit MoBio). M: dolžinski marker (50bp); Številka 1: vzorec 13 (kužna zemlja); 2: vzorec 19 (kužna zemlja); 3: vzorec 19 (kužna zemlja); 4: vzorec 22 (kužna

zemlja); 5: G (gozd); 6: T (travnik); 7: N1 (njiva pred IHPS 1); 8: N2 (njiva pred IHPS 2);
M: marker (50bp) 47

Slika 20: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po vseh treh metodah. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje (tretja metoda); 6-10: izolat nekužne zemlje (tretja metoda); 11-15: izolat kužne zemlje (prva metoda); 16-20: izolat nekužne zemlje (prva metoda); 21-25: izolat kužne zemlje (druga metoda); 26-30: izolat nekužne zemlje (druga metoda); N: negativna kontrola (voda); M: dolžinski marker (50bp)..... 48

Slika 21: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po tretji metodi (MoBio) z uporabo para začetnih oligonukleotidov VITS1 in VITS2 in uporabo polimeraze proizvajalca Promega. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp). 49

Slika 22: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po prvi metodi z uporabo para začetnih oligonukleotidov VAITS1 in VAITS2 in uporabo polimeraze proizvajalca Novagen. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum*. PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp). 50

Slika 23: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po tretji metodi z uporabo para začetnih oligonukleotidov 9-1Efor in 9-1Erev in uporabo polimeraze proizvajalca Novagen. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum*. PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp). 50

Slika 24: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po tretji metodi z uporabo para začetnih oligonukleotidov VR-NL1 in VR-NL2 in uporabo polimeraze proizvajalca Promega. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M: dolžinski marker (50bp). 51

Slika 25: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA, ki je bila dodana neredčenim izolatom kužne zemlje (metoda 3), z uporabo začetnikov VR-NL1 in VR-NL2. M: dolžinski marker (50bp); Številka 1: izolat zemlje + 0,001 ng DNA; 2: izolat + 0,01 ng; 3: izolat + 0,1 ng; 4: izolat + 1 ng; 5: izolat + 5 ng; 6: izolat + 10 ng; 7: izolat + 20 ng; N: negativna kontrola (voda); M: dolžinski marker (50bp). 52

Slika 26: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA, ki ja bila dodana izolatom kužne zemlje, redčene 1:100 (metoda 3), z uporabo začetnikov VR-NL1 in VR-NL2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: izolat zemlje + 0,001 ng DNA; 2: izolat + 0,01 ng; 3: izolat + 0,1 ng; 4: izolat + 1 ng; 5: izolat + 5 ng; 6: izolat + 10 ng; 7: izolat + 20 ng; N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp). 52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	Polimorfizem dolžine pomnoženih restriktivskih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
bp	Bazni par
CH2	Selektivno gojišče za izolacijo glive <i>V. albo-atrum</i>
EDTA	Etilendiamintatraocetna kislina-dinatrijeva sol
HCl	Klorovodikova kislina
IHPS	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
ITS	Medgenska regija, ki ločuje gene ribosomske RNA (ang. Internal Transcribed Spacer)
K ₂ HPO ₄	Dikalijev fosfat
KCl	Kalijev klorid
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnezijev sulfat
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	Natrijev borat
NaAc	Natrijev acetat
NaCl	Natrijev klorid
NaOH	Natrijev hidroksid
PCNB	Pentacloronitobenzen
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PDA	Krompirjevo gojišče (ang. Potato Dextrose Agar)
PG1	Blaga oblika hmeljeve uvelosti
PG2	Letalna oblika hmeljeve uvelosti
RAPD	Tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA (ang. Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Polimorfizem dolžine restriktivskih fragmentov (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism)
SDS	Natrijev dodecil sulfat
TBE	Tris-boratni-EDTA elektroforetski pufer
Tp	Temperatura pripenjanja začetnih oligonukleotidov
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan-klorovodikova kislina

1 UVOD

Eno od pomembnejših tveganj hmeljarske pridelave predstavlja karantenska bolezen verticilijska uvelost hmelja, ki jo povzročata talni glivi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn. Glivi v rastlino prodreta preko korenin, okužba pa se nato širi v prevajalno tkivo, kjer z izločanjem hidrolitičnih encimov, toksičnih glikopeptidov in prisotnostjo micelija motita preskrbo celic z vodo in povzročata odmiranje tkiva. V odmrlem tkivu glivi tvorita trajne organe, ki se s propadom rastline ali njenih delov sprostijo v tla in so del naslednjih infekcijskih ciklov (Fradin in Thomma, 2006; Pegg in Brady, 2002).

Ker glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* s trajnimi organi preživita v tleh tudi po več let, je eden izmed pomembnih ukrepov za nadaljevanje pridelave na uničenih hmeljiščih eliminacija talnega infekcijskega potenciala. Ukrep se izvaja v obliki obvezne 4 letne karantenske premene z gojenjem negostiteljskih rastlin kot so npr. žita ali druge trave.

Določitev uspešnosti karantenske premene je zelo pomembna pred ponovno zasaditvijo nasada. Na ta način se lahko pridelovalec izogne nepotrebнемu tveganju nastanka novih izbruhov bolezni in se na osnovi te informacije tudi odloči o izbiri primerne sorte ali izvajanju dodatnih ukrepov. V ta namen se uporablajo večinoma mikrobiološke diagnostične analize za detekcijo gliv iz rodu *Verticillium* v tleh, katerih slabost se največkrat izraža v dolgotrajnosti postopkov in nezmožnosti določanja patotipov.

V zadnjem desetletju se intenzivno razvijajo metode za testiranja tal, ki temeljijo na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki ponujajo mnogo hitrejšo analizo, visok nivo detekcije in patotipsko specifičnost analize. V okviru diplomskega dela smo v prvem delu preizkusili specifičnost PCR namnoževanja najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov za detekcijo omenjenih gliv z uporabo DNA izolirane neposredno iz micelija. V drugem delu pa smo PCR detekcijo preizkusili na DNA iz zemlje, kjer je bila najdena in potrjena verticilijska uvelost, izolirani z različnimi ekstrakcijskimi postopki.

V diplomski nalogi smo tako potrdili oziroma ovrgli specifičnost začetnih oligonukleotidov za detekcijo gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, poskušali najti najprimernejšo ekstrakcijo za izolacijo dovolj kakovostne DNA iz tal in poskušali potrditi prisotnost *V. albo-atrum* v naravno kužnih tleh.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE RODU *Verticillium* spp.

2.1.1 Zgodovina, taksonomija in nomenklatura

Rod *Verticillium* je prvi opisal nemški mikolog Ness von Esenbeck (1816, cit. po Radišek, 2004a), ki je zaradi značilnih vretenastih konidioforov ime rodu izpeljal iz latinske besede *verticillus* ali vretence. Vrstam iz rodu *Verticillium* je edina skupna lastnost tvorba vretenastih konidioforov s fialidami, na katerih se v sluzastih sferičnih glavicah nahajajo trosi.

Dokončna potrditev rodu *Verticillium* sovpada s prvim opisom gline *V. albo-atrum*, ki sta jo nemška znanstvenika Reinke in Berthold (1879, cit. po Radišek, 2004a) izolirala iz uvelikih rastlin krompirja. Leta 1913 je znanstvenik Klebahn (1913, cit. po Radišek, 2004a) iz obolelih dalij izoliral glivo, ki jo je poimenoval *V. dahliae* in ki za razliko od *V. albo-atrum*, katera tvori trajni micelij, tvori mikrosklerocije.

V rod *Verticillium* spadajo talne glive, ki so rastlinski patogeni in povzročajo verticilijsko uvelost rastlin v zmernih in subtropskih zemeljskih regijah. Skupno lahko te glive okužujejo več kot 300 vrst gostiteljskih rastlin iz 43 družin, večinoma dvokaličnice, med katerimi je tudi veliko ekonomsko pomembnih rastlin, kot so krompir, oljka, bombaž in hmelj. Poleg teh obstajajo tudi vrste, ki lahko parazitirajo tudi žuželke, nematode, ostale glive ali pa živijo kot talni saprofiti (Fradin in Thomma, 2006; Pegg in Brady, 2002).

Na osnovi molekularnih analiz te glive uvrščamo v kraljestvo gliv (Fungi), deblo Ascomycota, poddeblo Pezizomycota, razred Sordariomycete in red Phyllachorales (Fradin in Thomma, 2006).

Rod *Verticillium* se na osnovi morfoloških značilnosti deli na 4 sekcije in sicer *Prostrata*, *Albo-erecta*, *Verticillium* in *Nigrescentia*, za katero so značilne vrste s temnimi trajnimi organi, vključuje pa predvsem fitopatogene vrste gliv, od katerih sta najpomembnejši *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (Gams, 1988; Gams in Van Zaayen, 1982; Seifert in Gams, 2001).

V rod je bilo do nedavnega uvrščeno šest pomembnejših fitopatogenih vrst, katere se med sabo ločujejo po trajnih organih: *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* in *V. theobromae*. Med temi vrstami izstopata *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, tako po razširjenosti in okužbah rastlin, kot tudi po zastopanosti v raziskovalnih

člankih. Ostale vrste so manj patogene in redkeje povzročajo bolezenska stanja (Pegg in Brady, 2002).

Pegg in Brady (2002), sta v svoji monografiji predlagala še eno vrsto in sicer *V. fungicola*, vendar nista podala dovolj trdnih dokazov za njen obstoj (Barbara in Clewes, 2003). Gliva *V. fungicola* je danes na podlagi raziskav uvrščena v rod *Lecanillium* (Zare in Gams, 2008).

Nedavni prehod vrst *V. nigrescens* in *V. theobromae* v rod *Gibellulopsis* in *Musicillium* pa je zmanjšal število fitopatogenih vrst rodu *Verticillium* na 4 (Zare in sod., 2007).

Še vedno pa ostajajo odprta vprašanja glede števila vrst in uvrščanja določenih izolatov v te vrste, saj na podlagi morfoloških lastnosti (trajni organi) in molekularnih analiz (markerji) velikokrat določenega izolata ne moremo uvrstiti v neko vrsto. Odprto ostaja tudi vprašanje o delitvi *V. albo-atrum* na dve skupini in sicer Grp1 in Grp2 (Barbara in Clewes, 2003).

V diplomski nalogi smo se v prvem delu osredotočili na glive *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus*, v drugem delu (ekstrakcija DNA iz zemlje in PCR) pa le na *V. albo-atrum*, saj ta gliva predstavljata velik problem na slovenskih hmeljiščih, kjer v večjem obsegu kot *V. dahliae* povzroča hmeljevo uvelost. Obe glivi imata traheomikozni način parazitizma, s katerim preko koreninskega sistema rastline kolonizirata prevodno tkivo in povzročata uvelost ter v večini primerov propad rastline (Radišek, 2004a). Trenutno ni znano nobeno fitofarmacevtsko sredstvo, s katerim bi se dalo preprečiti okužbo ali uspešno zatreći napredovanje bolezni že okuženih rastlin.

2.1.2 Morfološke lastnosti

Hife in konidiofori pri rodu *Verticillium* so večinoma haploidni. Večina celic je enojedernih, lahko pa prihaja do večjedernih koncev hif. Hife so perforirane, vendar do prehajanja jeder preko stene ne prihaja (Pegg in Brady, 2002).

Micelij gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* je bel in puhist in je sestavljen iz hialinih ali steklasto obarvanih hif debeline 2 do 4 µm. Na teh hifah nastajajo značilni vretenasti konidiofori, po katerih je rod dobil ime. Ti imajo 1 do 3 vretenca v razdalji 30 do 40 µm iz katerih poganja 1 do 5 fialid, ki so nosilke nastalih trosov ali konidiijev (Smith, 1965).

Pri *V. albo-atrum* so konidiofori pogosto sekundarno razvejani, dolžine od 100 do 300 µm in melanizirani pri osnovi, kar je značilno samo za to fitopatogeno vrsto. Gliva *V. dahliae* tvori krajše in manj razvejane konidiosfore (Smith, 1965). Konidiji so večinoma enocelični in elipsoidne oblike, pri glivi *V. albo-atrum* velikosti 3,5-10,5 x 2-4 µm, medtem ko so pri *V. dahliae* v povprečju manjši in dosežejo velikost 2,5-8 x 2-4 µm (Hawksworth in Talboys, 1970a,b, cit. po Radišek, 2004a.)

Glavne morfološke lastnosti gliv ter razlike med njimi se kažejo v tvorbi trajnih organov. *V. albo-atrum* tvori trajni micelij temno rjave do črne barve, ki nastane z združevanjem nabreklih melaniziranih hif, širine od 3 do 7 µm. *V. dahliae* tvori izključno mikrosklerocije, ki nastajajo z nabrekanjem in septiranjem hif, kar vodi v povečevanje celic do sferične oblike in biosintezo melaninskih granul v celičnih stenah (Griffiths, 1970, cit. po Radišek, 2004a). Gliva *Verticillium tricorpus*, ki je šibkejši fitopatogen, tvori različne oblike trajnih organov, trajni micelij, mikrosklerocije in klamidiospore, *V. nubilum* pa tvori le klamidiospore (Barbara in Clewes, 2003).

Trajni organi so pogosto uporabljeni za hitro določitev vrste glive, vendar pa pride pri gojenju na umetnih gojiščih pogosto do izgube sposobnosti tvorbe trajnih organov in s tem pigmenta melanina. Temu pravimo pojav hialinih oblik kultur izolatov (Barbara in Clewes, 2003). Micelij hialinih oblik je še bolj puhost in bel, konidiofori so manj izraziti, tudi stopnja sporulacije je nižja, vendar pa izolati obdržijo isto stopnjo virulence in patogenosti (Pegg in Brady, 2002).

2.1.3 Razvojni krog glive *V. albo-atrum* in *V. dahliae*

Glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* sta talna patogena, ki okužita rastline preko koreninskega sistema in se širita v rastlini po prevodnem tkivu. *Verticillium dahliae* povzroča monociklično bolezen, kar pomeni, da v eni rastni sezoni rastline pride le do enega razvojnega kroga glive in tvorbe inokulum, pri čemer *V. albo-atrum* lahko na nekaterih

rastlinah, kot je lucerna, tvori konidije na okuženi rastlini, ki se lahko prenašajo z zračnimi tokovi in tako povzročijo nove okužbe (Jimenez-Diaz in Millar, 1988). Tako je lahko bolezen povzročena z *V. albo-atrum* tudi policiklična (Fradin in Thomma, 2006).

Razvojni krog obeh vrst je zelo podoben in ga lahko razdelimo na dormantno, parazitsko in saprofitsko fazo.

Med nekrozo rastlinskega tkiva ali njeno senescenco gliva vstopi v saprofitsko fazo, kjer se prehranjuje z organskimi ostanki odmrle rastline. Sledi dormantna faza. To je faza trajnih organov v tleh, s katerimi lahko glive preživijo vrsto let, do njihovega nastanka pa pride v odsotnosti gostiteljskih in negostiteljskih rastlin. Gliva *V. albo-atrum* lahko s trajnim micelijem preživi v tleh 2 do 5 let (Keyworth, 1942, cit. po Radišek, 2004a), *V. dahliae* pa z mikrosklerociji od 10 do 15 let (Fradin in Thomma, 2006).

Do klitja trajnih organov in prestopa glive v parazitsko fazo pride v začetku vegetacijske dobe ob stimulaciji z rastlinskimi izločki, verjetno zaradi dostopnosti dušika in ogljika v rizosferi rastlin. Do stimulacije pride tako z gostiteljskimi kot tudi z negostiteljskimi rastlinami, kar kaže na naspecifičnost stimulacije stimulacijskega vpliva korenin. (Moll in sod., 1995, Fradin in Thomma, 2006). Zaradi nizke saprofitske stopnje razvoja v tleh je za vzpostavitev infekcije ključna neposredna bližina korenin, preko katerih glive okužijo rastlino (Sewell, 1959, cit. po Radišek, 2004a).

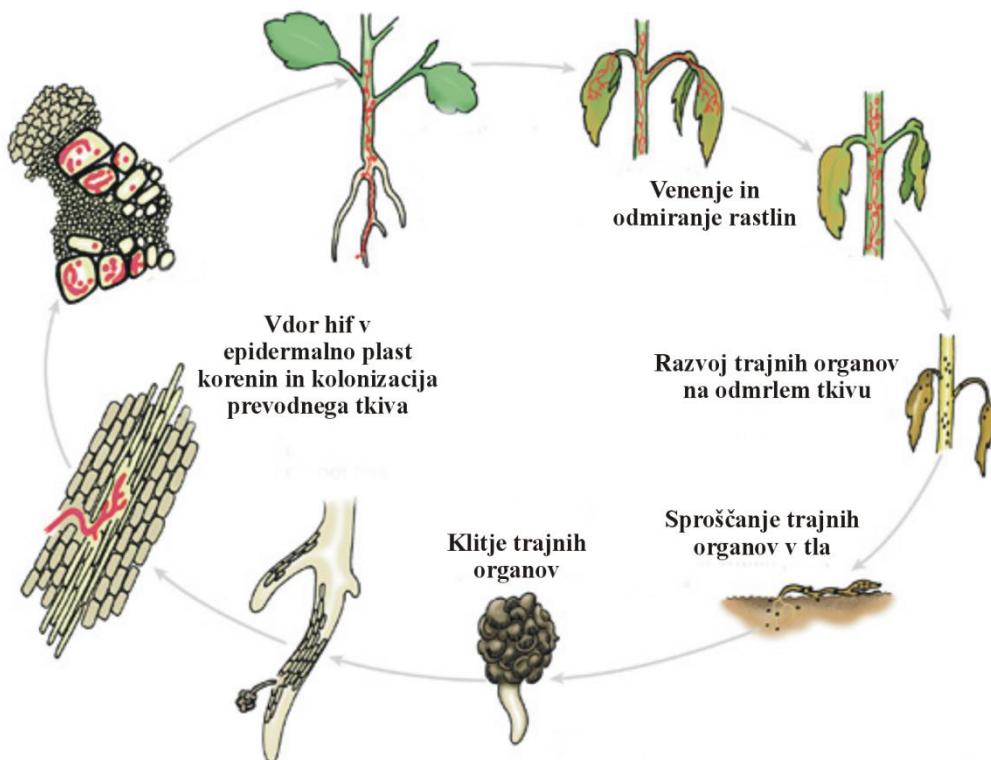
Iz trajnih organov začnejo poganjati hife, ki prodrejo v rastlino preko koreninskega vrha ali cone elongacije (Klosterman in sod., 2009). Hife najprej prečkajo epidermis, nato pa še endodermis, ki igra vlogo mehanske zaščite rastlin. Do tega lahko pride le, ko še endodermis ni dovolj razvit, kar je na vrhu korenine, ali pa kjer je prišlo do raznih poškodb, tako mehanskih kot takšnih, povzročenih s strani škodljivcev, kot so nematode (Fradin in Thomma, 2006). Preko pericikla na koncu hife prodrejo v ksilem (Radišek, 2004a). Penetracija in vzpostavitev infekcije traja pri večini gostiteljskih rastlin do 4 dni. Okužbe korenin, kjer gliva ne vzpostavi sistemične okužbe do prevodnega tkiva, največkrat propadejo (Pegg in Brady, 2002).

Ko je hifa enkrat v vaskularnem tkivu, začne tvoriti konidije. Konidiji se začno raznašati po prevodnem tkivu s transpiracijskim tokom in se nato ujamejo na mestih nepopolno perforiranih žil ali v raznih žilnih votlinah. Tam začno kliti in tvoriti micelij. Hife s pomočjo hidrolitičnih encimov prodirajo v sosednje žile in tako nadaljujejo kolonizacijo. Ponovno se začne tvorba novih konidijev, ki lahko vodi v nadaljno kolonizacijo prevodnega tkiva (Fradin in Thomma, 2006).

Vrste rodu *Verticillium* v prevodnem tkivu koloniziranih rastlin izločajo vrsto pomembnih hidrolitičnih encimov, ki igrajo pomembno vlogo pri razgradnji celične stene in membrane

rastlinskih celic. Eni pomembnejših so pektinaze, ki naj bi imeli ključno vlogo pri patogenezi gliv (Fradin in Thomma, 2006). Ostali encimi, kot so polisaharidaze, proteinaze in celulaze prav tako služijo za delno razgradnjo celičnih sten in membran, preko katerih gliva dobi potrebna hranila za rast (Pegg, 1989). Dokazano je bilo, da je stopnja tvorbe teh encimov sorazmerna z virulenco glive (Carder in sod., 1987). Poleg tega je dokazano, da glive izločajo v transpiracijski tok toksične glikolipide, ki povzročajo odmiranje tkiva ter s samo prisotnostjo motijo preskrbo celic z vodo (Pegg in Brady, 2002).

Talboys je dokazal (1972, cit. po Radišek, 2004a), da glive kljub s hranili revnim prevodnim sistemom ne kolonizirajo ostalih tkiv, dokler gostiteljska rastlina ali del nje ne propade.



Slika 1: Razvojni krog glive *V. dahliae* (Berlanguer in Powelson, 2000)

2.1.4 Verticilijska uvelost

2.1.4.1 Bolezenska znamenja

Znamenja okužbe z glivo rodu *Verticillium* se razlikujejo tako od vrste povzročitelja kot tudi od gostiteljske rastline. Vseeno pa obstajajo neki splošni simptomi kot so venenje rastlin z začetkom v spodnjem delu rastline, nazadovanje v rasti, pojav kloroze in nekroze

listov, odpadanje listov in nastanek nekrotičnega prevajalnega tkiva (Fradin in Thomma, 2006; Pegg in Brady, 2002).

Med bolezenska znamenja lahko uvrstimo tudi obrambne reakcije rastlin, do katerih prihaja med procesom razvoja bolezni. V začetni fazi bolezni je ena od posledic obrambe nastanek ligninskih gomoljčkov, do katerih pride zaradi utrjevanja celičnih sten z ligninom in podobnimi snovmi. Vzrok utrjevanja je reakcija metabolično aktivnih epidermalnih celic, ki reagirajo na prisotnost penetracijskih hif. V teh gomoljčkih hifa propade ali pa se njena rast upočasni (Griffiths, 1971, cit. po Radišek, 2004a; Talboys, 1972, cit. po Radišek, 2004a).

Ko micelij prodre v prevodno tkivo, pride do nastanka konidijev, ki s pomočjo transpiracijskega toka potujejo po žilah, kjer nato pride do ujetja na mestih nepopolno perforiranih žil in lamelah. Takrat rastline začno tvoriti gel, sestavljen iz pektinskih in hemiceluloznih snovi na zgornjem delu žilnih lamel. To povzroča dodatno utrjevanje in preprečevanje penetracije lamel s hifami (Beckman in Zaroogian, 1967). Sosednje parenhimske celice tvorijo skozi neutrjene stranske lamele balonom podobne izrastke (tile), ki povzročijo še dodatno zaprtje žil ali tilozo.

Popolna blokada žil tako lahko omeji ali ustavi napredovanje bolezni, obenem pa povzroči tudi motnje transpiracijskega toka. Rastlina to rešuje s hiperplazijo, tvorbo novega prevodnega tkiva, kar lahko na zunaj vidimo kot nenormalno odebeljena stebla rastlin (Talboys, 1972, cit. po Radišek, 2004a).

2.1.4.2 Hmeljeva uvelost

Hmeljevo uvelost povzročata glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, pri čemer prva povzroča večji delež bolezenskih izbruhov. Bolezen pri nas predstavlja velik gospodarski problem, saj močno zmanjuje pridelek, poleg tega pa je ob infekciji potrebno opraviti 4 letno karantensko premeno, kar pomeni, da za ta čas na okuženem hmeljišču ni dovoljen ponoven nasad hmelja, ampak je potrebno gojiti negostiteljske rastline. Vzrok za to je tvorba trajnih organov, s katerimi glive preživijo v tleh vrsto let. Infekcijski potencial v tleh hitro raste, bolezen pa se širi znotraj nasada in izven njih. Bolezen tako povzroča velik izpad pridelka in prihodka. Problem je toliko večji, ker za enkrat še ne poznamo učinkovitega fitofarmacevtskega sredstva, ki bi preprečil okužbo ali pozdravil že okuženo rastlino.

Bolezensko stanje je odvisno od virulence povzročitelja, odpornosti kultivarja in abiotiskih dejavnikov. Na hmelju se pojavljata dve oblici bolezenskih znamenj in sicer blaga in letalna oblika. Ključna razlika med njima je, da letalna oblika povzroči odmiranje rastlin,

pri blagi obliki pa si rastline opomorejo in naslednje leto normalno odženejo. Gliva *V. albo-atrum* lahko inducira obe obliki, kar je odvisno od virulence vrste (patotip) in občutljivosti oziroma odpornosti rastline hmelja. *V. dahliae* lahko povzroči le blago obliko hmeljeve uvelosti na občutljivih sortah (Radišek, 2004a).

Bolezenska znamenja, ki jih lahko srečamo pri obeh oblikah, so rumenenje in venenje listov, ki se začne na spodnjem delu rastline in se širi navzgor. Na prizadetih listih se pojavi nekrotično tkivo, predvsem na robovih med listnimi žilami. Pri hmeljevi uvelosti je značilno, da se robovi prizadetih listov obrnejo navzgor in ob rahlem dotiku odpadejo. Pomembno znamenje hmeljeve uvelosti je tudi rjavo nekrotično prevajalno tkivo, ki ga lahko vidimo ob prerezu trte na spodnjem delu rastline (Talboys, 1985a,b, cit. po Radišek, 2004a).

Prvi pojav hmeljeve uvelosti so odkrili leta 1924 v Angliji, pri čemer je bil identificiran povzročitelj *V. albo-atrum* (Harris, 1927, cit. po Radišek, 2004a). Sprva se je bolezen izrazila v blagi obliki in ni povzročila večje škode, leta 1933 pa je že prišlo do resnejših izbruhovalnih bolezni v novi letalni obliki *V. albo-atrum* (Isaac in Keyworth, 1948, cit. po Radišek, 2004a).

V Sloveniji so pojav prvič zasledili leta 1974 in sicer v blagi obliki. Povzročitelja sta bila *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (Dolinar, 1975). V naslednjih letih uvelost ni povzročila resnejše škode. V letu 1997 pa se je hmeljeva uvelost pojavila na Gomilskem v Savinjski dolini v bolj virulentni, letalni obliku, ki se je zelo hitro razširila na sosednja hmeljišča. Na osnovi bolezenskih znamenj, odkritja primarnega žarišča in rezultatov patogenih testov ter molekularnih analiz, je bil kot povzročitelj letalne oblike potrjen nov virulentnejši patotip glive *V. albo-atrum* (Radišek in sod; 2003; Radišek, 2004a). Bolezen je danes razširjena na glavnih območjih zahodnega dela spodnje Savinjske doline in predstavlja resno grožnjo pridelovanja hmelja v Sloveniji (Radišek 2004a,b).

2.1.4.3 Diagnostika

Ključen pomen pri preprečevanju hitrega širjenja verticilijske uvelosti ima hitra ter zanesljiva diagnostika, ki pa zahteva pregled velikega števila vzorcev v zelo kratkem času. Klasična diagnostika temelji na uporabi petrijevk, selektivnih gojišč, morfoloških lastnosti, patogenosti, razlikah v biokemičnih lastnostih in analizah vegetativne kompatibilnosti. Problem teh metod je, da so delovno zahtevne, dolgotrajne in nezanesljive, saj so podvržene vplivom okolja. Ker je za določitev vrst načeloma potrebna 2-3 tedenska inkubacija, velikokrat pride do okužbe z različnimi bakterijskimi in glivnimi vrstami, kar močno otežuje identifikacijo. Z uporabo selektivnih gojišč ne moremo določiti patotipa glive, lahko pa ga s patogenimi testi, kar pa spet traja 2-3 mesece (Radišek, 2004a).

Vpeljava molekularnih metod in PCR tehnologija predstavlja velik napredek v diagnostiki gliv. Razvite so bile metode tako za kvalifikacijo kot za kvantifikacijo gliv (Moukhamedov in sod., 1994). Prvi diagnostični testi za *Verticillium* na podlagi PCR so bili razviti na podlagi malih razlik v zaporedju baz v ITS regijah v ribosomalnih genih. S pomočjo teh razlik so bili razviti začetni oligonukleotidi, s katerimi se je dalo razlikovati med glavnimi predstavniki patogenih gliv rodu *Verticillium*, *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* (Nazar in sod., 1991; Robb in sod., 1993). Hu in sod.(1993) so uspešno uporabili metodo PCR in začetne oligonukleotide za detekcijo gliv rodu *Verticillium* v rastlinah. Volossioik in sod. (1995) so prvi objavili direktno detekcijo glive *V. dahliae* v tleh (Radišek, 2004a).

Čeprav je bil razvoj diagnostične metode za detekcijo gliv v tleh (Volossioik in sod., 1995) uspešen, še vedno obstaja pri PCR pomnoževanju DNA vzorcev, izoliranih iz rastlinskih tkiv in tal ogromno omejitev. Glavni problem predstavlja izolirane inhibitorne snovi, kot so na primer huminske kisline, ki močno inhibirajo potek PCR. Kot najenostavnnejša rešitev je bila predlagana redčitev vzorcev in s tem inhibitornih snovi (Heinz in Platt, 2000). Druga težava je izolacija DNA. Zaradi ogromno nečistoč in inhibitornih snovi v zemlji je potrebna uporaba večje količine organskih topil, kar pomeni večje količine nevarnih odpadkov in tveganje za delavca. Drugo vprašanje pri izolaciji je uporaba najprimernejšega in najučinkovitejšega mehanskega tretiranja zemlje in posledično celic. Problem predstavlja predvsem trajni organi, katere glive rodu *Verticillium* tvorijo in so zelo odporni na mehansko tretiranje. Heinz in Platt, 2000, ter Robb in Nazar, 1995, so uporabili tekoči dušik in pestilo ter možnar. Yeates in sod., 1998 in Bürgmann in sod., 2000, so uporabili bead beater (stresalnik s kroglicami), v katerega so vložili vzorce z dodanimi steklenimi ali keramičnimi kroglicami. Omenjena je bila tudi uporaba sonifikacije in proteinaz. V mnogih znanstvenih člankih je omenjena uporaba posnetega mleka v prahu, kateri se doda v začetku izolacije. Mleko veže nase huminske kisline in s tem preprečuje njihovo inhibitorno delovanje.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAMNOŽEVANJE GLIVNIH IZOLATOV

3.1.1 Kuhanje trdnega in tekočega gojišča

Pripravili smo tri vrste trdnih gojišč in eno tekoče gojišče.

3.1.1.1 Trdno češpljevo gojišče

Najprej smo pripravili češpljev sok. Izkoščičili smo zrele češplje in jih zmleli s paličnim mešalnikom. S tehnicco (Metler Toledo, tip PB3002-S) smo zatehtali 100 g zmletih češpelj in jih prelili z 1 L destilirane vode. Kuhali smo do zavretja in nato pustili vreti še eno uro. Brozgo smo precedili skozi cedilo, da smo dobili le sok. Sok smo prelili v 100 ml centrifugirke in ga do uporabe shranili na -20 °C.

Nato smo pripravili gojišče iz sestavin, navedenih v preglednici 1.

Preglednica 1: Sestava češpljevega gojišča

Sestavine	Količine za 1 L gojišča	Končna koncentracija
Češpljev sok	100 mL	10 %
Laktoza	5 g	15 mM
Kvasni ekstrakt	1 g	0,1 %
Agar-agar	15 g	1,5 %

Sestavine smo zatehtali ali izmerili in jih stresli oziroma zlili v merilno čašo. Dolili smo destilirano vodo do enega litra. Čašo smo dali na magnetno mešalo (Ika Werke, Yellowline, MSH Basic) in mešali, dokler se sestavino niso raztopile. Gojišče smo zlili v SCHOTT-ove steklenice, katere smo opremili z avtoklavirnim trakom in označili. Zamašek smo rahlo privili in dali steklenice v avtoklav. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,3 bar (Avtoklav, Systec 3870 ELV).

3.1.1.2 Krompirjevo gojišče-PDA

Preglednica 2: Sestava PDA gojišča

Sestavine	Količine za 1 L gojišča	Končna koncentracija
Potato dextrose agar (Proizvajalec Fluka Analytical)	30 g	3 %

Zatehtali smo PDA (preglednica 2), ga stresli v čašo, dolili destilirano vodo do enega litra in nekaj minut mešali na magnetnem mešalu. Gojišče smo zlili v označene SCHOTT-ove steklenice, rahlo privili zamašek in jih dali v avtoklav. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,3 bar.

3.1.1.3 Selektivno gojišče za izolacijo glice *V. albo-atrum* iz tal (CH2)

Preglednica 3: Sestava selektivnega gojišča za izolacijo glice *V. albo-atrum* (Christen, 1982)

Sestavine	Količine za 1 L gojišča	Končna koncentracija
K ₂ HPO ₄	1 g	5,7 mM
KCl	0,5 g	6,7 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g	2 mM
Fe-Na-EDTA	0,01 g	0,02 mM
L-Asparagine brezvodni	2 g	15 mM
L-(–)-Sorbose	2 g	11 mM
Agar-agar	15 g	1,5 %

Vse sestavine navedene v preglednici 3 smo zatehtali in jih stresli v čašo z destilirano vodo. Raztopili smo vse sestavine in umerili pH na 5,7 s fosforno kislino (H₃PO₄) (Hanna Instruments pH 211, Microprocessor). Dodali smo še destilirano vodo do enega litra. Gojišče smo zlili v ustrezno označene SCHOTT-ove steklenice, nato smo rahlo privili zamašek in jih dali v avtoklav. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,3 bar.

Po končanem avtoklaviranju smo gojišču dodali še naslednje sestavine (preglednica 4).

Preglednica 4: Sestava selektivnega gojišča za izolacijo glice *V. albo-atrum*, drugi del

Sestavine	Količine za 1 L gojišča	Končna koncentracija
PCNB	1 g	0,1 %
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	1 g	0,1 %
Ox-bile	0,5 g	0,05 %

Predhodno smo pripravili raztopine antibiotikov. Zatehtali smo 1 g antibiotika in ga raztopili v 10 mL ustrezne topila (preglednica 5). Dobili smo koncentracijo 100 mg/mL. Nato smo raztopino antibiotika s sterilno brizgo in 0,2 µm filtrom prefiltrirali v sterilne 1,5 mL epruvete in jih zamrznili do uporabe.

Preglednica 5: Antibiotiki in ustrezna topila

Antibiotiki	Topilo
Streptomicin sulfat	voda
Kloramfenikol	etanol
Klortetraciklin hidroklorid	1M NaOH

Preglednica 6: Antibiotiki v CH2 gojišču

Antibiotiki	Količine za 1 L gojišča	Končna koncentracija
Streptomycin sulfat	500 µL	50 mg/L
Kloramfenikol	500 µL	50 mg/L
Klortetraciklin hidroklorid	500 µL	50 mg/L

Po končanem avtoklaviranju smo vsa tri gojišča ohladili na 50-60 °C. Brezprašno komoro (Telstar, Biostar) smo sčistili z alkoholom, si pripravili petrijevke in za 15 minut prižgali UV luč. Gojišču smo dodali antibiotike (preglednica 6). Gojišče smo nato sterilno razlili. Petrijevke smo ustrezno označili, pustili čez noč, da so se gojišča strdila, nato pa jih shranili na 4 °C.

3.1.1.4 Tekoče gojišče (general fungal medium-GFM)

Preglednica 7: Sestava tekočega gojišča (GFM) (Kayser, 1992)

Sestavine	Količine za 1 L gojišča	Končna koncentracija
Pepton	2 g	2 %
Kvasni ekstrakt	2 g	2 %
Glukoza	20 g	111 mM
Kalijev nitrat	1 g	9,9 mM

Vse sestavine, navedene v preglednici 7, smo zatehtali in jih stresli v merilno čašo z destilirano vodo. Na magnetnem mešalu smo mešali, dokler se vse sestavine niso raztopile. Dodali smo še destilirano vodo do enega litra. Gojišče smo prelili v reagentno steklenico in jo ustrezno označili. Rahlo smo privili zamašek in dali gojišče avtoklavirat skupaj z erlenmajericami, katere smo kasneje uporabili za precepljanje gliv na tekoče gojišče. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,3 bar. Preden smo ohlajeno tekoče gojišče razlili v erlenmajerice, smo mu v sterilnih pogojih dodali še antibiotika (preglednica 8)

Preglednica 8: Antibiotika v tekočem gojišču

Antibiotiki	Količine za 1L gojišča	Končna koncentracija
Streptomycin sulfat	500 µL	0,03 mM
Kloramfenikol	500 µL	0,15 mM

3.1.2 Precepljanje gliv

3.1.2.1 Nacepljanje na trdno gojišče

Pred samim precepljanjem smo si ustrezno sterilizirali delovno površino (brezprašna komora) in delovni pribor s 70 % etanolom in UV lučjo. Pripravili smo si vsa tri trdna gojišča, češpljevo, PDA in CH2 gojišče. Vzeli smo izbrane vzorce *Verticillium albo-atrum* (blaga oblika PG1 in letalna oblika PG2), *V. dahliae* in *V. tricorpus* iz genske banke Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, ki so predstavljeni v preglednici 9.

Preglednica 9: Izbrani vzorci *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* iz genske banke IHPS

Oznaka vzorca	Gliva	Gostitelj	Kultivar	Leto izolacije	Virulenta	Geografski izvor	Vir ^x
JKG20	<i>V. tricorpus</i>	Lipa				Nizozemska	1
EX F8	<i>V. tricorpus</i>	Tla				Nizozemska	1
Čas 119	<i>V. dahliae</i>	Hmelj	Aurora	1999		Slovenija	IHPS
12042	<i>V. dahliae</i>	Hmelj	Fuggle	1997		Anglija	2
Kresnik D	<i>V. dahliae</i>	Hmelj	Cerera	2001		Slovenija	IHPS
Rečica 20	<i>V. albo-atrum</i>	Hmelj	Aurora	1999	PG1	Slovenija	IHPS
Rečica 21	<i>V. albo-atrum</i>	Hmelj	Aurora	1999	PG1	Slovenija	IHPS
Rožič 22	<i>V. albo-atrum</i>	Hmelj	Celeia	2001	PG2	Slovenija	IHPS
Rožič 23	<i>V. albo-atrum</i>	Hmelj	Celeia	2001	PG2	Slovenija	IHPS
Bizjak 24	<i>V. albo-atrum</i>	Hmelj	Aurora	2009	PG2	Slovenija	IHPS
Cizej 25	<i>V. albo-atrum</i>	Hmelj	Aurora	2000	PG2	Slovenija	IHPS
11 ₅₄	<i>V. albo-atrum</i>	Lucerna		1985		Kanada	3

^x 1-Dr. J. K. Goud, Biological Farming Systems, Wageningen, Nizozemska;

2-Dr. G. Down, Disease Management, Horticulture Research International, West Malling, Anglija;

3-Dr. J. Robb, University of Guelph, Molecular Biology and Genetics, Kanada

IHPS-Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec, Slovenija

Vsakega od vzorcev smo s cepilno zanko sterilno precepili na vsa tri gojišča. Petrijevke smo ustrezno označili in jih dali na 19 °C za 4 dni v temen prostor.

3.1.2.2 Precepljanje gliv na tekoče gojišče

Predhodno smo si ustrezno sterilizirali brezprašno komoro in delovni pribor z alkoholom in UV lučjo. Pripravili smo si tekoče gojišče z dodanim antibiotikom in sterilne erlenmajerice. V vsako erlenmajerico smo nalili 200 mL gojišča in jo zaprli z aluminijasto folijo.

Iz trdnih gojišč (češpljevo, krompirjevo in CH2), na katera smo predhodno nacepili vzorce, smo izbrali najbolj primerne kolonije, katere smo uporabili za precepljanje na tekoče gojišče. Precepljanje je potekalo v sterilnih pogojih. Erlenmajerice smo ustrezno

označili in jih dali na orbitalni stresalnik (IKA Werke, KS 501 digital), pri 100 obratih na minuto. Inkubacija je trajala 7 dni na sobni temperaturi in na svetlobi.

3.2 IZOLACIJA DNA IZ MICELIJA GLIV

3.2.1 Priprava kemikalij

Izolacijo DNA iz micelija glive smo izvedli z metodo SDS pufra (Lee in Taylor, 1990). Sestavine za izolacijo so predstavljene v preglednici 10, sestavine za SDS pufer pa v preglednici 11.

Preglednica 10: Sestavine za izolacijo DNA

Sestavine	Količina
SDS pufer (68 °C)	približno 5 mL/g glive
Kloroform:izoamilalkohol (24:1)	600 µL
kloroform	600 µL
izopropanol	700 µL
Natrijev acetat	50 µL
70% etanol	500 µL
Tris-EDTA (TE) pufer	70 µL

Preglednica 11: Sestava SDS pufra (natrijev dodecil sulfat pufer)

Sestavine	Količina za 200 mL pufera	Končna koncentracija
Tris-HCl 1M	10 mL	5 mM
EDTA 0,5 M	20 mL	5 mM
SDS	6 g	100 mM
2-merkaptoetanol	2 ml	1 %

Najprej smo pripravili raztopini Tris-HCl in EDTA

Priprava 1M Tris (tris (hidroksimetil) aminometan), pH=8

Zatehtali smo 12,11 g Tris in ga stresli v čašo s 50 mL destilirane vode. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli (68 °C) in mešali s stekleno palčko, dokler se tris ni raztopil. Nato smo raztopino prelili nazaj v čašo, izmerili pH in jo s koncentrirano klorovodikovo kislino (HCl) umerili na pH=8. Raztopini smo dolili destilirano vodo do 200 mL. Raztopino smo nato še avtoklavirali, 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,3 bar.

Priprava 0,5M EDTA (etilendiamintetraocetna kislina), pH=8

Zatehtali smo 37,22 g EDTA in ga stresli v čašo s 150 mL destilirane vode. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli (68 °C) in mešali nekaj minut. Izmerili smo pH in jo s koncentrirano raztopino natrijevega hidroksida (NaOH) umerili na pH=8. Raztopino smo nato še avtoklavirali.

Priprava SDS pufra

Tris pufer, EDTA in SDS smo zatehtali in odmerili z merilnim valjem ter zmešali vse skupaj v čaši, v katero smo dali 150 mL destilirane vode. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli (68 °C) dokler se SDS ni raztopil. Raztopino smo prelili merilno bučko in dodali še preostanek vode do 200 mL. Raztopino smo prelili v reagentno steklenico in avtoklavirali. Ko se je raztopina ohladila, smo ji dodali še merkaptoetanol.

Priprava 3 M NaAc (natrijev acetat), pH=5,2

Zatehtali smo 24,61 g natrijevega acetata in ga stresli v čašo z 70 mL vode. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli, dokler se natrijev acetat ni raztopil. pH smo umerili z ocetno kislino na vrednost 5,2 in dolili destilirano vodo do 100 mL.

Priprava TE pufra (10 mM Tris, 1 mM EDTA)

Odmerili smo 2 mL 1M Tris in 0,4 mL 0,5M EDTA. Dolili smo destilirano vodo do 200 mL. Raztopino smo avtoklavirali.

3.2.2 Izolacija

Najprej smo si pripravili sterilni pribor. Avtoklavirali smo cedula, filter papir, steklene palčke, kovinske žlice ter destilirano vodo. Terilnice in pestila smo sterilizirali z UV lučjo.

Izolacija je potekala v umivalnici, da smo čim bolj omejili raznos glive po laboratoriju. Med vsakim vzorcem smo vso površino sterilizirali s 70 % etanolom. Ves material, erlenmajerice, uporabljenega cedula in steklovino smo očistili z razkužilom (Varekina), da smo popolnoma uničili glivo. Tudi na koncu smo celotno površino sčistili z alkoholom. Ostale odpadke, kot je na primer uporabljeno gojišče, smo avtoklavirali .

Postopek:

1. Vsak vzorec (micelij glive na tekočem gojišču) smo previdno precedili. Najprej smo gojišče zlili stran, nato pa ostanek gojišča z glivnim micelijem precedili skozi cedula s filter papirjem. Micelij smo dodatno sprali še z destilirano vodo, da smo se znebili ostankov gojišča. S filter papirjem smo na koncu popivnali vso vodo iz micelija. Suh micelij smo dali v terilnico in ga stehtali.
2. V terilnico smo dodali SDS pufer, katerega smo prej segreli na 68 °C, in malo kremenčevega peska, ter zmleli micelij. Količina micelija je bila od 0,1 g pa do 1 g. Pufer smo dodajali po potrebi, da smo dobili tekočo zmes. Vzorce smo nato dali v 2 mL epruvete. Večinoma je bila količina micelija relativno velika, zato smo en vzorec razdelili v več epruvet, katere smo ustrezno označili, nato pa jih inkubirali v vodni kopeli pri 68 °C dve uri. Vmes smo jih večkrat rahlo premešali.

3. Po končani inkubaciji smo vzorcem dodali 600 µL zmesi kloroform:izoamilalkohol (razmerje 24:1) in dobro premešali, da je nastala suspenzija. Vzorče smo nato centrifugirali s centrifugo (Eppendorf Centrifuge 5804R) 15 min pri 12000 obratih pri temperaturi 4 °C.
4. Pri centrifugiranju je prišlo do nastanka dveh faz. Zgornjo fazo (supernatant) smo previdno odpipetirali v novo epruveto, ostanek smo zavrgli.
5. V vzorec smo nato dodali 600 µL čistega kloroforma, dobro premešali in ponovno centrifugirali pri istih pogojih.
6. Ponovno je prišlo do nastanka dveh faz. Zgornjo fazo smo prenesli v novo epruveto. V vzorce smo dodali 700 µL ledeno hladnega izopropanola (-20 °C) in 50 µL NaAc, pH=5,2. Epruvete smo nežno premešali in jih dali za 1-2 uri na -20 °C. Vmes smo jih večkrat premešali.
7. Po inkubaciji smo vzorce ponovno centrifugirali 15 min pri 12000 obratih pri temperaturi 4 °C. Zgornjo fazo smo previdno odlili.
8. Vsakemu vzorcu smo dodali 500 µL 70 % etanola in pretresli epruvete, da se je usedla DNA odlepila od stene. Zelo previdno smo odlili etanol, na hitro centrifugirali vzorce, da se je preostali etanol usedel na dno epruvete in ga previdno odpipetirali stran. Epruvete smo pustili odprte še nekaj minut, da se je usedla DNA popolnoma posušila.
9. Dodali smo 70 µL TE pufra in inkubirali čez noč pri 4 °C. Ker se DNA ni popolnoma raztopila, smo jo rahlo razbili s pomočjo tipsa in ponovno inkubirali čez noč. Izolirano DNA smo shranili pri -20 °C.

3.2.3 Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom

Koncentracijo DNA smo merili na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, na Oddelku za agronomijo.

Za merjenje koncentracije DNA v TE pufru smo uporabili DNA fluorometer DyNA Quant™ 200. Delavno raztopino smo pripravili iz 10 x TNE pufra [100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, (pH 7)], nato smo dodali barvilo Hoechts 33258 v koncentraciji 0,1 µg/ml. Steklenico, v kateri smo pripravili želeno raztopino, smo zavili z alufolijo, saj je

barvilo občutljivo na svetlobo. Barvilo se prednostno veže na dvojno vijačnico DNA, kar omogoča natančno določitev koncentracije, četudi so prisotni RNA, nukleotidi in proteini. Kot standard za kalibracijo smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg/ml DNA v 1 x TNE pufru). DNA vzorcev gliv smo redčili na 20 ng/ μ l v sterilni destilirani vodi.

3.3 PREIZKUS SPECIFIČNOSTI NAJPOGOSTEJE UPORABLJENIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV V DIAGNOSTIKI GLIV *V. albo-atrum*, *V. dahliae* IN *V. tricorpus*

V navedenih virih (preglednica 12) smo poiskali najpogosteje uporabljeni začetni oligonukleotide v diagnostiki gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* in preizkusili njihovo delovanje na izolirani DNA na nekaterih od izoliranih vzorcev.

Uporabili smo začetne oligonukleotide proizvajalcev Sigma, MWG Biotech AG in Integrated DNA Technologies.

Preglednica 12: Najpogosteje uporabljeni začetni oligonukleotidi v diagnostiki gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* in navedba osnovnih virov

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Specifičnost namnoževanja	Dolžina (bp)	Tp (°C)	Viri
VAITS1	CCG GTA CAT CAG TCT CTT TA	<i>V. albo-atrum</i> Grp1 (ITS regija)	213	60	Nazar in sod., 1991
VAITS2	ACT CCG ATG CGA GCT GTA AT				
VA-G2-1	CCG GTA CAT CAG TCT CTA TA	<i>V. albo-atrum</i> Grp2 (ITS regija)	394	60	Robb in sod., 1993
VA-G2-2	CAA CCG TTG CCG TAC GAG AC				
VDITS1	CCG GTC CAT CAG TCT CTC TG	<i>V. dahliae</i> (ITS regija)	203	60	Nazar in sod., 1991
VDITS2	ACT CCG ATG CGA GCT GTA AC				
VTITS1	CCC CGG TAC ATC AGT CTC TT	<i>V. tricorpus</i> (ITS regija)	337	60	Robb in sod., 1993
VTITS2	ACT CCG ATG CGA GCG AA				
VITS1	CTC ATA ACC CTT TGT GAA CC	<i>Verticillium</i> spp. (ITS regija)	480	60	Volossiouk in sod., 1995
VITS2	CCG AGG TCA ACC GTT GCC G				

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 12: Najpogosteje uporabljeni začetni oligonukleotidi v diagnostiki gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* navedba osnovnih virov

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Specifičnost namnoževanja	Dolžina (bp)	Tp (°C)	Viri
VR1	CAT GGA TAA CCG TGG TAA TT	<i>Verticillium</i> spp. (RFLP sonda)	1500	48	Carder in sod., 1994
VR2	CCA TTC AAT CGG TAG TAG CG				
VR-NL1	ATG GAC CGA ACA GCT AGG TA	<i>V. albo-atrum</i> skupina NL (RFLP sonda)	300	48	Carder in sod., 1994
VR-NL2	TCT CAG ATA TAT GCT GCT GC				
VD-RF1	CGG TGA CAT AAT ACT GAG AG	<i>V. dahliae</i> (RFLP sonda)	580	48	Carder in sod., 1994
VD-RF2	GAC GAT GCG GAT TGA ACG AA				
VD-RA1	CAC ATT CAG TTC AGG AGA CGG A	<i>V. dahliae</i> (RAPD marker)	521	67	Li in sod., 1999
VD-RA2	CCT TCT ACT GGA GTA TTT CGG				
VD-D1	CAT GTT GCT CTG TTG ACT GG	<i>V. dahliae</i> patotip D (RAPD marker)	548	56	Perez-Artes in sod., 2000
VD-D2	GAC ACG GTA TCT TTT GCT GAA				
VD-ND1	CAG GGG ATA CTG GTA CGA GAC G	<i>V. dahliae</i> patotip ND (RAPD marker)	1500	56	Perez-Artes in sod., 2000
VD-ND1	ATG AGT ATT GCC GAT AAG AAC A				
9-1Efor	GGT AAG ACT CCT TAC CGA TGC TG	<i>V.albo-atrum</i> hmeljni patotip PV1,genotip PG2 (AFLP)	248	59	Radišek in sod., 2004
9-1Erev	ATT CAC ACG CTA CAT ATC AAA CA				
9-2Efor	ATT CAC CAT CAG CCT GTG C	<i>V. albo-atrum</i> , patotip PG2	190	60	Radišek in sod., 2004
9-2Erev	GGT AAT CCT TGA CAA CAA TAT TC				
VTR-ITS1	GCG GCC ATG TAG TCA GAG	<i>V. tricorpus</i> (ITS regija)	337	60	Moukhamedov in sod., 1994
VTR-ITS2	AAG CGA GCG TAG CCT CA				

3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR reakcije smo izvajali v sterilnem prostoru, katerega smo vedno pred in po uporabi temeljito razkužili s 70 % etanolom.

Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi smo preizkusili vedno na istih vzorcih, kateri so predstavljeni v preglednici 13. Najprej smo vzorce odtajali, ji na hitro vrtinčili, centrifugirali in jih ustrezno redčili z destilirano vodo, tako da je bila končna koncentracija DNA v vzorcu 10 ng/ μ L.

Preglednica 13: DNA vzorci za preizkus pomnoževanja začetnih oligonukleotidov

Vrsta	Vzorec DNA
1	<i>V. tricorpus</i> EX F8 tla
2	<i>V. tricorpus</i> JKG 20 Lipa
3	<i>V. dahliae</i> 12042
4	<i>V. dahliae</i> Kresnik D
5	<i>V. albo-atrum</i> Cizej PG2
6	<i>V. albo-atrum</i> Rečica PG1 21
7	<i>V. albo-atrum</i> izolirana iz lucerne 11 ₅₄
8	Voda brez DNA-z in RNA-z

Razredčene vzorce (2 μ L) smo nanesli v 0,2 mL eppendorfove epruvete za PCR, jih ustrezno označili in dali v hladilnik na 4 °C.

Nato smo si pripravili PCR mešanico in kemikalij, navedenih v preglednici 14. Odtajali smo vse kemikalije, razen polimeraze. To smo pustili na -20 °C. Najprej smo morali ustrezno redčiti oligonukleotide in začetne oligonukleotide po navodilih proizvajalca. Vse kemikalije smo na hitro vrtinčili in centrifugirali.

Reakcija PCR je potekala v 18 μ L mešanice, ki smo ji dodali 2 μ L DNA.

Preglednica 14: Sestavine za PCR

Sestavine	Volumen v reakciji (μ L)	Končna koncentracija v reakciji
Pufer-Green GoTaq Flexi Buffer 5x, Promega	4	1x
MgCl ₂ -25 mM, Promega	1,2	1,5 mM
Oligonukleotidi-dNTP-2,5 mM vsak, Sigma	1,6	0,2 mM
Začetni oligonukleotid Forward-10 mM	1	0,5 mM
Začetni oligonukleotid Reverse-10 mM	1	0,5 mM
Voda brez DNA-z in RNA-z	9,08	/
Polimeraza-GoTaq DNA Polymerase, 5 U/ μ L, Promega	0,12	0,03 U/ μ L

Navedene kemikalije smo zmešali po vrstnem redu, na koncu smo dodali še polimerazo. PCR mešanico smo na hitro vrtinčili in jo centrifugirali.

Nato smo mešanico dodali v eppendorfove epruvete k izolirani DNA.

Vse skupaj smo centrifugirali in dali v PCR aparat (Primus 96 Plus).

PCR reakcija je potekala pri naslednjem temperaturnem profilu:

94 °C-3 min-začetna denaturacija

30 ciklov:

- 94 °C – 45 s - denaturacija
- Temperatura prileganja (T_p) po preglednici 12 – 45 s - prileganje začetnih oligonukleotidov
- 72 °C – 1 min 10s - podaljševanje

Po končani PCR reakciji smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5 % agaroznem gelu. Sestavine agaroznega gela so navedene v preglednici 15.

Preglednica 15: Sestava 1,5 % gela

Sestavine	Količina za 300 mL gela	Končna koncentracija
agaroha	4,5 g	1,5 %
TBE pufer	30 mL	10 %
destilirana voda	270 mL	90 %
etidijev bromid 10 mg/mL	15 µL	0,5 µg/mL

Predhodno smo si pripravili TBE pufer (sestavine v preglednici 16).

Preglednica 16: Sestava TBE pufra

Sestavine	Količina 1 L pufra	Končna koncentracija
Tris	108 g	0,9 M
Borova kislina	55 g	0,9 M
EDTA-0,5 M	40 mL	20 mM

Vse sestavine za pufer smo stresli oziroma zlili v stekleno čašo in dodali 800 mL destilirane vode in dobro zmešali na magnetnem mešalu. Ko se je raztopina zbistrlila, smo jo prelili v merilno bučko in dolili vodo do enega litra. Nato smo jo prelili v reagentno steklenico, ustrezno označili in dali avtoklavirat za 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,3 bar.

Sledila je priprava gela. Zatehtali smo agarozo in jo stresli v 500 mL reagentno steklenico. Dodali smo TBE pufer in vodo. Dobro smo premešali raztopino in agarozo raztopili v mikrovalovni pečici (približno 3,5 minute). Raztopino smo nato ohladili na 60-70 °C v hladni vodi. Vmes smo si pripravili kalup za gel. Ko se je gel ohladil, smo dodali etidijev bromid v koncentraciji 0,5 µg/mL, dobro premešali in nalili gel v kalup. Etidijev bromid

je raktovoren, zato smo vedno uporabljali nitrilne rokavice, delo pa je potekalo v digestoriju (Floro Valles).

Počakali smo približno 20 minut, da se je gel strdil, nato smo odstranili glavniček in stranski gumi ter prenesli gel z nosilcem v elektroforezno posodo (Agagel Maxi, Biometra), v katero smo prej nalili 1800 mL 10x redčenega TBE pufra.

Sledil je nanos vzorcev na gel po zaporedju, kakršno je v preglednici 13. Nanesli smo celotno količino vzorca (20 µL).

Na vsako stran smo dodali tudi dolžinski standard (50-100 bp; z dvema referenčnima fragmentoma 250 bp in 500 bp), katerega smo predhodo zmešali in redčili po navodilih proizvajalca (Promega).

Elektroforeza je potekala pri 160-170 V približno eno uro (vir električne napetosti usmernik Biometra).

Po končani elektroforezi smo gel fotografirali s sistemom za fotografiranje v ultravijoličnem spektru (Syngene, Gene Genius), sliko pa smo prenesli na računalnik in jo ustrezno obdelali s programom za obdelavo slik (Genesnap, proizvajalca Syngene).

3.3.2 Preizkus nivoja detekcije začetnih oligonukleotidov

Pri tem delu naloge smo želeli ugotoviti, kakšno količino glivne DNA še pomnožijo določeni začetni oligonukleotidi.

Naredili smo redčitveno vrsto nekaj vzorcev in tako smo v PCR reakciji uporabili od 0,001 ng do 20 ng izolirane DNA (preglednica 17). Slednji vzorec je predstavljal pozitivno kontrolo.

Preizkusili smo le začetne oligonukleotide, ki so se v prejšnjem poskusu izkazali za najbolj primerne. V preglednici 18 so predstavljeni uporabljeni vzorci in začetni oligonukleotidi.

Preglednica 17: Količina DNA v reakciji

Vrsta	Količina DNA v reakciji
1	0,001ng
2	0,01 ng
3	0,1 ng
4	1 ng
5	5 ng
6	10 ng
7	20 ng
8	Voda brez DNA-z in RNA-z

Preglednica 18: Uporabljeni vzorci in začetni oligonukleotidi

Začetni oligonukleotid	Vzorec
VAITS1 in VAITS2	PG1 Rečica 21, PG2 Rožič 23, PG2 Cizej 25, PG2 Bizjak 24
VITS1 in VITS2	PG1 Rečica 21
9-1Efor in 9-1Erev	PG2 Rožič 23, PG2 Cizej 25, PG2 Bizjak 24
9-2Efor in 9-2Erev	PG2 Rožič 23, PG2 Cizej 25, PG2 Bizjak 24
VDITS1 in VDITS2	V. d. Čas D 119, V. d. 12042
VR-NL1 in VR-NL2	PG2 Rožič 23, PG2 Bizjak 24

Potek dela PCR je bil isti kot poglavju 3.3.1, le da smo vzeli le 1 µL vzorca, da smo dobili ustrezno količino DNA v reakciji. Posledično je bila količina vode pri pripravi mešanice 10,08 µL (preglednica 14).

3.4 ZEMLJA-MIKROBIOLOŠKO TESTIRANJE IN IZOLACIJA

Za nadaljnjo testiranje smo pridobili vzorce zemlje iz lokacij, kjer je bila najdena in potrjena verticilijska uvelost. Vzeli smo 22 kužnih vzorcev.

Kot negativne vzorce smo vzeli vzorec zemlje iz gozda, iz travnika in dveh njiv pred IHPS (preglednica 19).

Vzorce smo imeli shranjene v hladilniku pri -4 °C.

Preglednica 19: Lokacije kužnih in nekužnih vzorcev zemlje

Oznaka vzorca	Št. zapisnika	Lokacija vzorčenja	Mesto vzorčenja
1	38	Njiva Letuš 2	69. vrsta Z-V, 105. rastlina J-S
2	38	Njiva Letuš 2	69. vrsta Z-V, 104. rastlina J-S
3	38	Njiva Letuš 2	70. vrsta Z-V, 91. rastlina J-S
4	38	Njiva Letuš 2	70. vrsta Z-V, 100. rastlina J-S
5	38	Njiva Letuš 2	70. vrsta Z-V, 101. rastlina J-S
6	38	Njiva Letuš 2	70. vrsta Z-V, 90. rastlina J-S
7	38	Njiva Letuš 2	70. vrsta Z-V, 99. rastlina J-S
8	38	Njiva Letuš 2	70. vrsta Z-V, 92. rastlina J-S
9	38	Njiva Letuš 2	70. vrsta Z-V, 116. rastlina J-S
10	38	Njiva Letuš 2	69. vrsta Z-V, 103. rastlina J-S
11	47	Njiva Gomilsko 8	2. vrsta V-Z, 40. rastlina J-S
12	47	Njiva Gomilsko 8	3. vrsta V-Z, 35. rastlina J-S
13	47	Njiva Gomilsko 8	2. vrsta V-Z, 39. rastlina J-S
14	47	Njiva Gomilsko 8	2. vrsta V-Z, 45. rastlina J-S
15	47	Njiva Gomilsko 8	2. vrsta V-Z, 38. rastlina J-S
16	47	Njiva Gomilsko 8	3. vrsta V-Z, 33. rastlina J-S
17	47	Njiva Gomilsko 8	2. vrsta V-Z, 44. rastlina J-S
18	47	Njiva Gomilsko 8	2. vrsta V-Z, 43. rastlina J-S
19	47	Njiva Gomilsko 8	3. vrsta V-Z, 34. rastlina J-S
20	49	Njiva Tabor 6	23. vrsta Z-V, 52. rastlina S-J

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 19: Lokacije kužnih in nekužnih vzorcev zemlje

Oznaka vzorca	Št. zapisnika	Lokacija vzorčenja	Mesto vzorčenja
21	49	Njiva Tabor 6	25. vrsta Z-V, 65. rastlina S-J
22	49	Njiva Tabor 6	23. vrsta Z-V, 53. rastlina S-J
G	/	Gozd pri mlekarni Celeia, Arja vas	/
T	/	Travnik pri osnovni šoli Šempeter, Šempeter v Savinjski dolini	/
N1	/	Njiva SN 5, Žalec (IHPS)	/
N2	/	Njiva SN 2, Žalec (IHPS)	/

3.4.1 Mikrobiološko testiranje

Najprej smo izvedli mikrobiološko testiranje, da smo ugotovili, koliko glice je prisotne v zemlji.

Postopek:

1. Zemljo smo najprej posušili (približno sedem dni). Destilirano vodo, cedila, erlenmajerice, čaše, epruvete, nacepilne igle in ostali delovni pribor smo ustrezno sterilizirali z avtoklaviranjem ali s 70 % etanolom in UV lučjo. Prav tako smo razkužili delovno površino.
2. V čašo smo odmerili 50 mL zemlje in jo prelili z 200 mL destilirane avtoklavirane vode. Suspenzijo smo dobro premešali in jo skozi cedilo prelili v erlenmajerico.
3. V brezprašni komori smo si pripravili sterilne epruvete. Naredili smo redčitveno vrsto 1:10, 1:100, 1:1000 in 1:10000. V vsako epruveto smo nalili 9 mL sterilne destilirane vode. K prvi epruveti smo dodali 1 mL raztopine iz erlenmajerice, dobro premešali in dali 1mL te raztopine k drugi epruveti. 1 ml raztopine iz druge epruvete smo prenesli v tretjo epruveto in 1mL iz tretje v četrto. Vmes smo vedno dobro premešali raztopino.
4. V brezprašni komori smo si pripravili petrijevke z CH2 trdnim gojiščem (priprava poglavje 3.1.1.3). Petrijevke smo ustrezno označili in v vsako nanesli 200 µL suspenzije (tudi neredčen vzorec), katero smo razporedili po celi petrijevki. Za vsak vzorec smo naredili dve ponovitvi.
5. Petrijevke smo inkubirali 6 dni pri sobni temperaturi.

6. Po šestih dneh smo pregledali petrijevke. Prešteli smo zrasle kolonije glive *Verticillium* spp. Za nadaljnjo analizo vzorcev smo vzeli štiri najbolj kužne vzorce zemlje in štiri negativne vzorce.

3.4.2 Izolacija DNA iz zemlje

Iz znanstvenih člankov smo povzeli različne protokole za izolacijo DNA iz zemlje, da bi našli najbolj primerno metodo. Prav tako smo uporabili komercialni kit za izolacijo.

3.4.2.1 Metoda 1

Prva metoda je bila povzeta in prilagojena po Yeates in sod., 1998. Postopek smo izvedli na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, na Oddelku za agronomijo.

Vzeli smo pozitivne vzorce 13, 19, 20 in 22 (preglednica 30 v poglavju 4.3.1) ter negativne vzorce N1, N2, N3 in N4. Vsak vzorec smo naredili v dveh ponovitvah.

Najprej smo si pripravili ekstrakcijski pufer (preglednica 20), SDS pufer (preglednica 21) in raztopino polietilenglikola/NaCl (preglednica 22).

Preglednica 20: Ekstrakcijski pufer

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
Tris	1,2114 g	100 mM
EDTA	3,722 g	100mM
NaCl	8, 766 g	1,5 M

Vse sestavine smo zatehtali in stesli v čašo. Dodali smo 60 mL destilirane vode, dobro premešali in umerili pH na 8. Pufer smo prelimi v SCHOTT-ovo steklenico ter ga dali avtoklavirat.

Preglednica 21: 20% SDS pufer-100 mL

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
SDS	20g	20%

Zatehtali smo 20g SDS in ga raztopili v 100 mL destilirane vode. Pufer smo prelimi v reagentno steklenico in ga dali avtoklavirat.

Preglednica 22: Polietilenglikol/NaCl-50 mL

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
Polietilenglikol-50%	30 mL	30%
NaCl	4,67 g	1,6 M

Odmerili in zatehtali smo sestavine, jih stresli v čašo, prelili v merilno bučko in dolili vodo do 50 mL.

Postopek

1. Zatehtali smo 1g zemlje in jo stresli v 2 ml centrifugirko. Zraven smo dodali 0,5 g steklenih kroglic (MoBio kit).
2. V eppendorfove epruvete smo k zemlji dodali 1,4 mL ekstrakcijskega pufra. Epruvete smo vpeli v bead beater (Biospec bead beater, proizvajalca Biospec products, INC) in stresali 2 minuti pri maksimalni hitrosti. Ta korak je ključen, saj tukaj pride s pomočjo kroglic do razbitja celic in trajnih organov, katere tvorijo glive rodu *Verticillium*.
3. Dodali smo še 100 µL 20 % SDS pufra in ponovno vpeli epruvete v bead beater in stresali 5 s.
4. Vzorce smo inkubirali 1 uro pri 65 °C.
5. Vzorce smo centrifugirali 10 min pri 6000 g. Supernatant smo shranili.
6. Ponovno smo izvedli ekstrakcijo usedline tako, da smo dodali 0,5 mL ekstrakcijskega pufra in inkubirali 10 min pri 65 °C. Vzorce smo ponovno centrifugirali in shranili supernatant. Supernatantov nismo združevali, ker je bila količina prevelika.
7. Supernatantu smo nato dodali 0,5 mL suspenzije polietilenglikola/NaCl in inkubirali dve uri pri sobni temperaturi.
8. Sledilo je centrifugiranje pri 16000 obratih 20 minut, pri 4 °C. Supernatant smo zavrgli.
9. Dodali smo 13,3 µL 7,5 M kalijevega acetata, do končne koncentracije 0,5 M in inkubirali na ledu 5 minut.
10. Ponovno smo centrifugirali vzorce pri 16000 obratih 30 minut, pri 4 °C.
11. Supernatante smo shranili in jih združili po dva vzorca. Sledila je ekstrakcija s fenol/kloroformom (razmerje 1:1, 400 µL).
12. Sledilo je centrifugiranje pri 13000 obratih 10 minut, pri 4 °C.

13. Vodni fazi smo nato dodali 0,6 V izopropanola (300 µL), inkubirali vzorce čez noč na 4 °C, nato pa še 2 uri na sobni temperaturi.
14. Sledilo je končno centrifugiranje pri 16000 obratih 30 minut, pri 4 °C.
15. Usedlo DNA smo nato raztopili v 50 µL TE pufra.
16. Vzorce smo do uporabe shranili na -20 °C.

Sledilo je preverjanje uspešnosti metode naše izolacije.

Pripravili smo si 0,8% agarozen gel. Postopek je isti, kot v poglavju 3.3.1, le da smo zatehtali 2,4 g agaroze.

Nato smo zmešali 2 µL vzorca, 3 µL barvila (12,5 % (w/v) Ficoll tip 400, 0,2 % (w/v) brom fenol modro) in 5 µL destilirane vode. Vzorce smo dobro prevrtinčili in jih nanesli na gel.

Elektroforeza je potekala pri istih pogojih, kot v poglavju 3.3.1.

3.4.2.2 Metoda 2

Druga metoda je bila povzeta in prilagojena po Garcia-Pedrajas in sod., 1999.

Najprej smo si pripravili približno 50 g zemlje v petrijevke in jo posušili na sobni temperaturi (4 dni).

Nato smo si pripravili raztopino posnetega mleka v prahu (preglednica 23) in SDS pufer (preglednica 24).

Preglednica 23: Raztopina mleka

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Posneto mleko v prahu	4 g	4 %

Zatehtali smo posneto mleko v prahu (Pomurske mlekarne) in ga zmešali v 100 mL destilirane vode.

Preglednica 24: 10% SDS pufer-100 mL

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
SDS	10 g	10 %

Zatehtali smo 10 g SDS in ga raztopili v 100 mL destilirane vode. Pufer smo prelili v reagentno steklenico in ga dali avtoklavirat.

Postopek:

1. Približno 5 g suhe zemlje smo prenesli v terilnico in dobro zmleli. Nato smo zemljo presejali skozi sito, da smo se znebili kamenja. Zatehtali smo 75 mg zemlje v 1,5 mL epruvete. Za vsak vzorec smo naredili 4 paralelke.
2. Dodali smo 200 μL raztopine mleka in vrtinčili dve minuti. Epruvete smo nato dali v centrifugo in centrifugirali 10 minut pri 12000 obratih.
3. Supernatant smo prenesli v nove epruvete in dodali 6 μL 10% SDS pufra in 6 μL raztopine fenol:kloroform:izoamialkohol (razmerje 25:24:1). Ponovno smo vrtinčili 2 minuti in centrifugirali 10 minut pri 12000 obratih.
4. Supernatant smo prenesli v nove epruvete in dodali 100 μL natrijevega acetata ($\text{pH}=5,2$) in 1000 μL 70 % etanola. Vzorce smo inkubirali čez noč na -20 °C.
5. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 12000 obratih. Alkohol smo zlili stran in vzorce še enkrat sprali s 70 % etanolom, rahlo pretresli, da se je usedla DNA odlepila od stene in odpipetirali stran preostali etanol.
6. Počakali smo nekaj minut, da so se peleti posušili in jih raztopili v 50 μL TE pufra.
7. Vzorce smo do uporabe shranili na -20 °C.

Uspešnost metode smo preverili z gelsko elektroforezo, kot je navedeno v poglavju 3.3.1.

3.4.2.3 Metoda 3

Tretja metoda izolacije je bila izolacija s komercialnim kitom PowerMax™ Soil DNA isolation Kit (MoBio).

Postopek smo izvedli na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, na Oddelku za agronomijo.

Protokol je bil izведен po navodilih proizvajalca z določenimi modifikacijami.

Postopek:

1. V Power Bead epruvete smo nalili 15 mL Power Bead raztopine.
2. V epruvete smo dodali 10 g zemlje in vrtinčili 1 minuto.
3. Raztopino C1, v kateri je SDS in druge kemikalije za lizo celic, smo segreli na 60 °C, da se je SDS raztopil in dodali 1,2 mL raztopine v epruveto. Vrtinčili smo 30 sekund.
4. Epruvete smo nato namestili na čaše in jih čvrsto prilepili z lepilnim trakom. Čaše smo vpeli v stresalno kopel (60 °C) za 30 minut.
5. Po inkubaciji smo epruvete dali v centrifugo in centrifugirali 3 minute pri 2500 obratih, pri sobni temperaturi.
6. Supernatant smo nato prenesli v nove epruvete (Collection tubes)
7. Dodali smo 5 mL raztopine C2 (reagenti za precipitacijo vseh organskih in anorganskih snovi (razen DNA), huminskih kislin, celičnih ostankov in proteinov), dvakrat obrnili epruveto in inkubirali 10 minut pri 4 °C.
8. Sledilo je ponovno centrifugiranje 4 minute pri 2500 obratih in sobni temperaturi.
9. Supernatant smo prenesli v čiste epruvete (Collection tubes) in dodali 4 mL raztopine C3 (reagenti za ponovno precipitacijo vseh organskih in anorganskih snovi, razen DNA). Epruveto smo dvakrat obrnili in inkubirali 10 minut pri 4 °C.
10. Po inkubaciji je sledilo centrifugiranje 4 minute pri 2500 obratih in sobni temperaturi.
11. Supernatant smo prenesli v nove epruvete (Collection tubes).
12. Dodali smo 30 mL raztopine C4 (visoko koncentrirana raztopina soli, ki povzroči vezavo DNA (in ne ostalih organskih in anorganskih snovi) na filter) in dvakrat obrnili epruveto.
13. Vzeli smo novo epruveto s Spin filtrom, kamor smo nalili raztopino z vzorcem iz prejšnjega koraka. Volumen raztopine je večji, kot je volumen epruvete s filtrom, zato smo epruveto napolnili trikrat. Po vsakem polnjenju smo epruveto s filtrom centrifugirali 2 minute pri 2500 obratih. DNA se veže na filter, zato smo raztopino, ki je pritekla skozi, zavrgli.

14. V Spin filter z vezano DNA smo nalili 10 mL raztopine C5 (pufer za čiščenje na etanolni osnovi) in centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 2500 obratih.
15. Filter smo previdno prenesli v novo epruveto in nalili 5 mL raztopine C6 (elucijski pufer). Centrifugirali smo 3 minute pri sobni temperaturi in 2500 obratih.
16. DNA se je nahajala v epruveti, filter smo zavrgli
17. Vzorce smo do uporabe shranili na -20 °C.

Uspešnost metode smo preverili z gelsko elektroforezo.

3.5 PREVERJANJE USPEŠNOSTI POSTOPKOV IZOLACIJ IZ ZEMLJE S PCR

3.5.1 PCR izolatov zemlje z dvema paroma splošnih glivnih začetnih oligonukleotidov

Po izolaciji smo najprej izvedli verižno reakcijo s polimerazo z uporabo dveh parov začetnih oligonukleotidov, specifičnih za glive, ITS1/ITS4 in 18sRNA-forward/18sRNA-reverse (preglednica 25). Vsi začetni oligonukleotidi so bili od proizvajalca Sigma. Cilj tega preizkusa je bilo ugotoviti prisotnost potencialnih inhibitorjev PCR in ali smo z uporabljenimi metodami izolirali dovolj kakovostne DNA, ki jo še lahko pomnožimo s splošnimi začetniki

Preglednica 25: Dva para splošnih oligonukleotidnih začetnikov za glive

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Specifičnost namnoževanja	T _a (°C)	Viri
VITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Glive (ITS regija)	58	White in sod, 1990
VITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC			
18sRNA-forward	CGC ATC ATT CAA ATT TCT GC	Glive (18s regija)	58	White in sod, 1990
18sRNA-reverse	TTC AGC CTT GCG ACC ATA CT			

Od vsake izolacije smo preizkusili po en pozitivni in en negativni vzorec, katere smo redčili v razmerju 1:10, 1:100, 1:200 in 1:500. Na vseh vzorcih smo preizkusili oba začetna oligonukleotida.

Postopek priprave je bil isti kot v poglavju 3.3.1, PCR pa je potekal pri temperaturnem profilu:

94 °C-3 min-začetna denaturacija

35 ciklov:

- 94 °C – 45 s - denaturacija
- 58 °C – 45 s - prileganje začetnih oligonukleotidov
- 72 °C – 1 min 10 s - podaljševanje

72 °C - 7 min - končno podaljševanje

Po končani PCR reakciji smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5% gelu, kot v poglavju 3.3.1.

3.5.2 PCR izolatov zemlje s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi

Sledil je preizkus s PCR, da bi ugotovili, ali smo iz vzorcev zemlje izolirali glive rodu *Verticillium* oziroma ali smo jih sploh lahko detektirali s PCR.

Preizkusili smo dve vrsti polimeraz, proizvajalcev Promega in Novegan in različne začetne oligonukleotide.

3.5.2.1 Polimeraza Promega

PCR smo izvedli na vzorcih vseh treh izolacij in sicer smo vzeli po dva kužna (vzorec 13 in 19) in po dva negativna vzorca (N1 in N2). Vsak vzorec smo redčili v razmerju 1:10, 1:100, 1:200 in 1:500. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24.

Uporabili smo začetne oligonukleotide:

- VR-NL1 in VR-NL2 ($T_p = 48^\circ\text{C}$)
- VITS1 in VITS2 ($T_p = 60^\circ\text{C}$)
- VAITS1 in VAITS2 ($T_p = 60^\circ\text{C}$)
- 9-1Efor in 9-1Erev ($T_p = 59^\circ\text{C}$).

Postopek priprave je bil isti kot v poglavju 3.3.1.

Po končani PCR reakciji smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5 % gelu.

3.5.2.2 Polimeraza Novagen

PCR smo izvedli na vzorcih izolacij MOBIO in izolacije povzete in prirejene po Yeates et al., 1998 in sicer na dveh kužnih (vzorec 13 in 19) in dveh negativnih vzorcih (N1 in N2). Vsak vzorec smo redčili v razmerju 1:10, 1:100, 1:200 in 1:500. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24.

Uporabili smo začetne oligonukleotide:

- VAI TS1 in VAI TS2 ($T_p = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- 9-1Efor in 9-1Erev ($T_p = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Postopek priprave PCR je bil isti kot v kot v poglavju 3.3.1, sestavine so predstavljene v preglednici 26.

Preglednica 26: Sestavine za PCR

Sestavine	Volumen v reakciji (μL)	Končna koncentracija v reakciji
Puffer-Buffer for KOD Hot start DNA Polymeraze 10x	2	1x
MgSO ₄ -25 mM, Novagen	1,2	1,5 mM
Oligonukleotidi-dNTP-2 mM vsak, Novagen	2	0,2 mM
Začetni oligonukleotid Forward-10 mM	0,6	0,3 mM
Začetni oligonukleotid Reverse-10 mM	0,6	0,3 mM
Voda brez DNA-z in RNA-z	11,2	/
Polimeraza-KOD Hot Start DNA Polymeraze-1 U/ μL	0,4	0,02 U/ μL

Reakcija PCR je potekala v 18 μL mešanice, kateri je bilo dodano 2 μL DNA.

Po končani PCR reakciji smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5% gelu, kot v poglavju 3.3.1.

3.5.3 Preizkus inhibicije PCR

V tem delu smo želeli ugotoviti, ali smo z različnimi metodami izolacije izolirali tudi inhibitorne snovi iz zemlje in kakšnem vpliv imajo na potek PCR.

Vzeli smo po en kužen in en nekužen vzorec vseh treh izolacij. Vse vzorce smo redčili 1:100 in tako naredili poskus na neredčenih in redčenih vzorcih. Vzorce smo na hitro prevrtinčili in jih nanesli po 2 μL v PCR epruvete.

Nato smo naredili redčitveno vrsto izolata *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24 in sicer smo redčili DNA tako, da smo dobili koncentracije DNA 0,001 ng, 0,01 ng, 0,1 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng in 20 ng. Po 1 μL vzorca DNA smo nanesli k izolatu zemlje (preglednica 27).

Preglednica 27: Preverjanje inhibicije

Vrsta	Izolat zemje	Dodana količina DNA <i>V. albo-atrum</i> (ng)
1	Redčen ali neredčen vzorec	0,001
2	Redčen ali neredčen vzorec	0,01
3	Redčen ali neredčen vzorec	0,1
4	Redčen ali neredčen vzorec	1
5	Redčen ali neredčen vzorec	5
6	Redčen ali neredčen vzorec	10
7	Redčen ali neredčen vzorec	20
8	Voda brez DNA-az in RNA-z	/

Nato smo si pripravili PCR mešanico po istem postopku, kot je opisano v poglavju 3.3.1. Odtajali smo vse kemikalije, razen polimeraze. To smo pustili na -20 °C. Pri tem preizkusu smo uporabili začetne oligonukleotide VR-NL1 in VR-NL2. Vse kemikalije smo na hitro vrtinčili, jih centrifugirali in jih zmešali. Količina kemikalij je bila ista kot v poglavju 3.3.1, le količina vode je bila 8.08 µL. Na koncu smo dodali še polimerazo in temeljito prevrtinčili in centrifugirali mešanico. Mešanico smo nanesli k vzorcem in dali epruvete v PCR aparat.

PCR reakcija je potekala pri naslednjem temperaturnem profilu:

94 °C – 3 min - začetna denaturacija

30 ciklov:

- 94 °C – 45 s - denaturacija
- 48 °C – 45 s - prileganje začetnih oligonukleotidov
- 72 °C – 1 min 10 s - podaljševanje

Po končani PCR reakciji smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5 % gelu.

4 REZULTATI

4.1 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA IZOLIRANIH VZORCEV

V sklopu diplomske naloge smo v prvem delu žeeli preizkusiti specifičnost PCR namnoževanja najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov za detekcijo *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* z uporabo DNA izolirane neposredno iz micelija. Najprej smo izbrane vzorce (poglavlje 3.1.2.1, preglednica 9) namnožili na trdnem gojišču in jih nato precepili še na tekoče gojišče. Po inkubaciji smo naredili ekstrakcijo DNA in nato s fluorometrom izmerili koncentracijo ekstrahirane DNA. Rezultati so predstavljeni v preglednici 28.

Preglednica 28: Koncentracija DNA izoliranih vzorcev

Številka vzorca	Oznaka vzorca	Gliva	Koncentracija DNA (ng/µL)
1	JKG20	<i>V. tricorpus</i>	184
2	EX F8	<i>V. tricorpus</i>	444
3	Čas 119	<i>V. dahliae</i>	269
4	12042	<i>V. dahliae</i>	225
5	Kresnik D	<i>V. dahliae</i>	307
6	Rečica 20	<i>V. albo-atrum</i>	205
7	Rečica 21	<i>V. albo-atrum</i>	316
8	Rožič 22	<i>V. albo-atrum</i>	658
9	Rožič 23	<i>V. albo-atrum</i>	524
10	Bizjak 24	<i>V. albo-atrum</i>	534
11	Cizej 25	<i>V. albo-atrum</i>	726
12	11 ₅₄	<i>V. albo-atrum</i>	635

Na podlagi teh rezultatov smo vse vzorce redčili tako, da je bila končna koncentracija DNA v vzorcu 20 ng/µL.

4.2 PREIZKUS SPECIFIČNOSTI NAJPOGOSTEJE UPORABLJENIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV V DIAGNOSTIKI GLIV *V. albo-atrum*, *V. dahliae* IN *V. tricorpus*

V navedenih virih smo poiskali 14 najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov v diagnostiki gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus*, ki so predstavljeni v preglednici 12 in preizkusili njihovo delovanje na izolirani DNA vzorcev, kateri so bili predstavljeni v poglavju 3.3.1 v preglednici 13.

V primeru 14 parov izbranih začetnih oligonukleotidov smo pri 9 namnožili PCR produkt pričakovane velikosti, pri 5 parih pa ni prišlo do namnožitve PCR produkta (preglednica 29).

Preglednica 29: Uspešnost pomnoževanja preizkušenih začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Uspešnost pomnoževanja
VAITS1 in VAITS2	+
VA-G2-1 in VA-G2-2	-
VDITS1 IN VDITS2	+
VTITS1 in VTITS2	+
VITS1 in VITS2	+
VR1 in VR2	+
VR-NL1 in VR-NL2	+
VD-RF1 in VD-RF2	+
VD-RA1 in VD-RA2	-
VD-D1 in VD-D2	-
VD-ND1 in VD-ND1	-
9-1E-for in 9-1E-rev	+
9-2E-for in 9-2E-rev	+
VTR-ITS1 in VTR-ITS2	-

Pri paru začetnih oligonukleotidov VAITS1 in VAITS2, ki namnoži ITS odsek specifičen za *Verticillium albo-atrum*, je prišlo do pomnoževanja pričakovanega PCR produkta dolžine 213 bp in sicer pri izolatih *V. albo-atrum* PG2 Bizjak, *V. albo-atrum* PG1 Rečica in *V. albo-atrum* 11₅₄ (slika 2). Pri ostalih izolatih ni prišlo do namnožitve.



Slika 2: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VAITS1 in VAITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: V. t. EX F8; 2: V. t. JKG 20; 3: V. d. 12042; 4: V. d. Kresnik D; 5: V. a.-a. Cizej PG2 25; 6: V. a.-a. Rečica PG1 21; 7: V. a.-a. izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru VDITS1 in VDITS2, ki namnoži ITS odsek specifičen za *Verticillium dahliae*, je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine 203 bp pri izolatih *V. dahliae* 12042 in *V. dahliae* Kresnik D (slika 3). Pri ostalih izolatih ni prišlo do namnožitve.



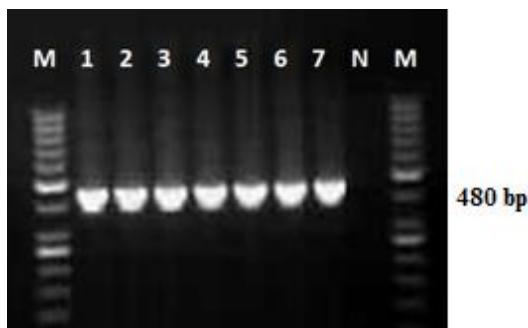
Slika 3: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VTITS1 in VTITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru VTITS1 in VTITS2, ki je specifičen za *Verticillium tricorpus*, je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine 337 pb pri izolatih *V. tricorpus* JKG 20 in *V. tricorpus* EX F8 (slika 4). Pri ostalih izolatih ni prišlo do namnožitve.



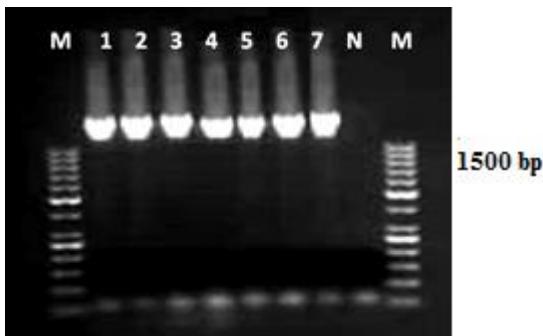
Slika 4: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VTITS1 in VTITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru VITS1 in VITS2, ki namnoži ITS odsek, ki je prisoten pri vseh vrstah gliv rodu *Verticillium*, je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine 480 bp pri vseh preizkušenih izolatih (slika 5).



Slika 5: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VITS1 in ViITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru VR1 in VR2, ki je specifičen za vse glive rodu *Verticillium*, je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine približno 1500 bp pri vseh preizkušenih izolatih (slika 6).



Slika 6: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VR1 in VR2. M:dolžinski marker (50bp); Številka Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru VR-NL1 in VR-NL2, ki je specifičen za obliko *Verticillium albo-atrum*, ki ne okuži lucerne, je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine 300 bp pri izolatih *V. albo-atrum* PG2 Bizjak in *V. albo-atrum* PG1 Rečica (slika 7).



Slika 7: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VR-NL1 in VR-NL2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru VD-RF1 in VD-RF2, ki je specifičen za *Verticillium dahliae*, je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine 580 bp pri *V. dahliae* 12042 in *V. dahliae* Kresnik D (slika 8).



Slika 8: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov VD-RF1 in VD-RF2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru 9-1Efor in 9-1Erev, ki je specifičen za PG2 obliko *V. albo-atrum*, je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine 248 bp le pri izolatu *V. albo-atrum* PG2 (slika 9). Pri *V. albo-atrum* izoliranemu iz lucerne, ni prišlo do pomnoževanja, kar kaže višjo specifičnost tega para začetnikov. Prav tako ni prišlo do namnožitve tudi pri ostalih izolatih.



Slika 9: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov 9-1Efor in 9-1Erev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

Pri paru 9-2Efor in 9-2Erev, ki je specifičen za PG2 obliko *Verticillium albo-atrum* je prišlo do nastanka PCR produkta dolžine 190 bp in sicer pri izolatih *V. albo-atrum* PG2 in *V. albo-atrum* 11₅₄ (slika 10). Pri ostalih izolatih ni prišlo do namnožitve.



Slika 10: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolatov *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* s parom začetnih oligonukleotidov 9-2E-for in 9-2E-rev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: *V. t.* EX F8; 2: *V. t.* JKG 20; 3: *V. d.* 12042; 4: *V. d.* Kresnik D; 5: *V. a.-a.* Cizej PG2 25; 6: *V. a.-a.* Rečica PG1 21; 7: *V. a.-a.* izolirana iz lucerne 11₅₄; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

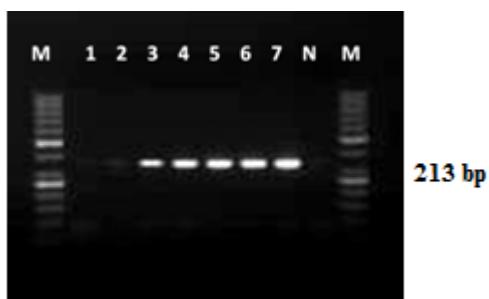
4.2.1 Preizkus nivoja detekcije začetnih oligonukleotidov

Pri določitvi najprimernejših začetnih oligonukleotidov za glive rodu *Verticillium* smo bili pozorni tudi na nivo detekcije začetnika oziroma kolikšno koncentracijo DNA v vzorcu še lahko pomnoži in je PCR produkt viden na agaroznem gelu.

Naredili smo redčitveno vrsto nekaj vzorcev in tako smo v PCR reakciji uporabili od 0,001 ng do 20 ng izolirane DNA (preglednica 17).

Preizkusili smo le nekatere začetne oligonukleotide, ki so se v prejšnjem poskusu izkazali za najbolj primerne.

S parom začetnih oligonukleotidov VAI TS1 in VAI TS2 smo izvedli PCR reakcijo na različnih koncentracijah DNA več vzorcev in sicer *V. albo-atrum* PG1 Rečica 21, *V. albo-atrum* PG2 Rožič 23, *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24 in *V. albo-atrum*. PG2 Cizej 25. Izkazalo se je, da je za uspešnost pomnoževanja DNA pomembno, da je v PCR vzorcu prisotno vsaj 0,1 ng DNA (slika 11), je pa prišlo do nastanka produkta tudi pri količini 0,01 ng DNA (vzorec *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24).



Slika 11: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum* PG2 Rožič 23 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VAI TS1 in VAI TS2. M: dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp).

S parom začetnih oligonukleotidov VITS1 in VITS2 smo izvedli PCR reakcijo vzorcu *V. albo-atrum* PG1 Rečica 21. Izkazalo se je, da je za uspešnost pomnoževanja DNA pomembno, da je v PCR vzorcu prisotno vsaj 0,1 ng DNA (slika 12).



Slika 12: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata vzorcu *V. albo-atrum* PG1 Rečica 21 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VITS1 in VITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)

S parom začetnih oligonukleotidov 9-1Efor in 9-1Erev smo izvedli PCR reakcijo na različnih koncentracijah DNA več vzorcev in sicer *V. albo-atrum* PG2 Rožič 23, *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24 in *V. albo-atrum* PG2 Cizej 25. Izkazalo se je, da je za uspešnost pomnoževanja DNA pomembno, da je v PCR vzorcu prisoten vsaj 1 ng DNA (slika 13).



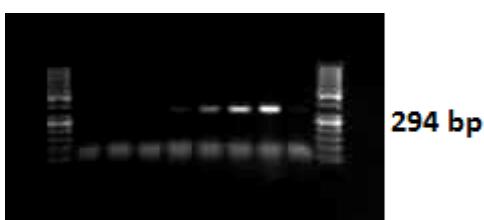
Slika 13: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum* PG2 Cizej 25 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov 9-1E-for in 9-1E-rev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)

S parom začetnih oligonukleotidov 9-2Efor in 9-2Erev smo izvedli PCR reakcijo na različnih koncentracijah DNA več vzorcev in sicer *V. albo-atrum* PG2 Rožič 23, *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24 in *V. albo-atrum* PG2 Cizej 25. Izkazalo se je, da je za uspešnost pomnoževanja DNA pomembno, da je v PCR vzorcu prisoten vsaj 1 ng DNA (slika 14).



Slika 14: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov 9-2Ezfor in 9-2Ezrev. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)

S parom začetnih oligonukleotidov VD-ITS1 in VD-ITS2 smo izvedli PCR reakcijo na različnih koncentracijah DNA dveh vzorcev in sicer *V. dahliae* Kresnik D in *V. dahliae* 12042. Za uspešnost pomnoževanja DNA je pomembno, da je v PCR vzorcu prisotno vsaj 5 ng DNA (slika 15).



Slika 15: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. dahliae* Kresnik D z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VD-ITS1 in VD-ITS2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)

S parom začetnih oligonukleotidov VR-NL1 in VR-NL2 smo izvedli PCR reakcijo na različnih koncentracijah DNA več vzorcev in sicer *V. albo-atrum* PG2 Rožič 23 in *V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24. Izkazalo se je, da je za uspešnost pomnoževanja DNA pomembno, da je v PCR vzorcu prisoten vsaj 0,1 ng DNA (slika 16).



Slika 16: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju genomske DNA izolata *V. albo-atrum*. PG2 Bizjak 24 z različnimi koncentracijami DNA s parom začetnih oligonukleotidov VR-NL1 in VR-NL2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: 0,001 ng DNA; 2: 0,01 ng DNA; 3: 0,1 ng DNA; 4: 1 ng DNA; 5: 5 ng DNA; 6: 10 ng DNA; 7: 20 ng DNA; N: negativna kontrola (voda); M: marker (50bp)

4.3 ZEMLJA-MIKROBIOLOŠKO TESTIRANJE IN IZOLACIJA

V drugem delu diplome smo PCR detekcijo preizkušali na DNA izolirano iz kužnih tal z različnimi ekstrakcijskimi postopki. Osredotočili smo se na *Verticillium albo-atrum*, saj je ta vrsta najpogosteša na slovenskih hmeljiščih. Uporabili smo tako le začetnike, specifične za to vrsto.

4.3.1 Mikrobiološko testiranje

Pridobili smo vzorce zemlje iz lokacij, kjer je bila najdena in potrjena verticilijska uvelost. Vzeli smo 22 kužnih vzorcev. Kot negativne vzorce smo vzeli vzorec zemlje iz gozda, iz travnika in dveh njiv pred IHPS.

Vzorce smo imeli shranjene v hladilniku pri -4 °C. Pred samo izolacijo DNA iz zemlje smo izvedli mikrobiološko testiranje zemlje, da smo določili prisotnost gliv *Verticillium* spp. in da smo ugotovili, koliko je bilo zraslih kolonij na petrijevki z CH2 trdnim gojiščem. Mikrobiološko testiranje je bilo potrebno tudi za potrditev odsotnosti gliv *Verticillium* spp. v negativnih vzorcih.

Rezultati so pokazali, da pri 3 od 22 vzorcev kužne zemlje ni zraslo nič kolonij, pri ostalih vzorcih pa je prišlo do nastanka kolonij. Na podlagi teh rezultatov smo potrdili odsotnost glive v negativnih vzorcih in izbrali štiri najbolj kužne vzorce za nadaljnjo testiranje (preglednica 30).

Preglednica 30: Število zraslih kolonij pri različnih redčitvah najbolj kužnih izbranih vzorcev

Oznaka vzorca in ponovitev	Neredčen vzorec	Število zraslih kolonij pri različnih redčitvah			
		1:10	1:100	1:1000	1:10000
1a	/	2	0	0	0
1b	/	1	0	0	0
2a	1	0	0	0	0
2b	/	0	0	0	0
3a	/	1	1	0	0
3b	/	0	0	0	0
4a	/	1	2	0	0
4b	/	1	0	0	0
5a	/	0	0	0	0
5b	/	0	0	0	0
6a	/	4	0	0	0
6b	/	6	0	0	0
7a	/	1	0	1	0
7b	/	0	0	0	0

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 30: Število zraslih kolonij pri različnih redčitvah najbolj kužnih izbranih vzorcev

Oznaka vzorca in ponovitev	Neredčen vzorec	Število zraslih kolonij pri različnih redčitvah			
		1:10	1:100	1:1000	1:10000
8a	/	0	2	0	0
8b	2	0	0	0	0
9a	/	1	3	0	0
9b	/	4	4	1	0
10a	/	0	0	0	0
10b	/	0	0	0	0
11a	6	3	0	0	0
11b	7	2	1	0	0
12a	/	5	1	0	0
12b	/	4	2	0	0
13a	/	10	1	0	0
13b*	4	6	2	1	0
14a*	/	2	3	0	0
14b	/	2	1	0	0
15a	/	2	2	0	0
15b	/	6	5	1	0
16a	/	7	1	0	0
16b	/	6	2	0	0
17a	/	4	2	0	0
17b	/	5	4	0	0
18a	/	2	1	0	0
18b	/	3	1	0	0
19a*	13	3	1	0	0
19b*	9	9	2	0	0
20a*	11	8	3	0	0
20b*	15	13	3	0	0
21a	/	0	0	0	0
21b	/	0	0	0	0
22a*	13	4	1	0	0
22b*	10	3	0	0	0
Ga*	0	0	0	0	0
Gb*	0	0	0	0	0
Ta*	0	0	0	0	0
Tb*	0	0	0	0	0
N1a*	0	0	0	0	0
N1b*	0	0	0	0	0
N2a*	0	0	0	0	0
N2b*	0	0	0	0	0

* Vzorci izbrani za PCR analize

/ Petrijevke so bile popolnoma preraščene z bakterijami in drugimi glivami, tako da se ni dalo potrditi prisotnosti gliv rodu *Verticillium*

4.3.2 Izolacija DNA iz zemlje in preverjanje uspešnosti izolacije

V znanstvenih člankih smo poiskali različne metode izolacije DNA iz zemlje in dve od teh metod tudi preizkusili. Preizkusili smo tudi komercialni kit, ki je namenjen izolaciji DNA iz zemlje.

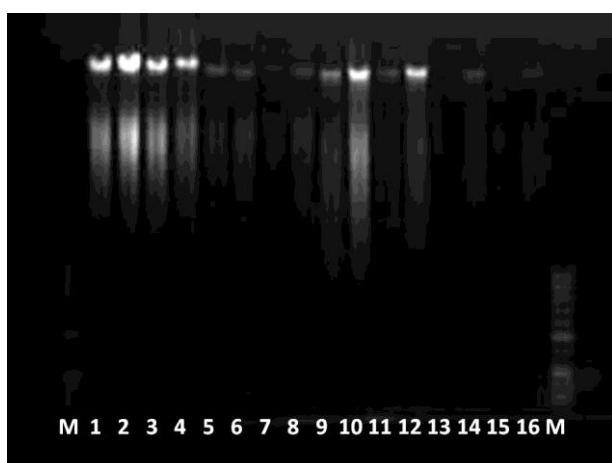
4.3.2.1 Metoda 1

Prva metoda, povzeta po Yeates in sod., 1998, je temeljila na uporabi steklenih kroglic in bead beaterja. To je naprava, v katero se vpne epruveta z vzorcem in kroglicam. Naprava epruvete stresa z veliko hitrostjo in s tem povzroči nastanek velikih mehanskih sil in trkov, ki naj bi povzročili razbitje trajnih organov.

Po končani izolaciji smo DNA skupaj z barvilom in vodo na nanesli na 0,8 % agarozni gel, da smo na podlagi celokupne DNA na gelu lahko določili, ali je bila izolacija iz zemlje uspešna.

V primeru prve metode smo ugotovili, da je bila izolacija delno uspešna, saj so v vrstah 1-4 ter 10 in 12 (slika 17) lepo vidni signali celokupne izolirane DNA, v drugih vrstah pa so signali zelo šibki oziroma jih sploh ni. V vseh vrstah smo pričakovali močne signale, saj gre tu za izolate celokupne DNA v zemlji, kar zajema bakterijsko, rastlinsko, glivno ter tudi živalsko DNA, ki je prisotna v zemlji.

Na podlagi tega rezultata smo vzeli vzorce, ki so kazali najmočnejše signale za nadaljnje analize (vzoreci 13, 19, G in T).

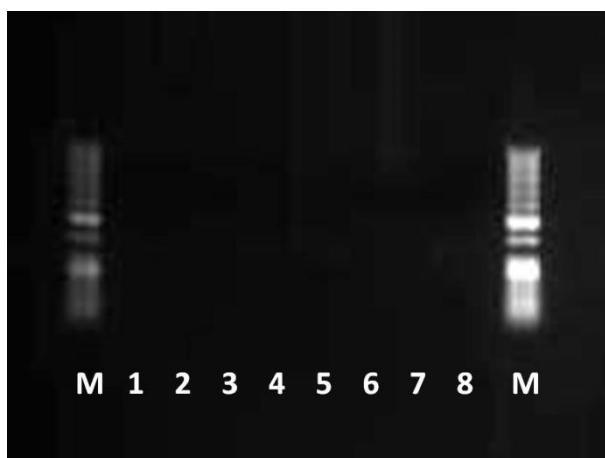


Slika 17: 0,8 % agarozni gel: Direkten nanos DNA izolirane iz vzorcev zemlje po prvi metodi (Yeates in sod., 1998). M: dolžinski marker (50bp); Številka 1 in 2: vzorec 13 (kužna zemlja); 3 in 4: vzorec 19 (kužna zemlja); 5 in 6: vzorec 19 (kužna zemlja); 7 in 8: vzorec 22 (kužna zemlja); 9 in 10: G (gozd); 11 in 12: T (travnik); 13 in 14: N1 (njiva pred IHPS 1); 15 in 16: N2 (njiva pred IHPS 2); M: marker (50bp)

4.3.2.2 Metoda 2

Druga metoda je bila povzeta in prilagojena po Garcia-Pedrajas in sod., 1999. Ta metoda je temeljila na zmletju zemlje z uporabo možnarja in pestila, ter na dodatku suspenzije posnetega mleka v prahu. Mleko veže nase huminske kisline, ki so prisotne v zemlji in so največji inhibitor PCR.

Po nanosu izoliranih vzorcev na gel smo ugotovili, da je ta metoda popolnoma neuspešna, saj na sliki gela ni nobenega signala (slika 18). Razlog za neuspeh je verjetno v tem, da je bila metoda razbitja celic (možnar in pestilo) slaba in do razbitja celic sploh ni prišlo. Vseeno smo vzorce analizirali tudi z metodo PCR. Vzeli smo vzorce 13, 19, G in T.



Slika 18: 0,8 % agarozni gel: Direkten nanos DNA izolirane iz vzorcev zemlje po drugi metodi (Garcia-Pedrajas in sod., 1999). M: dolžinski marker (50bp); Številka 1: vzorec 13 (kužna zemlja); 2: vzorec 19 (kužna zemlja); 3: vzorec 19 (kužna zemlja); 4: vzorec 22 (kužna zemlja); 5: G (gozd); 6: T (travnik); 7: N1 (njiva pred IHPS 1); 8: N2 (njiva pred IHPS 2); M: marker (50bp)

4.3.2.3 Metoda 3

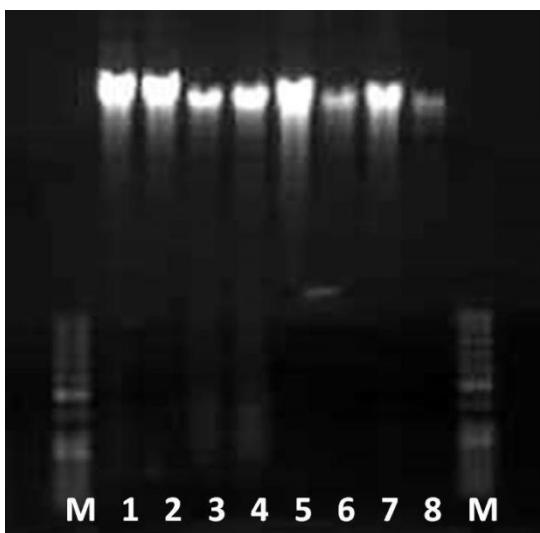
Tretja metoda izolacije je bila izolacija s komercialnim kitom PowerMaxTM Soil DNA isolation Kit (MoBio).

Ključen korak te metode je mehansko razbitje zemlje in celic v njej. Proizvajalec priporoča, da se za razbitje zemlje uporabi bead beater, v katerega se lahko vpnejo 100 mL epruvete. Mi smo imeli bead beater z nastavkom le za manjše vzorce, zato smo vzorce vpeli v stresalno kopel (60 °C), pri kateri pa prihaja v vzorcih do znatno manjših mehanskih sil.

Ostali koraki temeljijo na ekstrakciji, čiščenju in vezavi DNA na membrano, pri čemer sestave ekstrakcijskih pufrov in koncentracije kemikalij niso popolnoma znane.

Po nanosu vzorcev na gel smo ugotovili, da je metoda uspešna, saj smo pri vseh nanešenih vzorcih dobili jasne signale, ponekod tudi zelo močne (slika 19), čeprav nismo uporabili velikih mehanskih sil. Za nadaljnje analize smo vzeli vzorce 13, 19, G in T. S temi

analizami smo želeli ugotoviti, ali smo skupaj z izolirano DNA izolirali tudi DNA iskanih gliv in ali je bila količina izoliranih inhibitorjev tolikšna, da je PCR še uspel.



Slika 19: 0,8 % agarozni gel: Direkten nanos DNA iz zemlje izolirane po tretji metodi (komercialni kit MoBio). M: dolžinski marker (50bp); Številka 1: vzorec 13 (kužna zemlja); 2: vzorec 19 (kužna zemlja); 3: vzorec 19 (kužna zemlja); 4: vzorec 22 (kužna zemlja); 5: G (gozd); 6: T (travnik); 7: N1 (njiva pred IHPS 1); 8: N2 (njiva pred IHPS 2); M: marker (50bp)

4.4 PREVERJANJE USPEŠNOSTI IZOLACIJE S PCR

4.4.1 PCR izolatov zemlje s splošnimi začetnimi oligonukleotidi za glive

Naslednji korak preverjanja uspešnosti izolacije DNA iz vzorcev zemlje je bil PCR z uporabo parov začetnih oligonukleotidov, specifičnih za glive; ITS1/ITS4 in 18sRNA-forward/18sRNA-reverse. Cilj tega preizkusa je bilo ugotoviti, ali smo z uporabljenimi metodami izolirali dovolj kakovostne DNA, ki jo še lahko pomnožimo s splošnimi začetniki in ali obstaja potencial, da bi lahko namnožili tudi DNA z začetniki, splošnimi za ta rod in vrsto, ki nas zanima.

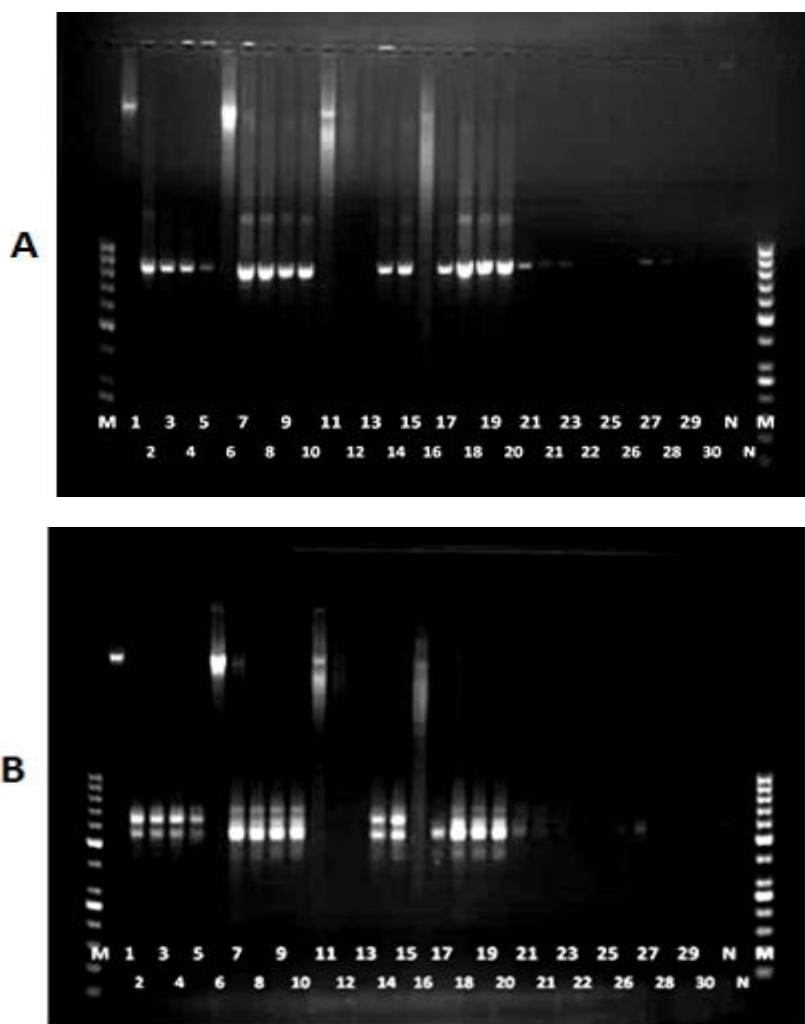
Od vsake izolacije smo preizkusili po en pozitivni in en negativni vzorec, katerega smo redčili v razmerju 1:10, 1:100, 1:200 in 1:500, da bi izločili vpliv izoliranih snovi, ki inhibitorno vplivajo na reakcijo.

Izkazalo se je, da sta bili prva izolacija, povzeta po Yeates in sod., 1998, ter izolacija s komercialnim kitom MoBio zelo uspešni, saj smo dobili močne signale skoraj pri vseh vzorcih in redčitvah, razen pri neredčenih vzorcih, saj je bila tam verjetno koncentracija inhibitornih snovi prevelika.

Na sliki 20A je razvidno, da smo dobili čiste signale pri 900bp, nikjer ni prišlo do nastanka nespecifičnih produktov. Produkte smo dobili že pri redčitvi 1:10, kar kaže na razmeroma čiste izolate DNA z malo koncentracijo inhibitorjev, prav tako pa smo dobili produkte še pri redčitvi 1:500, kar kaže na visoko koncentracijo izolirane glivne DNA.

Na sliki 20B je sicer razvidno, da prihaja do nastanka nespecifičnih produktov, vendar so signali specifičnih produkrov zelo jasni in močni. Tudi tu je razvidno, da je koncentracija izolirane glivne DNA visoka, koncentracija inhibitorjev pa nizka.

Potrdili smo tudi, da je bila druga izolacija, povzeta po Garcia-Pedrajas in sod., 1999, res popolnoma neuspešna, saj nikjer ni bil viden jasen signal.



Slika 20: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po vseh treh metodah. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje (tretja metoda); 6-10: izolat nekužne zemlje (tretja metoda); 11-15: izolat kužne zemlje (prva metoda); 16-20: izolat nekužne zemlje (prva metoda); 21-25: izolat kužne zemlje (druga metoda); 26-30: izolat nekužne zemlje (druga metoda); N: negativna kontrola (voda); M: dolžinski marker (50bp).

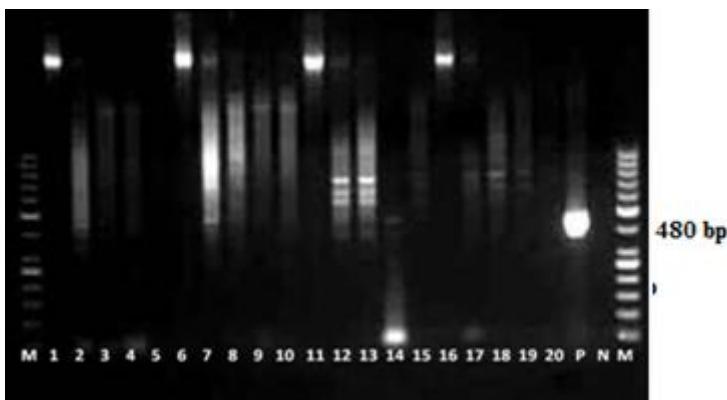
A: Uporabljen par začetnih oligonukleotidov: 18sRNA-forward in 18sRNA-reverse

B: Uporabljen par začetnih oligonukleotidov: VITS1 in VITS4

4.4.1.1 PCR izolatov zemlje s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi

Naslednji korak iskanja najbolj primerne metode izolacije DNA iz zemlje za detekcijo glive *Verticillium albo-atrum* je bila uporaba specifičnih začetnih oligonukleotidov. Uporabili smo začetnik, specifičen za glive iz rodu *Verticillium* in začetnike, ki so specifični za vrsto *Verticillium albo-atrum* in ki so se v prejšnjih preizkusih pokazali za najbolj primerne (jakost signala in nivo detekcije). Tako smo uporabili začetnike VITS1/VITS2, VR-NL1/VR-NL2, VAITS1/VAITS2 in 9-1Efor/9-1Erev. Prav tako smo preizkusili polimerazo dveh različnih proizvajalcev (Promega in Novagen). PCR smo izvedli na vzorcih vseh treh izolacij in sicer smo vzeli po dva kužna (vzorec 13 in 19) in po dva negativna vzorca (G in T). Vsak vzorec smo redčili v razmerju 1:10, 1:100, 1:200 in 1:500.

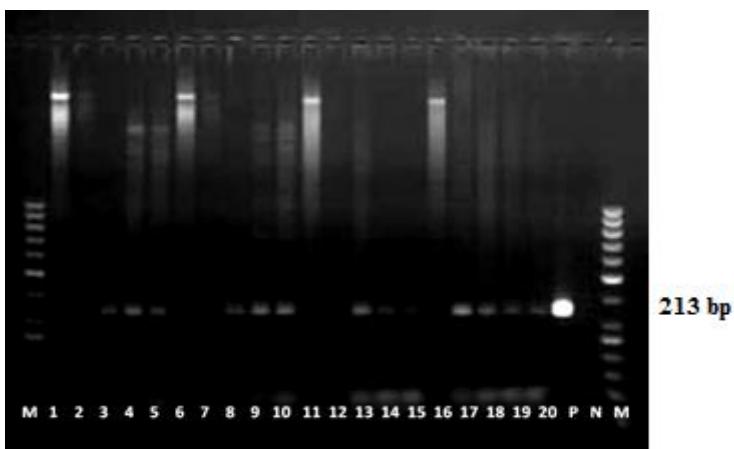
Najprej smo preizkusili začetnika VITS1 in VITS2, ki sta splošna za glive rodu *Verticillium*. Uporabili smo polimerazo proizvajalca Promega. Izkazalo se je, da s tem parom začetnikom ne moremo namnožiti DNA *Verticillium* spp., domnevno izolirane iz naših vzorcev zemlje. Pri prvi in drugi izolaciji ni nikjer prišlo do nastanka produkta, le pri pozitivni kontroli (*V. albo-atrum* PG2 Bizjak). Pri tretji izolaciji je prišlo do nastanka nespecifičnih produktov in sledi (slika 21).



Slika 21: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po tretji metodi (MoBio) z uporabo para začetnih oligonukleotidov VITS1 in VITS2 in uporabo polimeraze proizvajalca Promega. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp).

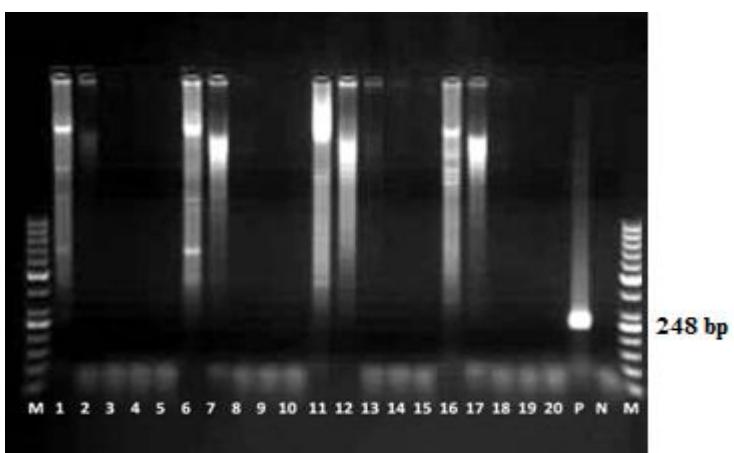
Z uporabo dveh različnih polimeraz smo preizkusili tudi par začetnikov VAITS1 in VAITS2, ki namnoži ITS odsek, prisoten pri glivi *Verticillium albo-atrum*. Izkazalo se je, da tudi ta par začetnikov ni primeren, saj prihaja do namnoževanja produktov pravilne dolžine tam, kjer do tega naj ne bi prišlo (nekužni vzorci zemlje). Najbolj očitno je to bilo pri prvi metodi, kjer je prišlo do nastanka produkta prave dolžine pri vseh vzorcih, razen pri tistih, ki niso bili redčeni oziroma so bili redčeni v razmerju 1:10 (slika 22). Tu ni prišlo

do nastanka produkta verjetno zaradi prevelike koncentracije izoliranih inhibitorjev. Tudi pri drugi metodi je prišlo do nastanka nespecifičnih produktov pravilnih dolžin, pri tretji pa do nastanka produkta ni prišlo pri nobenem vzorcu, razen pri pozitivni kontroli.



Slika 22: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po prvi metodi z uporabo para začetnih oligonukleotidov VAITS1 in VAITS2 in uporabo polimeraze proizvajalca Novagen. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum*. PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp).

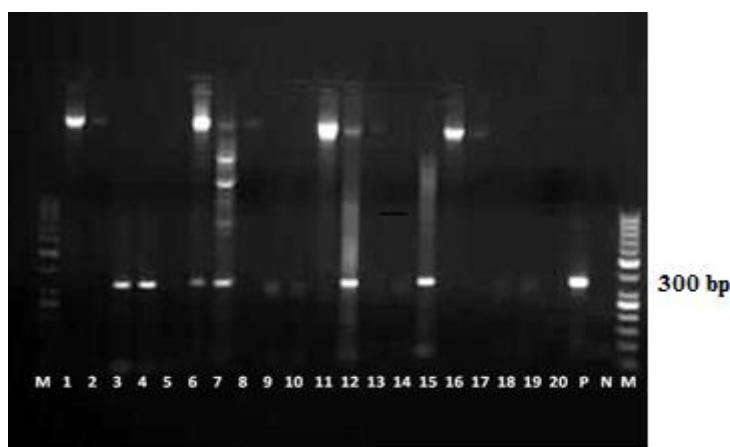
Naslednji par preizkušenih začetnikov je bil par 9-1Efor in 9-1Erev, ki namnoži DNA letalne (PG2) oblike *Verticillium albo-atrum*. Ta par začetnih oligonukleotidov se je pri vseh treh izolacijah izkazal za neprimerenega, saj nikjer ni prišlo do namnožitve PCR produktov (slika 23).



Slika 23: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po tretji metodi z uporabo para začetnih oligonukleotidov 9-1Efor in 9-1Erev in uporabo polimeraze proizvajalca Novagen. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum*. PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp).

Zadnji par preizkušenih začetnikov je bil par VR-NL1 in VR-NL2, ki namnoži vse seve *Verticillium albo-atrum*, razen tistih, ki okužujejo lucerno. Rezultati so pokazali, da je prišlo pri drugi metodi izolacije do nastanka produktov zelo šibkih signalov prave dolžine in sicer pri večini vzorcev, tudi pri nekužnih. Pri prvi metodi do nastanka produktov ni prišlo.

Pri tretji metodi je sicer prišlo do nastanka močnih signalov pravilnih dolžin pri vzorcih kužne zemlje, vendar je prišlo do takšnih produktov tudi pri vzorcih nekužne zemlje (slika 24). Rezultati kažejo na nizko specifičnost začetnikov, ki se ne morejo uporabiti pri PCR vzorcev, izoliranih iz zemlje.

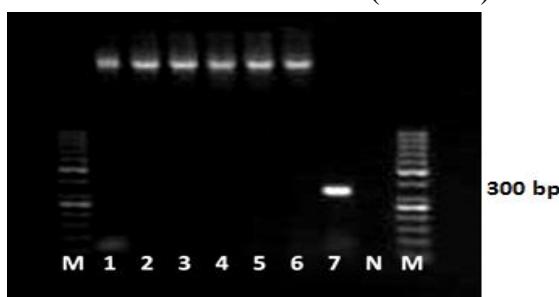


Slika 24: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA izolirane iz zemlje po tretji metodi z uporabo para začetnih oligonukleotidov VR-NL1 in VR-NL2 in uporabo polimeraze proizvajalca Promega. M: dolžinski marker (50bp); Številke 1-5: izolat kužne zemlje vzorca 13 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 6-10: izolat kužne zemlje vzorca 19 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 11-15: izolat nekužne zemlje vzorca G1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); 16-20: izolat nekužne zemlje vzorca T1 (neredčen, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500); P: pozitivna kontrola (*V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24); N: negativna kontrola (voda); M: dolžinski marker (50bp).

4.4.1.2 Preizkus inhibicije PCR

V zadnjem delu diplomske naloge smo želeli ugotoviti, ali smo z različnimi metodami izolacije izolirali tudi inhibitorne snovi iz zemlje in kakšnem vpliv imajo na potek PCR. V neredčene in redčene (razmerje 1:100) izolate zemlje (kužne in nekužne) smo dodajali DNA (*V. albo-atrum* PG2 Bizjak 24) v različnih koncentracijah in izvedli PCR z uporabo začetnikov VR-NL1 in VR-NL2.

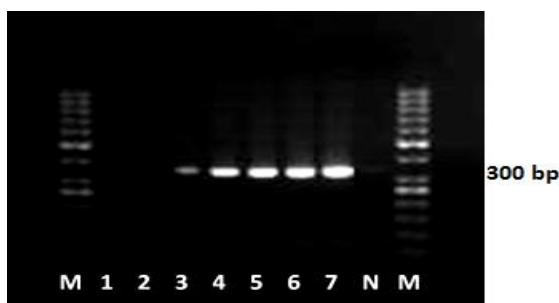
Izkazalo se je, da je bilo s prvo in tretjo metodo izoliranih toliko inhibitornih snovi, da so pri neredčenih vzorcih zemlje le te popolnoma preprečile nastanek specifičnih produktov iz dodane DNA *V. albo-atrum* (slika 25).



Slika 25: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA, ki je bila dodana neredčenim izolatom kužne zemlje (metoda 3), z uporabo začetnikov VR-NL1 in VR-NL2. M: dolžinski marker (50bp); Številka 1: izolat zemlje + 0,001 ng DNA; 2: izolat + 0,01 ng; 3: izolat + 0,1 ng; 4: izolat + 1 ng; 5: izolat + 5 ng; 6: izolat + 10 ng; 7: izolat + 20 ng; N: negativna kontrola (voda); M: dolžinski marker (50bp).

Pri drugi izolaciji je prišlo do nastanka PCR produktov, čeprav vzorcev nismo redčili. Ugotovili smo že, da je bila ta metoda popolnoma neuspešna pri izolaciji DNA, obenem tudi ni prišlo do izolacije inhibitornih snovi.

Ko smo redčili izolate zemlje z 1:100, pa je prišlo do nastanka specifičnih PCR produktov dodane DNA *V. albo-atrum* pri vseh treh metodah. Pokazalo pa se je, da je prišlo pri tretji metodi do nastanka produkta že pri koncentraciji dodane DNA 0,1 ng, pri prvi metodi pa pri koncentraciji 1 ng, kar pomeni, da smo s tretjo metodo izolirali manj inhibitornih snovi.



Slika 26: Agarozni gel: PCR produkti nastali pri namnoževanju DNA, ki je bila dodana izolatom kužne zemlje, redčene 1:100 (metoda 3), z uporabo začetnikov VR-NL1 in VR-NL2. M:dolžinski marker (50bp); Številka 1: izolat zemlje + 0,001 ng DNA; 2: izolat + 0,01 ng; 3: izolat + 0,1 ng; 4: izolat + 1 ng; 5: izolat + 5 ng; 6: izolat + 10 ng; 7: izolat + 20 ng; N: negativna kontrola (voda); M:dolžinski marker (50bp).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Eno večjih tveganj hmeljarske pridelave predstavlja karantenska bolezen verticilijska uvelost hmelja, ki jo povzročata talni glivi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *V. dahliae* Klebahn. Glivi prodreta v rastlino preko koreninskega sistema, se širita v prevodni sistem, tam pa motita preskrbo celic z vodo. Posledično prihaja do odmiranja tkiva. V tem tkivu nastajajo trajni organi, ki se po propadu rastline ali njenih delov sprostijo v tla in so del naslednjih infekcijskih ciklov ter lahko v tleh preživijo po več let.

Eden izmed ukrepov za nadaljevanje pridelave na okuženih hmeljiščih je eliminacija talnega infekcijskega potenciala, ki se izvaja v obliki obvezne 4 letne karantenske premene z gojenjem negostiteljskih rastlin kot so npr. žita ali trave. Pred ponovno zasaditvijo nasada je potrebno preveriti uspešnost karantenske premene, da se pridelovalec izogne tveganju ponovnega izbruha bolezni. V ta namen se večinoma uporabljo mikrobiološke diagnostične analize za detekcijo gliv rodu *Verticillium*, ki pa so dolgotrajne, prav tako pa se z njimi ne da določiti patotipa glive.

V zadnjem desetletju se zato intenzivno razvijajo metode za testiranja tal, ki temeljijo na osnovi polimerazne verižne reakcije (PCR) in ponujajo hitrejšo analizo, visok nivo detekcije in patotipsko specifičnost analize.

5.1.1 Preizkus specifičnosti in nivoja detekcije najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov v diagnostiki gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* IN *V. tricorpus*

5.1.1.1 Preizkus specifičnosti začetnikov

Cilj te naloge v prvem delu je bil preizkus specifičnosti namnoževanja najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov za detekcijo gliv rodu *Verticillium*.

V ta namen smo namnožili več vzorcev treh najpogostejših gliv rodu *Verticillium* prisotnih na slovenskih hmeljiščih in sicer *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus*. Izvedli smo SDS ekstrakcijo DNA iz micelija teh gliv in izvedli serijo ponovitev PCR na istih vzorcih z različnimi začetniki.

Izkazalo se je, da 5 od 14 začetnikov ne deluje na naših vzorcih. Med temi je bil 1 specifičen za *V. tricorpus* in 4 za *V. dahliae*. Začetniki, specifični za cel rod ter za *V. albo-atrum* so vsi delovali.

Vzrok za neuspešnost pomnoževanja je verjetno v tem, da so bili ti začetniki narejeni na podlagi glive *V. dahliae* oziroma *V. tricorpus*, ki okužujeta druge gostiteljske rastline in ne hmelja (oljka, bombaž, krompir). Vse to kaže na visoko specifičnost teh začetnikov, ki lahko namnožijo *V. dahliae* oziroma *V. tricorpus* izoliranih le iz določenih gostiteljskih rastlin.

Čeprav so Li in sod., 1999, par začetnikov VD-RA1/VD-RA2 (gostiteljska rastlina krompir) uspešno preizkusili tudi na hmelju kot gostiteljski rastlini (izolat iz ameriške zvezne države Oregon) je bilo pri nas pomnoževanje neuspešno. Tudi to je dokaz za visoko specifičnost tega začetnika, ki uspešno deluje le na *V. dahliae*, izoliranem iz določenih gostiteljskih rastlin v nekem ozkem geografskem področju. Da bi popolnoma potrdili te trditve, bi morali ponoviti PCR reakcijo še na izolatih *V. dahliae*, izoliranih iz krompirja. Žal teh izolatov nismo imeli, zato so naše trditve osnovane na le na večkratni ponovitvi PCR z uporabo omenjenih začetnikov.

V Španiji predstavlja okužba z verticilijsko uvelostjo oljk enega večjih gospodarskih problemov, prevladujoča vrsta je tam *V. dahliae*. Perez-Artes in sod., 2000, so tako na podlagi izolatov *V. dahliae* iz oljk določili nekaj specifičnih RAPD markerjev in na podlagi teh ugotovili, da obstajata dve obliki *V. dahliae*, hujša in blažja oblika. Za obe so tako razvili specifične začetnike (VD-D1/VD-D2 ter VD-ND1/VD-ND2). Po večih poskusih PCR se je izkazalo, da noben ob teh ne more namnožiti DNA *V. dahliae*, izolirane iz hmelja. Rezultat kaže na visoko specifičnost teh začetnikov, ki lahko namnožijo *V. dahliae* le iz določenih vrst (oljka). Za dokončno potrditev te izjave bi tudi tu bilo potrebno preizkusiti začetnike na pozitivni kontroli (*V. dahliae* iz oljke).

Robb in sod., 1993 so ugotovili, da določenega izolata *V. albo-atrum* iz krompirja ne morejo dokazati s standardnimi začetniki za *V. albo-atrum* (VAITS1/VAITS2). S poskusi so ugotovili, da bi lahko pravzaprav vrsto *V. albo-atrum* razdelili v dve skupini. Narejen je bil tudi nov set začetnikov, specifičen za skupino 2 (grp2), VA-G2-1/VA-G2-1.

Ker so smo pri naših izolatih *V. albo-atrum* dobili produkte s standardnimi začetniki, dejansko pri uporabi začetnikov, specifičnih za drugo skupino, produktov nismo pričakovali. Rezultat je res bil negativen.

Par začetnikov, specifičnih za *V. tricorpus*, so Moukhamedov in sod., 1994, razvili na podlagi z *V. tricorpus* okuženim krompirjem. Delovanje začetnikov so preizkušali le na rastlinah krompirja. Pri nas ni prišlo do nastanka produktov zaradi višje specifičnosti začetnikov (gostitelj).

Za ostale začetnike, s katerimi smo uspešno namnožili iskane produkte, lahko trdimo, da so vsi primerni za PCR reakcije DNA, izolirane iz micelija *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus*.

5.1.1.2 Nivo detekcije

Pri naslednjem delu diplome smo želeli ugotoviti, kateri izmed delujočih začetnikov ima najvišji nivo detekcije DNA. V ta namen smo naredili redčitveno vrsto vzorca gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* in preizkusili začetnike na različnih količinah DNA (od 0,001 ng do 20 ng) v PCR vzorcu.

Izkazalo se je, da ima najvišji nivo detekcije par začetnikov VAITS1/VAITS2, specifičen za *V. albo-atrum*, saj smo uspešno namnožili vzorec, v katerem je bilo 0,01 ng DNA. Tudi par VR-NL1/VR-NL2 ter VITS1/VITS2 imata dokaj visok nivo detekcije, saj smo uspeli namnožiti vzorec z 0,1 ng DNA.

Nižji nivo detekcije je imel par začetnikov, specifičnih za *V. dahliae* (VD-ITS1/VD-ITS2) in sicer 5 ng. Kljub nizkemu nivoju detekcije je ta par primeren za PCR analize DNA, izolirane iz micelija glive.

Začetniki, specifični za PG2 obliko *V. albo-atrum* (9-1Efor/9-1Erev ter 9-2Efor/9-2Erev) imajo dokaj nizek nivo detekcije (1 ng DNA), zato so mogoče manj primerni za detekcijo DNA izolirane iz zemlje, vseeno pa zato primerni za detekcijo DNA iz micelija, saj so patotipsko specifični.

5.1.2 Tri metode izolacije DNA iz zemlje in preverjanje uspešnosti

V drugem delu diplome smo PCR detekcijo preizkusili na DNA, izolirani iz kužnih tal, z različnimi ekstrakcijskimi postopki. Predhodno smo izvedli mikrobiološke analize kužne in nekužne zemlje, da smo ugotovili, kateri vzorci so najbolj kužni in da smo potrdili odsotnost gliv rodu *Verticillium* v negativnih vzorcih.

5.1.2.1 Metoda 1

Prva metoda je bila povzeta in prilagojena po Yeates in sod., 1998. V protokolu je navedeno, da vzamemo 100 g zemlje za izolacijo, katero skupaj s steklenimi kroglicami prenesemo v 100 mL epruveto in vpnemo v bead beater, napravo, ki z veliko hitrostjo stresa epruveto, ustvarja mehanske sile in povzroči razbitje celic in trajnih organov v vzorcu. Ker smo imeli na voljo bead beater le za 2 mL vzorce, smo zmanjšali količino zemlje na 1g. S tem smo močno zmanjšali tudi količino potencialno izolirane DNA iz zemlje in možnost detekcije s PCR. Mikrobiološke analize so sicer pokazale, da je v zemlji dovolj gliv rodu *Verticillium*, katerih DNA bi se teoretično dala namnožit s PCR, vendar pa je v zemlji prisotno tudi ogromno DNA drugih organizmov in inhibitorne snovi, ki lahko močno ovirajo potek PCR.

Direkten nanos na gel je pokazal delno uspešnost izolacije, saj so vidni signali celokupne izolirane DNA le pri 6 od 16 vzorcev, poleg tega so tudi slabše jakosti.

V nadaljnjih poskusih bi bilo dobro preizkusiti isto metodo na 100 g vzorcih, predvsem zaradi večje količine DNA in pa zaradi statistične verjetnosti, saj vedno obstaja možnost, da v neki manjši količini zemlje ni zajet iskan organizem, čeprav je prisoten na določenem območju.

5.1.2.2 Metoda 2

Druga metoda je bila povzeta in prilagojena po Garcia-Pedrajas in sod., 1999. Ta metoda je bila popolnoma neuspešna, saj nismo uspeli izolirati DNA. Glavna pomanjkljivost je bila verjetno način mehanskega tretiranja zemlje, saj smo pri tej metodi uporabili le pestilo in možnar, s katerima pa verjetno nismo mogli ustvariti tako velikih mehanskih sil, da bi razbili celične stene in trajne organe. Druga pomanjkljivost pa je bila zelo majhna količina uporabljenega SDS pufra (6 µL) in fenol:kloroform:izoamilalkohola (6 µL). SDS je anionski detergent, ki razbije membrano, fenol:kloroform:izoamilalkohol pa se uporablja za povečanje učinkovitosti ekstrakcije nukleinskih kislin in odstranjevanje proteinov. Menimo, da je bilo obeh kemikalij absolutno premalo za učinkovito ekstrakcijo.

5.1.2.3 Metoda 3

Pri tretji metodi (komercialni kit MoBio) proizvajalec navaja, da je potrebno 100 mL epruvete z zemljo in kroglicami vpeti v bead beater in da je to ključni korak, ker tu pride do razbitja trajnih organov, katere tvori gliva v zemlji. Ker bead beater-ja nismo imeli, smo epruvete z zemljo privezali na čaše in le te vpeli v stresalno vodno kopel. Tu sicer prihaja do stresanja, vendar je to v primerjavi z bead beater-jem minimalno, zato je tudi možnost razbitja trajnih organov manjša.

Rezultati so sicer pokazali, da smo izolirali zadovoljivo količino DNA (direkten nanos na gel), vendar pa zaradi neustrezne opreme obstaja možnost, da smo dejansko izolirali le DNA drugih organizmov in ne DNA iskanih gliv, saj verjetno nismo razbili trajnih organov.

5.1.3 Preverjanje uspešnosti izolacij s PCR

5.1.3.1 PCR izolatov zemlje s splošnimi glivnimi začetnimi oligonukleotidi

Po izolaciji smo izvedli PCR z uporabo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za glive (ITS1/ITS4 in 18sRNA-forward/18sRNA-reverse).

Ugotovili smo, da sta prva in tretja metoda primerni za ekstrakcijo DNA in za PCR, saj smo z uporabo obeh parov začetnikov dobili produkte iskanih dolžin z zelo jasnimi signali. Proizvodi so bili vidni že pri redčitvi 1:10 pri obeh metodah, kar kaže na zelo visoko čistost DNA z zelo nizko koncentracijo inhibitorjev. Največji problem izolacije iz zemlje je namreč izolacija huminskih kislin in drugih inhibitornih snovi, ki močno ovirajo potek PCR. Ponavadi je tako potrebno redčiti vzorce, pri čemer pa obstaja možnost, da vzorec preveč redčimo in na koncu nimamo dovolj DNA v PCR vzorcu.

Pri nas pa se je pokazala visoka učinkovitost obeh metod, saj smo dobili produkte že pri redčitvi 1:10, prav tako pa smo dobili še zelo jasne signale pri redčitvi 1:500.

Seveda gre tu za celokupno DNA v zemlji, kar pomeni celotna DNA vseh gliv. Vseeno tak rezultat kaže potencial za nadaljne analize za detekcijo DNA *Verticillium* spp. v zemlji.

5.1.3.2 PCR izolatov zemlje s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi

Naslednji korak iskanja najbolj primerne metode izolacije DNA iz zemlje in določanja najprimernejših začetnikov za detekcijo je bila uporaba specifičnih začetnih oligonukleotidov. Uporabili smo začetnik, specifičen za glive rodu *Verticillium* in začetnike, ki so specifični za *Verticillium albo-atrum* in ki so se v prejšnjih preizkusih pokazali za najbolj primerne (jakost signala in nivo detekcije). Osredotočili smo se le na *V. albo-atrum*, saj je to najpogosteje vrsta rodu *Verticillium* na slovenskih hmeljiščih.

Najprej smo preizkusili par splošnih začetnikov za *Verticillium* spp., VITS1/VITS2. S tem parom ni nikjer prišlo do nastanka produkta, razen pri pozitivni kontroli. Menimo pa, da bi ta par vseeno lahko bil primeren za uporabo pri PCR na izolatih iz zemlje, saj so signali produktov pri namnoževanju DNA micelija iz glive močni, nivo detekcije je visok, par pa je tudi visoko specifičen, saj nikjer ni prišlo do nastanka nespecifičnih produktov, tudi pri vzorcih iz zemlje ne. Razlog za neuspeh pomnoževanja je verjetno izolacija, s katero nismo uspešno razbili trajnih organov in izolirali iskane DNA.

Izkazalo se je, da je par začetnikov VAITS1/VAITS2, ki namnoži ITS odsek, prisoten pri *Verticillium albo-atrum*, popolnoma neprimeren, saj se je pri izolatih iz zemlje pokazala njegova nizka specifičnost. Pri prvi in tretji metodi je prišlo do nastanka produktov (šibki

signal) pravilnih dolžin pri vseh vzorcih, tako kužnih kot nekužnih, razen pri neredčenih in tistih, ki so bili redčeni 1:10. Verjetno tu ni prišlo do nastanka produkta zaradi previsoke koncentracije inhibitornih snovi v vzorcih.

Vso zemljo smo testirali z mikrobiološkimi analizami, zato lahko z gotovostjo trdimo, da v zemlji iz gozda in travnika res ni prisotnih gliv rodu *Verticillium*. Prav tako smo pri PCR uporabili stroge pogoje (temperatura prileganja začetnikov 60 °C).

Verjetno je prišlo do namnožitve DNA drugih organizmov, živečih v zemlji, kar dokazuje, da ta par začetnikov ni visoko specifičen in je zato neprimeren za PCR DNA, izolirane iz zemlje.

Naslednji par preizkušenih začetnikov je bil par 9-1Efor/9-1Erev, ki namnoži PG2 obliko *Verticillium albo-atrum*. Pri preizkušenih metodah se je izkazal za neprimernega, saj nikjer ni prišlo do nastanka produktov, vseeno pa bi ga lahko uporabili pri nadaljnjih raziskavah, saj je visoko specifičen, prav tako pa se da z njim razlikovati patotipe *V. albo-atrum*.

Zadnji par preizkušenih začetnikov je bil par VR-NL1/VR-NL2, ki namnoži vse seve *Verticillium albo-atrum*, razen tistih, ki okužujejo lucerno. Par se je izkazal za popolnoma neprimernega za preverjanje izolatov iz zemlje s PCR, saj smo poleg zelo jasnih signalov pri kužni zemlji dobili nekaj produktov tudi pri nekužni zemlji.

V sklopu naloge smo uporabili tudi nested PCR z uporabo začetnikov 9-1Efor/9-1Erev v kombinaciji z 9-1Ifor/9-1Irev ter ITS1/ITS4 v kombinaciji z VAITS1/VAITS2. Do rezultatov nismo prišli, saj je vedno prišlo do nastanka produkta tudi pri negativni kontroli (voda). Zamenjali smo plastiko, vodo, kemikalije in tudi lokacijo izvajanja PCR. Na koncu se je izkazalo, da so bili začetniki kontaminirani. Kasneje nested PCR nismo več izvajali, saj smo se osredotočili na enojni PCR, ki je tudi dosti krajša metoda od nested.

5.2 SKLEPI

Obe uspešni metodi izolacije DNA iz zemlje, prva in tretja, sta se pokazali za zelo učinkoviti, saj smo pri uporabi splošnih glivnih začetnikov dobili PCR produkte pri vseh vzorcih. Čeprav z uporabo specifičnih začetnikov nismo uspeli dokazati *Verticillium albo-atrum* v tleh, mislimo, da obstaja pri obeh metodah velik potencial, še posebej ker smo obe metodi priredili zaradi neustrezne opreme. V naslednjih raziskavah bi bilo potrebno pridobiti bead beater za večje vzorce in narediti ekstrakciji direktno po protokolu. Tako kot Garcia-Pedrajas et. al., 1999, so tudi Volossiouk in sod., 1995, Heinz in Platt, 2000, ter Perez-Artes in sod., 2004, uporabljali posneto mleko v prahu kot dodatek pri ekstrakciji, saj naj bi imel velik učinek pri vezavi inhibitornih snovi (huminske kisline) nase. Menimo, da bi bilo potrebno preizkusiti tudi to, sploh če se bo izvajala izolacija pri večjih vzorcih in

z večjo mehansko silo, saj bi tako poleg večje izolacije DNA izolirali tudi več huminskih kislin, kar pa ni naš cilj.

Za nadaljnje poizkuse na izolatih zemlje za detekcijo *Verticillium albo-atrum* bi lahko od preizkušenih uporabili le para VITS1/VITS2 ter 9-1Efor/9-1Erev, saj so se ostali izkazali za nespecifične. Izvedli bi lahko tudi nested PCR z začetnikoma 9-1Efor/9-1Erev v kombinaciji z 9-1Ifor/9-1Irev. Ta kombinacija se je izkazala za zelo učinkovito za detekcijo glive v rastlinah (Radišek in sod., 2004).

Nested PCR bi lahko naredili tudi s kombinacijo para splošnih glivnih začetnikov ITS1/ITS4 in VAITS1/VAITS2, čeprav tu obstaja možnost nastanka nespecifičnih produktov zaradi uporabe slednjega para.

6 POVZETEK IN SUMMARY

6.1 POVZETEK

V rod *Verticillium* spadajo talne glive, ki so rastlinski patogeni in povzročajo verticilijsko uvelost v zmernih in subtropskih zemeljskih regijah. Skupno lahko te glive okužijo več kot 300 vrst gostiteljskih rastlin iz 43 družin, med katerimi je tudi veliko ekonomsko pomembnih rastlin, kot so krompir, oljke, bombaž in hmelj. V Sloveniji tako eno od večjih tveganj hmeljarske pridelave predstavlja karantenska bolezen verticilijska uvelost hmelja, ki jo povzročata talni glivi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn, pri čemer *V. albo-atrum* povzroča večji del okužb, zato smo se v diplomski nalogi osredotočili predvsem na to vrsto.

Glivi v rastlino prodreta preko korenin, okužba pa se nato širi v prevajalno tkivo, kjer z izločanjem hidrolitičnih encimov, toksičnih glikopeptidov in prisotnostjo micelija motita preskrbo celic z vodo in povzročata odmiranje tkiva. V odmrlem tkivu glivi tvorita trajne organe, ki se s propadom rastline ali njenih delov sprostijo v tla in so del naslednjih infekcijskih ciklov.

Pomembna lastnost teh gliv je tako tvorba trajnih organov, kot so temen trajni micelij pri *V. albo-atrum* in mikrosklerocij pri *V. dahliae*. S trajnimi organi lahko glive preživijo v zemlji brez gostiteljske rastline tudi do 15 let in ravno zato predstavljajo tako veliko težavo, saj je ob infekciji potrebno opraviti 4 letno karantensko premeno, kar pomeni, da za ta čas na okuženem hmeljišču ni dovoljen ponoven nasad hmelja, ampak je potrebno posejati negostiteljske rastline. Težava je toliko večja, ker za enkrat še ne poznamo učinkovitega fitofarmacevtskega sredstva, ki bi preprečil okužbo ali pozdravil že okuženo rastlino.

Bolezensko stanje je odvisno od virulence povzročitelja, odpornosti kultivarja in abiotiskih dejavnikov. Na hmelju se pojavljata dve obliki bolezenskih znamenj in sicer blaga in letalna oblika, pri čemer letalna oblika povzroči odmiranje rastlin, pri blagi obliki pa si rastline opomorejo in naslednje leto normalno odženejo.

Bolezenska znamenja, ki jih lahko srečamo pri obeh oblikah bolezni, so rumenenje in venenje listov. Na prizadetih listih se pojavi nekrotično tkivo, predvsem na robovih med listnimi žilami. Pri hmeljevi uvelosti je značilno, da se robovi prizadetih listov obrnejo navzgor in ob rahlem dotiku odpadejo. Pomembno znamenje je tudi rjavo nekrotično prevajalno tkivo, ki ga lahko vidimo ob prerezu trte na spodnjem delu rastline.

Ključen pomen pri preprečevanju hitrega širjenja verticilijske uvelosti ima hitra ter zanesljiva diagnostika. Vpeljava molekularnih metod in PCR tehnologija predstavlja velik napredek v diagnostiki gliv. Razvite so bile metode tako za kvalifikacijo kot za kvantifikacijo gliv z metodo PCR. Še vedno pa obstaja pri PCR pomnoževanju DNA vzorcev, izoliranih iz rastlinskih tkiv in tal ogromno omejitev. Glavni problem so izolirane inhibitorne snovi, kot so na primer huminske kisline, ki močno inhibirajo potek PCR. Drugo vprašanje pri izolaciji je uporaba najprimernejšega in najučinkovitejšega mehanskega tretiranja zemlje in posledično mehansko zelo odpornih trajnih organov.. Znanstveniki tako uporabljajo tekoči dušik, mletje s pestilom, uporabo stresalnika s kroglicami in sonifikacijo. V nalogi smo skušali poiskati najprimernejšo metodo izolacije, prav tako pa smo preverjali specifičnost različnih specifičnih začetnih oligonuklotidov.

V sklopu prvega dela naloge smo najprej namnožili različne izolate *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus*. Sledila je izolacija DNA iz micelija gliv in merjenje koncentracije DNA s fluorometrom. V strokovnih člankih smo poiskali najpogosteje uporabljene začetnike v diagnostiki gliv rodu *Verticillium* in preverili njihovo delovanje, specifičnost in nivo detekcije. Izkazalo se je, da 5 od 14 začetnikov ne deluje na naših vzorcih, kar kaže na njihovo visoko specifičnost (gostitelj in geografsko področje).

V drugem delu naloge smo pridobili vzorce zemlje iz lokacij, kjer je bila najdena in potrjena verticilijska uvelost. Vzeli smo 22 pozitivnih vzorcev zemlje. Kot negativne vzorce smo vzeli vzorec zemlje iz gozda, iz travnika in dveh njiv pred IHPS. Sledilo je mikrobiološko testiranje zemlje, da smo ugotovili, v katerih vzorcih je infekcijski potencial najvišji. Prav tako smo potrdili odsotnost glice na negativnih vzorcih.

4 najbolj kužne vzorce smo vzeli za nadaljnjo testiranje. Iz znanstvenih člankov smo povzeli različne protokole za izolacijo DNA iz zemlje, da bi našli najbolj primerno metodo. Prav tako smo uporabili komercialni kit za izolacijo.

Prva metoda je temeljila na uporabi stresalnika, kamor se vpnejo epruvete z zemljo in kroglicami. Stresalnik ustvarja velike mehanske sile in tako povzroča razpad celic in trajnih organov. Druga metoda je temeljila na uporabi pestila in možnarja ter dodatka raztopine posnetega mleka v prahu, ki veže nase huminske snovi iz zemlje. Tretja metoda je bila uporaba komercialnega kita MoBio, ki prav tako temelji na uporabi stresalnika in kroglic. Prva in tretja metoda sta bili zaradi nezadostne opreme rahlo spremenjeni. Uspešnost metode smo preverili z direktnim nanosom vzorcev na gel, pri čemer se je izkazalo, da je tretja metoda zelo učinkovita, saj je bila celokupna DNA vidna pri vseh vzorcih, prva metoda je bila malo manj učinkovita, saj DNA ni bila vidna pri vseh vzorcih, poleg tega je bila jakost nižja kot pri tretji metodi. Druga metoda se je izkazala za popolnoma neprimerno, saj nikjer ni bilo vidne DNA.

Sledilo je preverjanje uspešnosti izolacij DNA iz zemlje z dvema parom splošnih glivnih začetnikov (ITS1/ITS4 in 18sRNA-forward/18sRNA-reverse). Z obema paroma smo uspeli namnožiti vse vzorce DNA izolirane s prvo in tretjo metodo, pri drugi metodi pa do nastanka produktov ni prišlo.

Naslednja stopnja preverjanja uspešnosti izolacij je bila uporaba za specifičnih začetnikov. Uporabili smo začetnik, specifičen za glive rodu *Verticillium* in začetnike, specifične za *Verticillium albo-atrum*, ki so se v prejšnjih preizkusih izkazali za najbolj primerne (jakost signala in nivo detekcije). Tako smo uporabili začetnike VITS1/VITS2, VR-NL1/VR-NL2, VAITS1/VAITS2 in 9-1Efor/9-1Erev. Prav tako smo preizkusili polimerazo dveh različnih proizvajalcev (Promega in Novagen). Izkazalo se je, da sta para VAITA1/VAITS2 ter VR-NL1/VR-NL2 popolnoma neprimerena za namnoževanje DNA gliv rodu *Verticillium* iz zemlje, saj je prišlo do nastanka produktov tudi pri nekužnih vzorcih, kar kaže na nizko specifičnost teh dveh parov. Pri parih VITS1/VITS2 ter 9-1Efor/9-1Erev nikjer ni prišlo do nastanka produktov. Vseeno sta oba para primerena za nadaljne analize in PCR na izolatih iz zemlje, saj so signali produktov pri namnoževanju DNA micelija iz glive močni, nivo detekcije je visok, para pa sta tudi visoko specifična, saj nikjer ni prišlo do nastanka nespecifičnih produktov, tudi pri vzorcih iz zemlje ne. Razlog za neuspeh pomnoževanja je verjetno izolacija, s katero nismo uspešno razbili trajnih organov in izolirali iskane DNA.

Obe uspešni metodi izolacije DNA iz zemlje, prva in tretja, sta se pokazali za zelo učinkoviti, saj smo pri uporabi splošnih glivnih začetnikov dobili PCR produkte pri vseh vzorcih. Čeprav z uporabo specifičnih začetnikov nismo uspeli dokazati *Verticillium albo-atrum* v tleh, mislim, da obstaja pri obeh metodah velik potencial, še posebej ker smo obe metodi priredili zaradi neustrezne opreme. V naslednjih raziskavah bi bilo potrebno pridobiti stresalnik za večje vzorce in narediti ekstrakciji direktno po protokolu. Za nadaljnje poizkuse na izolatih zemlje za detekcijo *Verticillium albo-atrum* bi lahko od preizkušenih uporabili le para VITS1/VITS2 ter 9-1Efor/9-1Erev, saj so se ostali izkazali za nespecifične. Izvedli bi lahko tudi nested PCR z začetnikoma 9-1Efor/9-1Erev v kombinaciji z 9-1Ifor/9-1Irev, ter s kombinacijo para začetnikov ITS1/ITS4 in VAITS1/VAITS2, čeprav tu obstaja možnost nastanka nespecifičnih produktov zaradi uporabe slednjega para.

6.2 SUMMARY

The genus *Verticillium* are soil fungi, that are plant pathogens and are responsible for the emergence of verticillium disease in temperate and subtropical regions of the earth. In total, these fungi can infect more than 300 species of host plants from 43 families, including many economically important crops, such as potatoes, olives, cotton and hops.

Verticillium wilt of hops, a quarantine disease caused by soil fungi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold and *Verticillium dahliae* Klebahn, represents one of the major risks of hop production in Slovenia. We are focused on *V. albo-atrum* in the graduation thesis, because this particular fungus covers a greater area of infections.

These two fungi penetrate the plant through the roots and the infection then spreads to the conducting system. With the secretion of hydrolytic enzymes, toxic glycopeptides and with the presence of mycelium they prevent water supply to the cells and cause tissue death. The fungi form resting organs in the dead tissue. These organs are released into the soil with the collapse of the plant or its parts and are a part of the next cycle of infections.

An important feature of these fungi is therefore the formation of resting organs, such as dark resting mycelium in *V. albo-atrum* and microsclerotia in *V. dahliae*. With resting organs these fungi can survive in soil without a host plant up to 15 years and this is the reason they present a great problem. With the emergence of infection it is necessary to start a 4 year long quarantine resting. In the time of quarantine it is not allowed to re-hop the infected field and non-host plants should be planted instead. The problem is even greater since the effective protection product against the infection or a cure for infected plants is not yet known.

The condition of the disease depends on the virulence of the agent, cultivar resistance and abiotic factors. Two forms of disease symptoms appear on hops; the mild and the lethal hop wilt form, where the lethal form causes the death of the plants and the mild form lets the plant to recover and spring in the following year.

The disease symptoms which occur on both forms are yellowing and wilted leaves. Necrotic tissue appears on the affected leaves, especially along the edges between the leaf veins. In hop wilt the edges of the affected leaves turn up and a slight touch causes them to fall away. An important symptom is also the brown necrotic tissue, which can be seen when we cut the hop at the bottom.

Quick and reliable diagnosis is of crucial importance in preventing the rapid spread of verticillium wilt. The introduction of molecular methods and PCR technology represent a significant progress in the diagnosis of fungi. Methods to qualify and to quantify fungi have been developed with PCR technology. However, there are still many restrictions in PCR amplification of DNA samples isolated from plant tissue and soil. The isolated inhibitory substances, such as humic acid, present the main problem and they strongly inhibit the course of PCR. Another issue about isolation appears in the use of the most appropriate and effective mechanical treatment of soil and consequently mechanically very resistant organs. Scientists therefore use the pestle grind, liquid nitrogen, bead beater and

sonication. We strived to find the most appropriate isolation method in this work and we also examined the specificity of different primers that are typical for *Verticillium* spp.

In the first part of the diploma work we amplified the different isolates of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. The amplification was then followed by the isolation of DNA from fungal mycelia and measuring the concentration of DNA with fluorometer. In academic journals we searched for the most commonly used primers in the fungal diagnostics of genus *Verticillium* and checked their performance, specificity and level of detection. It has been shown that 5 out of 14 primers have no effect on our samples, suggesting their high specificity (the host and geographic area).

In the second part, the samples of soil were collected from locations where verticillium wilt were found and confirmed. We collected 22 infected samples. Negative samples were taken from forest soil, the meadow and from two fields in front of Slovenian Institute for Hop Research and Brewing. Microbiological testing of soil followed to find the samples with the highest infectious potential. The absence of *Verticillium* spp. in the negative samples was also confirmed.

4 of the most contaminated samples were taken for further testing. To find the most appropriate procedure, different methods of isolating DNA from the soil were taken from scientific journals. The commercial kit was also used for isolation.

The first method was based on the use of the bead beater, where test tubes with soil and beads were placed. The bead beater creates a large mechanical force and therefore causes the ruin of cells and resistant organs. The second method was based on the use of pestle and mortar with the addition of skimmed milk powder, which binds humic substances from the soil. The third method included the use of a commercial kit MoBio and was also based on the use of the bead beater and beads. The first and the third method were slightly modified due to insufficient equipment. The effectiveness of the method was tested with the direct loading of samples on the gel and the third method was shown to be very efficient, because the entire DNA was visible in all samples. The first method was slightly less efficient, because DNA was not visible in all samples and also the strength was lower from the strength in the third method. The second method was proven to be unsuccessful, because there was no DNA visible.

The testing was followed by checking the effectiveness of DNA isolations from soil with two pairs of general fungal primers, ITS1/ITS4 and 18sRNA-forward/18sRNA-reverse. With both pairs we were able to amplify all the DNA samples which were isolated in the first and the third method. However, the formation of products did not occur in the second method.

In the next stage, the effectiveness of isolations was checked with the use of specific primers. We used a primer that is specific for fungi of the genus *Verticillium* and primers specific for *Verticillium albo-atrum*, which were shown to be the most appropriate in the previous tests (the signal strength and the level of detection). Thus, we used the following primers; VITS1/VITS2, VR-NL1/NL2-VR, VAITS1/VAITS2, and 9-1Efor/9-1Erev. We also tested polymerase from two different manufacturers (Promega and Novagen). Two pairs were shown to be completely inadequate for DNA amplification of from the soil due to the formation of products also in uninfected samples, indicating a low specificity of these two pairs; VAITA1/VAITS2, and VR-NL1/VR-NL2. Pairs VITS1/VITS2 and 9-1Efor/9-1Erev did not result in the formation of products. However, both pairs are suitable for further analysis and PCR on the isolates from soil, since the signals of products in amplification of DNA from fungal mycelium are strong, the level of detection is high, and pairs are also highly specific as there was no emergence of non-specific products, not even in soil samples. The reason for ineffective amplification is probably in the isolation with which we did not successfully break the resistant organs and isolated the DNA.

The first and the third method of DNA isolation from the soil were shown to be very effective, because we got PCR products from all samples with the use of general fungal primers. Although we did not prove the presence of *Verticillium albo-atrum* in soil with the use of specific primers, we believe that the methods are of great potential, especially because they were adapted due to inadequate equipment. In the following studies it would be necessary to use a bead beater for larger samples and to execute the extraction as suggested by protocol. For further experiments on soil isolates for the detection of *Verticillium albo-atrum* only pairs VITS1/VITS2, and 9-1Efor/9-1Erev could be used, as the others proved to be non-specific. We could also perform nested PCR with primers 9-1Efor/9-1Erev in combination with 9-1Ifor/9-1Irev, and nested PCR with a combination of primers ITS1/ITS4 and VAITS1/VAITS2, although there is a possibility in formation of non-specific products due to the use of the latter pair.

7 VIRI

- Barbara D. J., Clewes E. 2003. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology*, 4: 297-305
- Beckman C. H., Zaroogian G. E. 1967. Origin and composition of vascular gel infected banana roots. *Phytopathology*, 57: 11-13
- Berlanger, I., Powelson M.L. 2000. *Verticillium* wilt. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-PHI-I-2000-0801-01
- Carder J. H., Hignett R. C., Swinburne T. R. 1987. Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 31: 441-452
- Carder J. H., Morton A., Tabrett A. M., Barbara D. J. 1994. Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. V: Modern assays for plant pathogenic fungi, identification, detection and quantification. Schots, A., Dewey, F. M., Oliver, R. P. (eds.). Oxford, Wallingford, CAB International: 91-97
- Christen A. A. 1982. A selective medium for isolating *Verticillium albo-atrum* from soil. *Phytopathology*, 72: 47-49
- Dolinar M. 1975. Uvelost hmelja (*Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae*). Poročilo za leto 1975. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 12 str.
- Fradin E. F., Thomma B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspect of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-Fatrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7,2: 71-86
- Gams W. 1988. A contribution to the knowledge of nemopathophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94: 123-148
- Gams W., Van Zaayen A. 1982. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species I. Taxonomy. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88: 57-58
- Garcia-Pedrajas M. D., Bainbridge B. W., Heale J. B., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R. M. 1999. A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 251-259

- Heinz R. A., Platt H. W. 2000. Improved DNA extraction method for *Verticillium* detection and quantification in large-scale studies using PCR-based techniques. *Plant Pathology*, 22: 117-121
- Hu X., Nazar R. N., Robb J. 1993. Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42: 23-36
- Jimenez-Diaz R. M., Millar R. L. 1998. Sporulation on infected tissues, and presence of airborne *Verticillium albo-atrum* in alfalfa fields in New York. *Plant Pathology*. 37: 64-70
- Kayser T. 1992. Protoplastenfusion, sowie electrophoretische Chromosomentrennung und Genkartierung bei filamentösen Pilzen: *Penicillium janthinellum*, *Absidia glauca* und *Cochliobolus heterotrophus*. Dissertation thesis. Berlin, Humboldt University of Berlin: 92 str.
- Li K. N., Rous, D. I., Eyestone E. J., German T. L. 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. *Mycological Research*, 103: 1361-1368
- Lee S. B., Taylor J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. V: *PCR Protocols. A Guide to Method and Application*. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky D. H., White J. J., Eds T. J. (eds.). San Diego, Academic Press: 282-287
- Mercado-Blanco J., Rodríguez-Jurado D., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R. M. 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 1-13
- Mol L., Scholte K., Vos J. 1995. Effect of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology*, 44: 1070-1074
- Morton A., Tabrett A. M., Carder J. H., Barbara D. J. 1995. Sub-repeat sequences in the ribosomal RNA intergenic regions of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Mycological Research*, 99: 257-266
- Moukhamedov R., Hu X., Nazar R. N., Robb J. 1994. Use of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal Intergenic Sequences for the Diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology*, 84: 256-259
- Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D., Robb J. 1991. Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and molecular Plant Pathology*, 39: 1-11

- Pegg G. F. 1989. Pathogenesis in vascular diseases in agriculture. *Phytopathologia Mediterranea*, 23: 33-40
- Pegg G. F., Brady B. L. 2002. *Verticillium* Wilts. Wallingford, CABI Publishing: 552 str.
- Perez-Artes E., Garcia-Pedrajas M. D., Bejarano-Alcazar J., Jimenez-Diaz R. M. 2000. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 507-517
- Perez-Artes E., Mercado-Blanco J., Ruz-Carrillo A. R., Rodriguez-Jurado D., Jimenez-Diaz R. M. 2004. Detection of defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in artificial and natural soils by nested PCR. *Plant and Soil*, 268: 349-356
- Radišek S. 2004a. Molekularna variabilnost pri glivah (*Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn) in razvoj patotipsko specifičnih markerjev. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 107 str.
- Radišek S. 2004b. Sistematični nadzor nad pojavom hmeljeve uvelosti (*Verticillium albo-atrum* in *V. dahliae*) v letu 2003. Nacionalno poročilo (Posebni nadzor škodljivih organizmov) za leto 2003. Ljubljana. Uprava za varstvo rastlin in semenarstvo RS, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije.
- 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., Jakše J., Javornik B. 2004. Development of pathotype specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease*, 88: 1115-1122.
- Robb J., Moukhamedov R., Hu X., Platt H., Nazar R. N. 1993. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43: 423-436
- Seifert K. A., Gams W. 2001. The taxonomy of anamorphic fungi. V: The Mycota VII. Systematic and Evolution Part A. McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G., Lemke, P. A. (eds.). Berlin, Springer-Verlag, Heidelberg, New York: 307-347
- Smith H. C. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8: 450-478

Volossiouk T., Robb E. J., Nazar R. N. 1995. Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 11: 3972-3976

White T. J., Bruns T., Lee S., Tayler J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for polygenetics. V: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.). Academic Press, San Diego, CA: 315-322

Zare R., Gams W., Starink-Willemse M., Summerbell R. C. 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85: 463-89.

Zare R., Gams W. 2008. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research*, 112: 811-24

ZAHVALA

Iskrena hvala dr. Sebastjanu Radišku za vodenje skozi raziskovalni del naloge, za vse nasvete in posredovano znanje, za kritiko in podporo ter za nasvete pri pisanju diplomskega dela.

Hvala mentorju doc. dr. Jerneju Jakšetu za vse nasvete in pomoč.

Zahvaljujem se Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije za možnost opravljanja raziskovalnega dela diplomske naloge. Hvala dekletom iz Oddelka za varstvo rastlin za vso pomoč pri praktičnem delu.

Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Celarju za recenzijo diplome in koristne nasvete.

Hvala Gregu za vso vzpodbudo in motivacijo.

Najlepše pa se zahvaljujem svoji mami in očetu za možnost študija in vso podporo ter ljubezen, ki sta mi jo dala tekom šolanja.

Hvala