

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mateja MERVič

**POPULACIJSKA SESTAVA KVASOVK RODU
Ogataea IZOLIRANIH IZ OLJK SLOVENSKE ISTRE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mateja MERVič

**POPULACIJSKA SESTAVA KVASOVK RODU *Ogataea* IZOLIRANIH
IZ OLJK SLOVENSKE ISTRE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**POPULATION STRUCTURE OF YEAST GENUS *Ogataea* ISOLATED
FROM OLIVES IN SLOVENIAN ISTRIA**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Nežo Čadež in za recenzentko doc. dr. Polono Zalar.

Mentorica: doc. dr. Neža Čadež

Recenzentka: doc. dr. Polona Zalar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nina GUNDE - CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Neža ČADEŽ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mateja Mervič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 597.6/.8:582.282.23:634.63(497.472):575.17(043)=163.6
KG kvasovke/metilotrofne kvasovke/*Ogataea kolombanensis/Ogataea histriana*/
Ogataea deakii/oljka/Slovenska Istra/oljčno olje/genotipizacija/molekularno
kloniranje/alelni tip EF-1 α /elektroforetska kariotipizacija/PFGE/mikrosateliti
AV MERVič, Mateja, dipl. mikrobiol. (UN)
SA Čadež, Neža (mentorica)/ ZALAR, Polona (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2016
IN POPULACIJSKA SESTAVA KVASOVK RODU *Ogataea* IZOLIRANIH IZ
OLJK SLOVENSKE ISTRE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XII, 61 str., 9 pregl., 17 sl., 4 pril., 117 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI *Ogataea deakii*, *Ogataea histriana* in *Ogataea kolombanensis* so metilotrofne
kvasovke, ki so jih izolirali iz sedimenta oljčnega olja in razkrajajočega se
bukovega lesa. Z magistrsko nalogo smo žeeli iz oljčnega olja pridobiti nove seve
kvasovk rodu *Ogataea*, ki so specifične za oljke v Slovenski Istri, in jih poleg že
obstoječih sevov v zbirki ZIM uporabiti pri nadaljnji tipizaciji z molekularnim
kloniranjem, analizo mikrosatelitov in elektroforetsko kariotipizacijo. Iz oljčnega
olja smo izolirali heterogeno populacijo kvasovk, ki ni vsebovala kvasovk rodu
Ogataea. V nadaljevanju smo z molekularnim kloniranjem gena za elongacijski
faktor 1-alfa (EF-1 α) na nivoju DNA in mRNA tipizirali 18 sevov vrst *Ogataea*
izoliranih iz različnih geografskih lokacij. Pri 13 sevih vrste *O. histriana* smo v
genomu odkrili 72 alelnih tipov EF-1 α , pri štirih sevih vrste *O. kolombanensis* 17
alelnih tipov in pri sevu *O. deakii* osem alelnih tipov. Znotraj vrste *O. histriana* in
O. kolombanensis sta močno prevladovala dva alelna tipa. Tudi v mRNA smo
opazili prevlado dveh alelnih tipov znotraj vrste *O. histriana* in *O. kolombanensis*,
poleg tega pa smo odkrili tudi nove alelne tipe oz. kopije variant gena za EF-1 α .
Različnost filogenetskega označevalca EF-1 α je pogojena s heterozigotno naravo
kvasovk, ki smo jo potrdili z genotipizacijo štirih mikrosatelitnih lokusov. Prav
tako smo genetsko variabilnost med sevi istih vrst opazili pri elektroforetski
kariotipizaciji. Vse tri vrste se med seboj jasno razlikujejo po številu in velikosti
kromosomov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 597.6/.8:582.282.23:634.63(497.472):575.17(043)=163.6
CX yeasts/methylotrophic yeasts/*Ogataea kolombanensis/Ogataea histriana/Ogataea deakii*/olive/Slovenian Istria/olive oil/genotyping/molecular cloning/allele type EF-1 α /electrophoretic karyotyping/PFGE/microsatellites
AU MERVič, Mateja
AA ČADEŽ, Neža (supervisor)/ ZALAR, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TY POPULATION STRUCTURE OF YEAST GENUS *Ogataea* ISOLATED FROM OLIVES IN SLOVENIAN ISTRIA
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 61 p., 9 tab., 17 fig., 4 ann., 117 ref.
LA sl
Al sl/en
AB *Ogataea deakii*, *Ogataea histriana* and *Ogataea kolombanensis* are methylotrophic yeasts that were isolated from olive oil sediments and rotten beech wood. In our study, we wanted to obtain new strains of *Ogataea* species from olive oil, as they are specific for olive trees in the Slovenian Istria region, and use them, along with the existing strains in the ZIM collection, for further typing with molecular cloning, microsatellite analysis and electrophoretic karyotyping. From olive oil, we isolated a heterogeneous population of yeasts that did not contain any *Ogataea* species. Furthermore, 18 strains of *Ogataea* previously isolated from diverse geographical locations were genotyped with molecular cloning of the gene for elongation factor 1-alpha (EF-1 α) at the DNA and mRNA level. We discovered 72 allele types of EF-1 α in 13 strains of the *O. histriana*, 17 allele types in 4 strains of the *O. kolombanensis* and 8 allele types in strain of species *O. deakii*. Within species *O. histriana* and *O. kolombanensis* two allele types strongly predominated. We also observed the predominance of two allele types within the same two species at the mRNA level and discovered additional allele types or copies of the gene for EF-1 α variant. The diversity of phylogenetic marker EF-1 α is conditional on the heterozygous nature of yeasts, which we confirmed by genotyping four microsatellite loci. The genetic variability among strains was also observed by electrophoretic karyotyping. The three species were clearly distinguished by the number and size of the chromosomes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OLJKE	3
2.1.1 Sestava oljk.....	3
2.1.2 Površina sadeža oljk	4
2.1.3 Sestava združb epifitov	4
2.2 OLJČNO OLJE.....	5
2.2.1 Sestava združbe in njihova vloga	5
2.3 ROD <i>Ogataea</i>	6
2.3.1 <i>Ogataea kolombanensis</i> , <i>Ogataea histriana</i> in <i>Ogataea deakii</i>	7
2.3.2 <i>Ogataea polymorpha</i> in <i>Ogataea parapolymorpha</i>	7
2.3.2.1 Transkriptom	8
2.4 RAST NA METANOLU	8
2.5 TRANSKRIPCIJSKI ELONGACIJSKI FAKTOR 1 α (EF-1 α)	9
2.6 GENOTIPIZACIJA	11
2.6.1 Identifikacija vrst na podlagi restriktijske analize ITS.....	11
2.6.2 Molekularno kloniranje	11
2.6.3 Mikrosateliti	12
2.6.4 Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju	13
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 SHEMA DELA	14
3.2 MATERIALI	15
3.2.1 Laboratorijski material in oprema	15
3.2.2 Mikroorganizmi	16
3.2.3 Mikrobiološka gojišča	16
3.2.4 Pufri in raztopine.....	17
3.2.5 Reagenti	18
3.2.6 Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje	19

3.2.7 Encimi in komercialni kompleti	19
3.3 METODE DELA	20
3.3.1 Izolacija in identifikacija kvasovk iz sedimenta oljčnega olja.....	20
3.3.1.1 Izolacija kvasovk	20
3.3.1.2 Izolacija genomske DNA.....	20
3.3.1.3 Pomnoževanje DNA	20
3.3.1.4 Gelska elektroforeza	21
3.3.1.5 Čiščenje pomnožkov PCR skozi kolone.....	21
3.3.1.6 Restrikcija regije ITS	22
3.3.1.7 Obdelava elektroforetskih slik in nukleotidnih zaporedij.....	22
3.3.2 Molekularno kloniranje gena za EF-1α.....	22
3.3.2.1 Oživitev kultur in izolacija genomske DNA	22
3.3.2.2 Pomnoževanje gena za EF-1 α	22
3.3.2.3 Gelska elektroforeza in čiščenje pomnožkov PCR.....	23
3.3.2.4 Poliadenilacija pomnožkov PCR	23
3.3.2.5 Ligacija	23
3.3.2.6 Transformacija in selekcija.....	23
3.3.2.7 Izolacija DNA klonov.....	24
3.3.2.8 Pomnoževanje DNA in gelska elektroforeza.....	24
3.3.2.9 Encimsko čiščenje pomnožkov PCR	24
3.3.2.10 Obdelava podatkov	24
3.3.3 Molekularno kloniranje cDNA gena za EF-1α	25
3.3.3.1 Izolacija mRNA	25
3.3.3.2 Reverzna transkripcija	25
3.3.4 PFGE analiza kromosomske DNA	26
3.3.4.1 Izolacija kromosomske DNA	26
3.3.4.2 PFGE	27
3.3.4.3 Obdelava podatkov kromosomske DNA	27
3.3.5 Analiza mikrosatelitnih lokusov.....	27
3.3.5.1 Pomnoževanje DNA in gelska elektroforeza.....	27
3.3.5.2 Obdelava podatkov mikrosatelitov	28
4 REZULTATI.....	29
4.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA KVASOVK IZ OLJČNEGA OLJA	29
4.2 MOLEKULARNO KLONIRANJE	31
4.2.1 Določitev števila variant genov za EF-1α sevov rodu <i>Ogataea</i>	31
4.2.2 Določitev števila kopij variant mRNA gena za EF-1α.....	37
4.3 ANALIZA KROMOSOMSKE DNA	40
4.4 ANALIZA MIKROSATELITOV	41
5 RAZPRAVA.....	45
5.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA KVASOVK	45

5.2 DOLOČITEV ŠTEVILA VARIANT GENA ZA EF-1A	46
5.3 VARIABILNOST KROMOSOMSKE DNA	48
5.4 VARIABILNOST MIKROSATELITOV	49
6 SKLEPI	51
7 POVZETEK	52
8 VIRI	53

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih izolatov s podatki o izvoru.....	16
Preglednica 2: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov	19
Preglednica 3: Sestava mešanice za ligacijo.....	23
Preglednica 4: Sestava mešanice za sintezo cDNA.....	26
Preglednica 5: Prikaz števila analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α , oblik podenote EF-1 α in števila variabilnih nukleotidov/aminokislin za posamezni sev vrste <i>O. histriana</i>	32
Preglednica 6: Prikaz števila analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α , oblik podenote EF-1 α in števila variabilnih nukleotidov/aminokislin za posamezni sev vrste <i>O. kolombanensis</i>	33
Preglednica 7: Prikaz števila analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α in števila variabilnih nukleotidov/aminokislin za posamezni posamezni tipski sev vrste <i>O. kolombanensis</i> , <i>O. deakii</i> in <i>O. histriana</i>	37
Preglednica 8: Prikaz števila ponovitev najintenzivnejšega vrha mikrosatelitnega zaporedja za vsak posamezni sev	43
Preglednica 9: Prikaz števila ponovitev zaporedja 4 mikrosatelitov za vsak tipski sev in njihova intenziteta vrha na elektroforegramu	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Demetilacija pektina s pektin metilesterazo je vir metanola v celični steni rastlin (Fall in Benson, 1996: 298)	4
Slika 2: Shema poteka eksperimentalnega dela.....	14
Slika 3: Gojišče YPD z nacepljenim sedimentom oljčnega olja pridobljenega v letu 2014, redčitev 10^{-3}	29
Slika 4: Gojišče YPD z nacepljenim sedimentom oljčnega olja pridobljenega v letu 2013, redčitev 10^{-1}	29
Slika 5: Dendrogram sorodnosti sevov izrisan glede na restrikcijski profil rezanja z <i>CfoI</i> , <i>HaeIII</i> in <i>HinfI</i> s prikazom pripadajočih oznak izolatov in identificirane vrste.	30
Slika 6: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α , ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α znotraj vrste <i>O. histrianaica</i>	32
Slika 7: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi aminokislinskega zaporedja EF-1 α , ki prikazuje variante podenot proteina EF-1 α znotraj vrste <i>O. histrianaica</i>	33
Slika 8: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) znotraj vrste <i>O. kolombanensis</i>	34
Slika 9: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) znotraj vrste <i>O. deakii</i>	34
Slika 10: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) tipskega seva ZIM 2463 vrste <i>O. histrianaica</i>	35
Slika 11: Krožni diagram porazdelitve posameznih alelnih tipov vrste <i>O. histrianaica</i> glede na lokacijo izvora (Sicilija, Kolomban in Barižoni).....	36
Slika 12: Krožni diagram porazdelitve posameznih alelnih tipov vrste <i>O. kolombanensis</i> (levo) in <i>O. deakii</i> (desno) glede na lokacijo izvora Kolomban in Bertoki (levo) ali Pilis gore na Madžarskem (desno).....	37

Slika 13: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi variant nukleotidnega zaporedja mRNA gena za EF-1 α vrste <i>O. kolombanensis</i> ZIM 2322, <i>O. histriatica</i> ZIM 2463 in <i>O. deakii</i> ZIM 2481	38
Slika 14: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi variant aminokislinskega zaporedja mRNA gena za EF-1 α vrste <i>O. kolombanensis</i> ZIM 2322, <i>O. histriatica</i> ZIM 2463 in <i>O. deakii</i> ZIM 2481	39
Slika 15: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α v DNA/mRNA (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α v DNA/mRNA (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) v sevu ZIM 2463 (<i>O. histriatica</i>).....	40
Slika 16: Dendrogram sorodnosti vseh sevov kvasovk rodu <i>Ogataea</i> izrisan glede na tipizacijo z metodo PFGE s prikazom pripadajoče vrste, leta in lokacije izvora.	41
Slika 17: Elektroforetski profili pomnožkov PCR mikrosatelita (AG) ₆ dolžine od 150 do 450 bp za seve vrst <i>O. deakii</i> , <i>O. histriatica</i> in <i>O. kolombanensis</i>	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Najpogostejsi nukleotidni zaporedji gena za EF-1 α pri *O. deakii*

Priloga B: Najpogostejsi nukleotidni zaporedji gena za EF-1 α pri *O. kolombanensis*

Priloga C: Najpogostejsi nukleotidni zaporedji gena za EF-1 α pri *O. histrianaica*

Priloga D: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α , ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α znotraj treh vrst: *O. kolombanensis*, *O. histrianaica* in *O. deakii*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

aa-tRNA	aminoacilna-tRNA (angl. aminoacyl tRNA)
alel	DNA zaporedje na določenem mestu v kromosomu oz. alternativna oblika gena
AOX	alkohol oksidaza (angl. alcohol oxidase)
bp	bazni par
C1 spojine	spojine z enim ogljikovim atomom
cDNA	komplementarna DNA (angl. complementary DNA)
CFU	število kolonijskih enot (angl. Colony Forming Units)
DAS	dihidroksiaceton sintaza
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
EF-1 α	translacijski elongacijski faktor 1 alfa
EF-Tu	elongacijski faktor Tu
GC par	gvanin-citozin bazni par
IPTG	izopropil- β -tiogalaktopiranozid
ITS	regija notranjih distančnikov ribosomske DNA (angl. Internal Transcribed Spacer)
MLVA	hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. Multi-Locus Variable number tandem repeats)
MOX	metanol oksidaza
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (angl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide)
OD	optična gostota
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PFGE	pulzna gelska elektroforeza (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic Acid)
rRNA	ribosomska RNA (angl. Ribosomal Ribonucleic Acid)
tRNA	prenašalna RNA (angl. Transfer Ribonucleic Acid)
UPMGA	metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. Variable Number of Tandem Repeats)
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov

1 UVOD

Istra je največji jadranski polotok, ki meji na Hrvaško, Slovenijo in Italijo. Zaradi ugodne geografske lege in sredozemskega podnebja, ima oljkarstvo na tem območju dolgo tradicijo. Gre za eno izmed najseverovzhodnih območij na svetu, kjer je še mogoče gojenje oljk in pridelava oljčnega olja.

V oljčnem olju so znotraj suspendiranih mikrokopljic vode ujeti številni mikroorganizmi, kot so plesni, mlečnokislinske bakterije in dominantni mikroorganizmi, kvasovke.

Iz ekstra deviškega oljčnega olja ter njegovega sedimenta sta bili izolirani *Ogataea histriana* in *Ogataea kolombanensis*, medtem ko je bila *Ogataea deakii* izolirana iz razpadajočega bukovega lesa (Čadež in sod., 2013). Omenjene kvasovke spadajo v skupino metilotrofnih kvasovk, ki predstavljajo manj kot 5 % opisanih vrst kvasovk (De Koning in Harder, 1992). Izolirane so bile iz tal, preperelega lesa, žuželk in rastlinskih substratov kot so lubje, sadje in izločki rastlin. Vsi ti substrati vsebujejo veliko lignina in pektina, ki sta velika potencialna vira metanola (Fall in Benson, 1996). Metilotrofne kvasovke so sposobne metanol in druge reducirane C1 spojine uporabljati kot edini vir ogljika in energije.

V rod *Ogataea* so vključene kvasovke, ki imajo značilno klobučasto oblikovane askospore in so sposobne rasti na metanolu in nitratu kot edinemu viru ogljika in dušika (Yamada in sod., 1995). Najpogosteje uporabljeni modelni organizem rodu *Ogataea* je *O. parapolymorpha* DL-1, ki jo uporabljam kot gostiteljski organizem za proizvodnjo rekombinantnih proteinov ter za študije metabolizma metanola in delovanja peroksisomov (Ravin in sod., 2013).

Fenotipske lastnosti vrst *O. deakii*, *O. histriana* in *O. kolombanensis* so dobro poznane. Manj pa poznamo njihove genetske lastnosti kot sta npr. DNA in RNA, saj še ni minilo veliko časa od njihovega opisa (Čadež in sod., 2013). Z namenom genetske karakterizacije smo določili število kromosomov in ocenili velikost genoma za kar smo uporabili pulzno gelsko elektroforezo, ki omogoča ločbo kromosomov kvasovk. Prav tako lahko z uporabo ostalih genotipizacijskih metod, kot je npr. analiza mikrosatelitnih lokusov, ocenimo stopnjo genetske raznolikosti med sevi znotraj iste vrste in njihovo razprostranjenost.

EF-1 α je eden od filogenetskih označevalcev pri kvasovkah. Čadež in sod. (2013) so s pomočjo molekularnega kloniranja dokazali, da se znotraj vrst *O. histriana* in *O. kolombanensis*, ki sta specifični za oljke v Slovenski Istri, pojavljajo različne variante kopij gena za EF-1 α , kar poraja dvom o uporabi EF-1 α kot filogenetskega označevalca.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

Cilji raziskovanja:

- Izolacija vrst rodu *Ogataea* iz sedimentov oljčnega olja pridelanega leta 2013 in 2014 v Slovenski Istri.
- Določiti število kopij genov filogenetskega označevalca EF-1 α v genomu in eksomu v različnih sevih vrst *O. kolombanensis* in *O. histrianaica* ter v sevu *O. deakii*, in oceniti njihovo distribucijo.
- Tipizirati seve *O. kolombanensis*, *O. histrianaica* in sev *O. deakii* na osnovi analize mikrosatelitnih lokusov.
- Oceniti velikost genomov in število kromosomov vrst *O. kolombanensis*, *O. histrianaica* in *O. deakii*.

Delovne hipoteze:

- Sediment oljčnega olja pridelanega leta 2013 in 2014 vsebuje heterogeno populacijo kvasovk, med njimi tudi vrste rodu *Ogataea*, ki so specifične za oljke v Slovenski Istri.
- Filogenetski označevalec EF-1 α ni primeren za filogenetske študije rodu *Ogataea* zaradi prisotnosti različnih kopij gena v genomu.
- Različnost filogenetskega označevalca je pogojena s heterozigotno naravo vrst kvasovk *Ogataea*.
- Genomi vrst *O. kolombanensis*, *O. histrianaica* in *O. deakii* se med seboj razlikujejo po številu in velikosti kromosomov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OLJKE

Oljke so sadeži drevesa oljke (*Olea europaea L.*), ki izhaja iz območja Mediterana. So različnih oblik, barv (črne ali zelene), velikosti (2-3 cm) in teže (3-10 g) (Galanakis, 2011). Njihova tekstura je zelo različna, ker je odvisna od sorte, vsebnosti olja, zrelosti sadeža, kakovosti tal, podnebja in drugih dejavnikov, ki vplivajo na fizikalno kemische lastnosti sadeža (Mafra in Coimbra, 2004). Zrele oljke so grenkega okusa zaradi prisotnosti fenolne spojine oleuropein (Lanza in sod., 2010).

V Sloveniji je velika večina nasadov v Slovenski Istri (98 % oljčnih nasadov), v manjši meri pa tudi v Goriških Brdih in drugod na Goriškem. V letu 2015 je bilo v Sloveniji posajenih 2047 ha oljčnikov. Letni pridelki oljk nihajo, vendar je trenutna ocenjena letna pridelava oljčnega olja okoli 600-700 ton (Polak Brenkič, 2015). Najbolj razširjena in udomačena sorta v Slovenski Istri je avtohtona sorta istrska belica, ki predstavlja 63 % vseh gojenih sort oljk. Plodovi so zeleni, srednje veliki in vsebujejo veliko olja, zaradi česar se ta sorta uporablja predvsem za proizvodnjo olja. Poleg omenjene sorte poznamo še številne druge sorte npr. leccino, črnica, buga, pendolino, ascolona, picholine, štorta ... (Lamut, 2010). Zaradi dobre tekture se avtohtona sorta štorta uporablja predvsem za proizvodnjo namiznih oljk (Valenčič in sod., 2009).

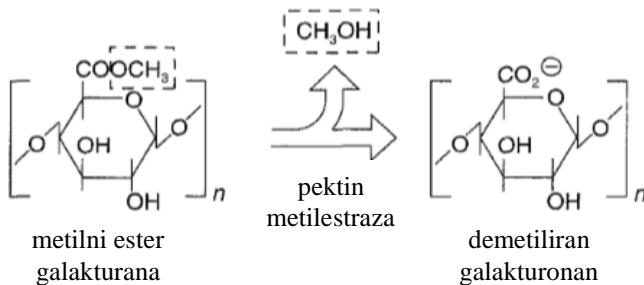
Oljke se večinoma uporabljajo za proizvodnjo namiznih oljk (fermentiranih oljk) ali za pridelavo oljčnega olja. Namizne oljke predstavljajo manj kot 1 % letnih proizvodov oljk v Sloveniji. Pridobimo jih z obdelavo zdravih in kakovostnih oljk, kjer odstranimo njihov naravni grenki okus, ki ga povzroča oleuropein. Proizvodnja namiznih oljk po tradicionalnem načinu Slovenske Istre poteka najprej z razgrenjevanjem oljk v vodi 10-20 dni in nato sledi fermentacija v slanici. Fermentacija poteka v prvih dveh dneh v 3,5 % slanici, nato 5-7 dni v 4,2 % slanici in do konca postopka (do 6 mesecev) v 6,2 % slanici. Med fermentacijo se voda menja vsake 2 dni (Valenčič in sod., 2009).

2.1.1 Sestava oljk

Sadež oljke vsebuje 60-75 % vode, 2-5 % sladkorjev in 20-30 % olj. Vsebnost olj v oljkah je odvisna od sorte in časa obiranja oljk (Esteves da Silva, 2010). Prav tako vsebujejo veliko fenolnih spojin, ki imajo protivirusno, protitumorsko in antioksidativno aktivnost (Ahmad-Qasem in sod., 2013). Fenolne spojine so produkt sekundarnega metabolizma dreves in močno vplivajo na barvo in okus oljk (Malheiro in sod., 2011). Najpomembnejše med njimi so fenolne kisline, fenolni alkoholi, flavonoidi in sekoiridoidi (oleuropein) (Lanza in sod., 2010). Fenolne spojine, naravni antioksidanti in protimikrobne sestavine imajo izrazit bakteriostatični učinek (Rodríguez in sod., 2009; Ruíz-Barba in sod., 1990).

2.1.2 Površina sadeža oljk

Pomembna komponenta primarne celične stene rastlin so polisaharidi kot so pektin, celuloza in hemiceluloza (Patova in sod., 2014). Pektinski polisaharidi so pomembna sestavina sadeža oljk, saj je njihova vsebnost lahko kar 40 %. Vsebnost pektina se v oljkah spreminja glede na metodo ekstrakcije in okoljskih dejavnikov (Coimbra in sod., 1995). Pektini so strukturno raznoliki polisaharidi obogateni z α -D-galakturonatnimi ostanki in manjšimi količinami α -L-arabinoze, β -D-galaktoze, α -L-ramnoze in ostalimi sladkorji (O'Neill in sod., 1990). Med metabolizmom sinteze celične stene nastajajo tudi razni stranski produkti, med katerimi je za metilotrofne kvasovke najpomembnejši metanol, ki nastane med demetilacijo pektina (Fall in Benson, 1996). Prekurzorji pektina vsebujejo številne galakturonatne metilne estre, ki olajšajo njihov transport do celične stene. V celični steni so metilni estri demetilirani s pektin metilesterazo, stranski produkt reakcije pa je sprostitev metanola. Encimska demetilacija pektina pomaga pri zorenju celice, saj zagotavlja vezavo kalcijevih ionov s stranskimi verigami karboksilatov in s tem zamreži verige polimerov v bolj rigidni gel, ki fizično stabilizira celično steno (Jarvis, 1984).



Slika 1: Demetilacija pektina s pektin metilesterazo je vir metanola v celični steni rastlin. Pektin je bogat polimer, ki vsebuje ponavljajoče ostanke polagalakturonske kisline z različnim številom stranskih verig metil estrov (Fall in Benson, 1996: 298)

Glavna komponenta rastlinske biomase v gnilem lesu je lignoceluloza, ki je sestavljena iz celuloze, hemiceluloze in lignina. Učinkovito jo razgrajujejo predvsem glive, med katerimi so najpomembnejše glive bele in rjave gnilobe (Bennett in sod., 2002). Čeprav kvasovke niso sposobne razgraditi lignocelulognega materiala, lahko uporabijo številne komponente, ki se sprostijo med razgradnjo lesa, npr. metanol, za svojo rast (Sánchez, 2009). Glive s svojimi encimi demetoksilirajo lignin tekom razgradnje. Tako močno povečajo vsebnost metoksi skupin v ostanek lignina, iz katerih nastane metanol (De Koning in Harder, 1992). Metanol se sprošča tudi med metabolizmom rastlin (Nemecek-Marshall in sod., 1995).

2.1.3 Sestava združb epifitov

Mikrobna populacija sadeža oljk je eden izmed dejavnikov, ki vplivajo na dinamiko fermentacije in na kakovost namiznih oljk ter oljčnega olja (Panagou in sod., 2008; Rodríguez in sod., 2009). Mlečnokislinske bakterije in kvasovke, ki so prilagojene na intrinzične značilnosti sadeža, so del avtohtone mikrobiote surovih oljk. Valenčič in sod.

(2010) so odkrili, da v namiznih oljkah pridobljenih na tradicionalni način Slovenske Istre, igrajo dominanto vlogo kvasovke. Identificirali so naslednje kvasovke: *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus adeliensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia anomala* in *Candida oleophila*. Kvasovke s svojimi metabolizmom proizvajajo aromatične spojine kot so npr. glicerol, višji alkoholi, hlapne spojine, ocetno, jantarno in mravljično kislino, etanol, metanol in acetaldehid, ki vplivajo na senzorične lastnosti namiznih oljk. Če med fermentacijo mlečnokislinske bakterije prerastejo kvasovke, je končni izdelek bolj zakisan, kar je zaželeno predvsem pri fermentaciji naravno črnih oljk (Arroyo López in sod., 2008; Garrido in sod., 1995; Montaño in sod., 2003).

2.2 OLJČNO OLJE

Oljčno olje, ki je tipičen produkt Mediterana, je znano po svoji visoki hranični vrednosti. Ta je odvisna od vrste in koncentracij snovi kot so tokoferoli, karotenoidi in fenolne spojine (Ciafardini in Zullo, 2002a). Oljčno olje se pridobiva z mehansko predelavo oljk in s hladnim stiskanjem oljčnega mesa pri 27 °C (Valenčič, 2004). Za ekstrakcijo olja iz oljk je potrebno najprej sadeže zdrobiti ali zmleti z mlinskimi kamni, da dobimo pasto. Nato se pasta počasi meša in gnete, kar omogoča združitev malih kapljic olja v velike, zaradi česar lažje ločimo vodno fazo od oljne. Pasto nato zložimo na vlaknaste plošče, ki so naložene v koloni ena na drugo in s stiskalnico ločimo tekočino od trdnega materiala. Alternativno lahko pasto centrifugiramo v vodoravnem centrifugalnem separatorju ali v zbiralniku, ki loči tropine in tekočo fazo (Palumbo in Harris, 2011). Nato sledi še separacija olja od vegetacijske vode (Valenčič, 2004). Motno olje pustimo, da se s pomočjo gravitacije zbistri (Palumbo in Harris, 2011). Ponavadi med proizvodnjo oljčnega olja nastaneta dva stranska produkta: tropine (trdni ostanek oljk) in rijavo-črna vegetacijska voda, ki vsebuje velike količine monomernih in polimernih fenolov in ostalih organskih spojin (Hamdi, 1993).

Oljčno olje se običajno skladišči nekaj mesecev, s čimer omogočimo, da se trdni delci in mikroorganizmi, ki so ujeti v mikrokapljicah vegetacijske vode, posedejo na dno posode, kjer tvorijo sediment. Zaradi delovanja mikrobnih encimov in encimov iz oljk, ki hidrolizirajo oleuropein, se v času sedimentacije močno izboljšajo fizikalno-kemijske lastnosti in okus oljčnega olja (Ciafardini in Zullo, 2002a). Včasih se olje tudi filtrira, da odstranimo trdne delce, ki so prisotni v olju (Palumbo in Harris, 2011).

2.2.1 Sestava združbe in njihova vloga

Mikroorganizmi na površini oljk se med drobljenjem in mletjem premaknejo na trdne delce, ki so ujeti v mikrokapljicah vegetacijske vode suspendirane v oljčnem olju (Ciafardini in Zullo, 2002b). pH vegetacijske vode je manjši od 5. Število

mikroorganizmov in njihov dostop do hranil je omejen z velikostjo mikrokopljic vode (1-5 µm). Število mikrokopljic pa je odvisno od metode pridelovanja olja in časa sedimentacije (Palumbo in Harris, 2011).

Mikrobiološki profil oljčnega olja se precej razlikuje od mikrobiote zdravega oljčnega sadeža. V oljčnem olju nekateri mikrobi iz mikrobiote sadeža preživijo kratek čas npr. bakterije in plesni, medtem ko se drugi mikrobi razmnožujejo glede na kemijo sestavo olja. Mikrobi, ki tvorijo tipično mikrobioto oljčnega olja, so kvasovke (Ciafardini in sod., 2004). *Candida wickerhamii*, *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida guilliermondii*, *Barnetozyma (Williopsis) californica*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae* in *Yamadazyma terventina* so bile izolirane iz ekstra deviškega oljčnega olja iz Italije ter *Candida lusitaniae*, *Candida famata* in *Rhodotorula mucilaginosa* iz motnega grškega deviškega olja (Ciafardini in Zullo, 2002a; Ciafardini in sod., 2006, 2013; Zullo in sod., 2010; Koidis in sod., 2008). V oljčnem olju iz Slovenije so bile odkrite naslednje nove vrste kvasovk: *Candida adriatica*, *Candida molentinolei*, *Ogataea kolombanensis* in *Ogataea histrianica* (Čadež in sod., 2012, 2013). Koidis in sod. (2008) so v motnem grškem oljčnem olju poleg kvasovk našli tudi mlečnokislinske bakterije in plesni rodu *Helicosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* in *Aspergillus*. Prisotnost plesni v oljčnem olju ni zaželena zaradi okusa po plesnivem. Prav tako lahko nekatere plesni proizvajajo mikotoksine, ki lahko ogrozijo zdravje ljudi (Zinedine in Mañes, 2009).

Kvasovke proizvajajo encime, ki lahko izboljšajo ali poslabšajo kakovost oljčnega olja. Nekateri sevi *C. wickerhamii* in *S. cerevisiae* proizvajajo β-galaktozidazo in esteraze, ki hidrolizirajo oleuropein v preprostejše, ne grenke spojine z visoko antioksidativno aktivnostjo in tako izboljšajo senzorične karakteristike olja med shrambo (Ciafardini in Zullo, 2002a). V nasprotnem primeru pa lahko nekateri sevi *B. californica*, *S. cerevisiae*, *C. adriatica* poslabšajo kakovost oljčnega olja s proizvodnjo lipaz, ki hidrolizirajo trigliceride do nezaželenih kislin (Čadež in sod., 2012; Ciafardini in sod., 2013).

2.3 ROD *Ogataea*

Rod *Ogataea* spada v kraljestvo gliv, deblo Ascomycota, poddebelo Saccharomycotina, razred Saccharomycetes, podrazred Saccharomycetidae, red Saccharomycetales in družino Saccharomycetaceae. Glede na bazo Mycobank vsebuje rod *Ogataea* 47 vrst kvasovk (Robert in sod., 2005). Poimenovanje rodu so predlagali Yamada in sod. (1995) na podlagi delne analize nukleotidnega zaporedja 18S in 26S gena za rRNA. Vanj so vključene vrste, ki tvorijo askospore v obliki klobuka in so sposobne rasti na metanolu in nitratu kot edinemu viru ogljika, energije in dušika. Metilotrofne kvasovke najdemo tudi znotraj rodov *Pichia*, *Kuraishia*, *Komagataella* in *Candida* (Kurtzman, 1998; Yamada in sod., 1994, 1995; Meyer in sod., 1998).

2.3.1 *Ogataea kolombanensis*, *Ogataea histriana* in *Ogataea deakii*

O. kolombanensis in *O. histriana* sta kvasovki, ki sta tipični za oljke v Slovenski Istri. Večino izolatov so izolirali iz sedimenta oljčnega olja mešanih ali posameznih sort, pridobljenega iz oljk v Slovenski Istri leta 2009, 2011 in 2012. Edini znani izolat *O. histriana* (ZIM 2482), ki ne prihaja iz območja Slovenske Istre, so osamili iz nefiltriranega ekstra deviškega oljčnega olja v Siciliji leta 2012. Njuna filogenetsko ozko sorodna vrsta je *O. deakii*, kateri edini izolat so osamili v Pilis gorah na Madžarskem leta 2003 iz razpadajočega bukovega lesa (Čadež in sod., 2013).

Za vse tri vrste je značilno, da se spolno razmnožujejo z multilateralnim brstenjem. Celice so okrogle ali elipsoidne oblike, ki se lahko pojavljajo same, v parih ali v manjših gručah. Kolonije so maslene, kremne barve, gladke, ploščate in svetleče. Po konjugaciji med dvema neodvisnima celicama ali med celico in brstom, tvorijo 2-4 klobučasto oblikovane askospore v vsakem asku. So homotalične, saj lahko preklapljam med paritvenimi tipi. *O. kolombanensis* in *O. deakii* rasteta do maksimalne temperature 34 °C, *O. histriana* pa do 36 °C. *O. kolombanensis* in *O. deakii* počasi fermentirata trehalozo, medtem ko je *O. histriana* ne. *O. kolombanensis* in *O. histriana* asimilirata glukono-δ-lakton, medtem ko ga *O. deakii* ne. *O. deakii* lahko edina počasi asimilira galaktitol, kar je zelo redka lastnost metilotrofnih kvasovk. Poleg tega poznamo le en sev vrste *O. deakii*, zaradi česar ni povsem jasno ali je to vrstno ali za sev specifična lastnost (Čadež in sod., 2013).

Med vsemi tremi vrstami so minimalne fiziološke raznolikosti, zato je njihova fenotipska identifikacija skoraj nesmiselna. Problem predstavljajo tudi fenotipske razlike med sevi, vendar jih lahko vseeno zanesljivo ločimo od drugih filogenetskih sorodnikov.

2.3.2 *Ogataea polymorpha* in *Ogataea parapolymorpha*

Genetske lastnosti vrst *O. kolombanensis*, *O. histriana* in *O. deakii* so manj poznane, medtem ko so znotraj roda *Ogataea* zelo dobro poznane genetske lastnosti vrste *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Kompleks vrste *Ogataea (Hansenula) polymorpha* vključuje več filogenetsko ozko sorodnih vrst, kot sta *O. polymorpha* in *O. parapolymorpha*. Eden od pogosto uporabljenih in popularnih sevov je *O. parapolymorpha* DL-1 (ATCC 26012) (Kunze in sod., 2009; Kurtzman, 2011). Uporablja ga za raziskave metabolizma metanola, biogeneze in funkcij peroksisomov. Zaradi odpornosti na težke kovine, oksidativni stres in termotoleranco, predstavlja gostiteljsko celico za proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Prav tako je pomemben pri metabolnem inženiringu za proizvodnjo etanola pri visokih temperaturah, saj je sposoben fermentirati ksilozo in rasti nad 40 °C (Ravin in sod., 2013; Ryabova in sod., 2003). Poleg seva DL-1 so bile raziskave najpogosteje narejene še na dveh sevih: CBS 4732 in NCYC 495. Ti sevi so neodvisnega

izvora in kažejo različne lastnosti vključno z različnim številom kromosomov. Odvisno od seva lahko razlikujemo med 2 do 7 kromosomov (Marri in sod., 1993; Lahtchev, 2002).

Genom *O. parapolymorpha* DL-1 je sestavljen iz sedmih linearnih kromosomov velikosti od 0,99 do 1,52 Mbp. Celotna izračunana velikost jedrnega genoma je približno 9 Mbp in vsebuje 5325 genov, ki kodirajo proteine. Vsebnost GC parov v genomu je 47,8 %. Genom vsebuje malo podvajanja in redundancy (preobilnosti) genov podobno kot pri *Pichia pastoris* (Ravin in sod., 2013). Velikost krožnega mitohondrijskega genoma je 42 kbp in vsebuje gene za respiratorni kompleks I (Eldarov in sod., 2011; Solieri, 2010).

Celotna ocenjena velikost genoma *O. polymorpha* CBS 4732 (ATCC 34438) je 9,5 Mbp. Genom predstavlja šest kromosomov, katerih razpon velikosti je 0,9 do 2,2 Mbp. Genom vsebuje 47,9 % GC parov in 5933 genov, ki kodirajo proteine. Vsebuje tudi 80 tRNA genov, ki kodirajo vseh 20 aminokislin enako kot sev DL-1 (Ramezani-Rad in sod., 2003).

2.3.2.1 Transkriptom

Rast metilotrofnih kvasovk na metanolu močno vpliva na celični metabolizem, fiziologijo, znotrajcelično strukturo, sintezo makromolekul, energetiko in na izražanje genov. Sprememba vira ogljika iz glukoze na metanol močno spremeni izražanje genov in kromosomski vzorec transkriptoma v *O. parapolymorpha* DL-1. Takrat se začne izražati velik del genoma (94 %), kjer so še posebno močno izraženi geni, ki kodirajo encime za metabolizem metanola in na stotine genov za proteine, ki so odgovorni za prilagoditev rasti na metanolu. Med njih spadajo geni za biogenezo in delovanje peroksisomov, antioksidativni stres, pentozno fosfatno pot, transporterje, nekatere ribosomalne proteine in komponente mitohondrijskega oksidativno-fosforilacijskega sistema. Utišani pa so predvsem geni za encime glikolize, biosintezo makromolekul (translacija, transkripcija, podvajanje DNA), kinaze in fosfotransferaze. Zmanjšanje biosintezih procesov je povezano z zmanjšano proliferacijo celic zaradi rasti na C1 spojinah (Ravin in sod., 2013).

2.4 RAST NA METANOLU

Vse metilotrofne kvasovke uporabijo isti sistem izkoriščanja metanola, ki je sestavljen iz številnih in visoko inducibilnih encimov, ki so lokalizirani v peroksisому. Učinkoviti in dobro regulirani promotorji genov za asimilacijo metanola, se pogosto uporabljam pri izražanju genov in študijah proizvodnje rekombinantnih proteinov (Hollenberg in Gellissen, 1997).

Prvi in najbolj razširjen encim pri izrabi metanola je alkohol oksidaza (AOX), ki oksidira metanol do formaldehida in vodikovega peroksida, katerega razgradi katalaza na kisik in vodo (Ravin in sod., 2013). AOX ne oksidira samo metanola ampak tudi ostale

kratkoverižne alkohole in formaldehid. V peroksisomu je lokalizirana skupaj z dihidroksiaceton sintazo (DAS) in katalazo. AOX in DAS lahko predstavlja do 70 % volumna vseh celičnih proteinov, odvisno od pogojev rasti. Takrat AOX tvori kristaloide, ki dajo karakteristično kristalinično obliko peroksisomom (Van der Klei in sod., 2006). Promotor AOX je eden izmed najmočnejših inducibilnih znanih promotorjev (Cereghino in Clegg, 1999). V *O. polymorpha* je izražanje metanol oksidaze (MOX) pod kontrolo promotorja MOX, ki je reprimiran ob prisotnosti glukoze in aktiviran ob prisotnosti glicerola ali metanola (Gellissen in sod., 1992). Število genov, ki kodirajo AOX se med metilotrofnimi kvasovkami razlikuje. V *O. polymorpha* le gen MOX kodira metanol oksidazo (Clegg in sod., 1989; Sakai in Tani, 1992).

Formaldehid se lahko metabolizira na dva načina, ali se disimilira v citosolu, kjer je s pomočjo encimov oksidiran do CO₂ (disimilacijska pot) ali asimilira v celični metabolizem s kondenzacijo ksiloze-5-fosfat, ki jo katalizira DAS (asimilacijska pot). Vir ksiloze-5-fosfat predstavlja pentozno fosfatna pot. DAS pretvori ksiloz-5-fosfat in formaldehid v gliceraldehid-3-fosfat in dihidroksiaceton fosfat, ki se v citosolu uporabita za biosinetezo sladkorjev, nukleozidov in aminokislin (Ravin in sod., 2013). Disimilacijska pot je pomembna tudi za regeneracijo molekule NADH in detoksifikacijo formaldehida, ki lahko nastaja tudi pri metabolizmu metiliranih virov dušika (holin, metilamin) (Sakai in sod., 1997; Lee in sod., 2002).

Peroksisomi so enostavni organeli z enojno membrano, ki obdaja beljakovinski matriks. Vsebujejo encime, ki sodelujejo pri različnih presnovnih procesih. So esencialni in inducibilni organeli, ki so prisotni v vseh evkariontskih celicah (Van den Bosch in sod., 1992; Veenhuis in Harder, 1991). So ključnega pomena za metilotrofijo, saj omogočajo ustrezno kompartmentizacijo asimilacije in disamilacije formaldehida. Poleg tega zagotavljajo varno lokacijo za detoksifikacijo vodikovega peroksidu in reaktivnih kisikovih zvrsti, ki nastajajo med oksidacijo metanola in drugih substratov (Van der Klei in Veenhuis, 2002). Ker poteka metabolna pot izrabe metanola v peroksisomih, se ti po indukciji z metanolom množično namnožijo in zavzamejo celo do 80 % citoplazemskega prostora (Gleeson in Sudbery, 1988). Geni, ki kodirajo proteine imenovane peroksine, ki so potrebni za biogenezo in proliferacijo peroksisomov, imenujemo geni PEX (Kiel in sod., 2006). Njihovo izražanje je med rastjo na metanolu močno povečano (Ravin in sod., 2013).

2.5 Transkripcijski elongacijski faktor 1α (EF-1α)

Pri evkariontih poznamo številne filogenetske označevalce. Organizatorji projekta »Assembling the Fungal Tree of Life Project«, katerih cilj je postaviti filogenijo kraljestva gliv, so izbrali šest najpomembnejših filogenetskih označevalcev, ki so geni 18S rDNA, regija ITS, geni 26S oz. 28S rDNA, geni majhne podenote mitohondrijske rRNA, geni največje in druge največje podenote RNA polimeraze II (*RPB1* in *RPB2*) in gen za EF-1α

(*TEF1*) (Weiss in sod., 2012). Zelo pogosto se kot filogenetski označevalec uporablja tudi regija D1/D2 28S rDNA (Kurtzman in Robnett, 1997), α - in β - tubulin (Edlind in sod. 1996; Keeling in Doolittle, 1996) in aktin (Drouin in sod., 1995).

Transkripcijski elongacijski faktor je esencialen, visoko ohranjen ubikvitaren protein, ki je eden izmed najštevilnejših topnih proteinov v evkariontski celici (Slobin, 1980; Roger in sod., 1999). EF-1 α je bistvenega pomena pri transportu aminoacilnih tRNA (aa-tRNA) do ribosoma v elongacijski fazji translacije (Riis in sod., 1990; Merrick, 1992). Podobno kot bakterijski elongacijski faktor (EF-Tu), EF-1 α tvori trojni kompleks z vezavo aa-tRNA in GTP, ki prenaša nabito aa-tRNA na A mesto ribosoma na račun hidrolize GTP. Poleg tega EF-1 α nadzira tudi točnost translacije. Valente in Kinzy (2003) trdita, da spremembe v koncentraciji EF-1 α v *S. cerevisiae* sočasno vodijo do napačne translacije in premika bralnega okvirja. Prav tako so Kiel in sod. (2007) ugotovili, da prekomerna produkcija EF-1 α v *O. polymorpha* vodi do občasnega napačnega branja kodonov in povečanega branja stop kodonov, kar vodi do predčasne terminacije translacije. Poleg pomembne vloge EF-1 α v translaciji so Lamberti in sod. (2004) dokazali njegovo vlogo še v apoptozi, degradaciji proteinov posredovani s ubikvitinom, vezavi z kalmodulinom in povezovanju aktinskih filamentov. Te dodatne vloge so bile opažene izključno pri višjih evkariontih. Vendar so Munshi in sod. (2001) dokazali, da se EF-1 α v *S. cerevisiae* veže na aktinske filamente in jih povezuje med seboj, kar vpliva na aktinski citoskelet.

Kiel in sod. (2007) so dokazali, da se EF-1 α v celici *O. polymorpha* nahaja na številnih lokacijah, saj so ga poleg AOX in DAS našli tudi v peroksisomu. Odkrili so, da je velikost EF-1 α 52 kDa in da je zelo podoben ostalim ortologom drugih evkariontov (81-93 % podobnost) in tudi prokarionskim EF-Tu (okoli 30 %). V številnih vrstah kvasovk EF-1 α kodirata vsaj dva gena (Schirmaier in Philippse, 1984; Sundstrom in sod., 1987, 1990). Tudi genom *O. polymorpha* vsebuje dva gena, ki kodirata EF-1 α , in sicer *TEF1* in *TEF2*. Njuna nukleotidna zaporedja se razlikujeta le v šestih nukleotidih med 1380-ih. Nasprotno velja za promotorske in terminalne regije genov, ki so si precej različne. Oba gena *TEF* kodirata identični protein, njuna delecia pa je za celico smrtna. Oba gena se konstitutivno izražata, le da je izražanje *TEF1* gena 1,5-2 x močnejše od izražanja *TEF2* gena (Kiel in sod., 2007).

Čadež in sod. (2013) so ugotovili, da se znotraj vrste *O. histriatica* sevi razlikujejo v EF-1 α . Med sevi ZIM 2463, ZIM 2466, ZIM 2467, ZIM 2476 in ZIM 2477 so dokazali razliko v enem nukleotidu znotraj 816 bp dolgega nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α , medtem ko se je sev ZIM 2482 razlikoval od ostalih sevov v desetih substitucijah. Opazili so tudi, da se je na tretjem mestu kodona pojavilo 0,25-3,4 % dvomljivo poimenovanih baz, kar je bilo na kromatogramu nukleotidnega zaporedja opazno kot dvojni vrhovi. Sklepali so, da pojav kaže na prisotnost heterozigotnih diploidov (Clark, 1990) ali na

prisotnost paralogov gena za EF-1 α , ki so se podvojili z uporabljenimi oligonukleotidnimi začetniki (Čadež in sod., 2013).

2.6 GENOTIPIZACIJA

2.6.1 Identifikacija vrst na podlagi restrikcijske analize ITS

Analize DNA, ki kodira rRNA, se pogosto uporabljajo pri študijah taksonomije in za identifikacijo vrst, saj so ribosomi prisotni v vseh celičnih organizmih in si verjetno delijo skupni evolucijski izvor. Najpogosteje analizirana je regija ITS (Schoch in sod., 2012). Regijo ITS pomnožimo s pomočjo skonstruiranih začetnih oligonukleotidov z uporabo metode PCR (Dlauchy in sod., 1999).

PCR je metoda, ki omogoča pomnoževanje enega ali več odsekov DNA s pomočjo DNA polimeraze. Osnovni princip PCR metode je, da iz ene DNA molekule po verižni reakciji nastaneta dve kopiji (Mohini in Deshpande, 2011). Pomnožek PCR nato režemo z različnimi restrikcijskimi encimi (Dlauchy in sod., 1999). Restrikcijski encimi so encimi, ki prepozna specifično nukleotidno zaporedje in tam razrežejo dvovijačno DNA (Robert in Murray, 1976). Prepoznavno mesto variira od 4 do 8 nukleotidov. Prepoznavno mesto je različno za vsak restrikcijski encim, kar privede do razlik v dolžini fragmentov in topih ali lepljivih koncev (Goodsell, 2002). Tako npr. restrikcijski encim *Cfo*I prepozna nukleotidno zaporedje GCG↓C, *Hae*III GG↓CC in *Hinf*I G↓ANTC. Restrikcijski vzorec, ki ga opazimo na gelski elektroforezi, nam omogoča razlikovanje in identifikacijo med vzorci. Takšne analize so zelo uporabno taksonomsko orodje za hitro identifikacijo na ravni vrste ob sočasni analizi identificiranega seva in za ugotavljanje razlik v dolžini genov, ki kodirajo rRNA (Dlauchy in sod., 1999; Valente in sod., 1996). Resnična prednost metode je predvsem hitra in natančna identifikacija ter njena ponovljivost (Dlauchy in sod., 1999).

2.6.2 Molekularno kloniranje

Molekularno kloniranje je postopek, kjer izoliramo DNA zaporedje gena katerekoli vrste in ga vstavimo v vektor, kjer se pomnožuje brez spremnjanja izvornega zaporedja DNA. Tako ustvarimo nešteto kopij DNA za analizo nukleotidnega zaporedja gena in/ali za izražanje nastalega proteina. Molekularno kloniranje vsebuje štiri osnovne korake. Najprej je potrebno izolirati tarčni DNA fragment, ki ga imenujemo insert. Nato sledi ligacija inserta v primeren vektor npr. plazmid in transformacija rekombinantnega vektorja v bakterijo, kjer je najpogostejša uporabljenega bakterija *Escherichia coli*, ali v drug primeren organizem za pomnoževanje. Nato sledi selekcija kolonij/celic, ki vsebujejo rekombinantne plazmide (Tirabassi in Bio, 2014).

Eden od vektorjev je tudi plazmid pGEM-T Easy Vector System I (Promega). Gre za linearen vektor, ki ima na obeh 3' koncih dodan timidin. Dodatek timidina na insercijskem mestu močno izboljša učinkovitost ligacije pomnožkov PCR, ker preprečuje zaprtje plazmida. Hkrati omogoča dobro prileganje pomnožkov PCR, ki jih sintetizirajo termostabilne polimeraze, ki na 3' koncu dodajajo adenin. Znotraj klonirnega mesta plazmid vsebuje številna restriktijska mesta za restriktijske encime. Plazmid vsebuje tudi SP6 in T7 RNA polimerazna promotorja, ki obdajata klonirno mesto znotraj regije, ki kodira α -peptid encima β -galaktozidaze. Vstavitev inserta v klonirno mesto inaktivira β -galaktozidazo, kar omogoča identifikacijo rekombinant z modro-belim testom na indikatorskih ploščah z ampicilinsko selekcijo. Rekombinante z insertom prepoznamo na plošči po belih kolonijah. Če plazmid ne vsebuje inserta, se take kolonije obarvajo modro. Ker insert ne prekine lacZ gena, celice sintetizirajo β -galaktozidazo, ki razgradi X-Gal do modro obarvanega produkta (indigo), ki kolonije značilno obarva modro (Promega, 2015).

2.6.3 Mikrosateliti

Mikrosateliti so kratke 1-6 bp dolge tandemske ponovitve zaporedja DNA (Schlötterer, 1998). V številnih genomih evkariontov kažejo znatno stopnjo polimorfizma (10^{-2} - 10^{-5} mutacij na lokus na generacijo) (Richard in sod., 1999). Dolžina polimorfizma mikrosatelitov izhaja iz sprememb števila ponavljačih se enot (Ellegren, 2004). Te preproste ponovitve oligonukleotidov omogočajo natančno, robustno in visoko ponovljivo alelno karakterizacijo po velikosti ali sekvenciranju pomnožkov PCR (Squirrell in sod., 2003). Pogosto se uporabljam za konstrukcijo dreves tesno povezanih vrst ali populacij in za identifikacijo patogenih gliv (Takezaki in Nei, 2008; Foulet in sod., 2005). Njihov pomen in uporabnost kot genetski označevalci se močno povečuje. Analize mikrosatelitnih lokusov imajo pred ostalimi analizami prednost, ker se mikrosateliti obnašajo kot kodominantni označevalci, ki se v genomu hitreje razvijajo, poleg tega so še hipervariabilni in visoko informativni. To nam omogoča razlikovanje med izolatimi mikroorganizmovi z nizko stopnjo nihanja DNA zaporedja (Belaj in sod., 2003).

Genotipizacija z označevalci je široko uporabljeni metoda v molekularni biologiji. Večina genotipizacije poteka z uporabo metode PCR z določenim oligonukleotidi (Schuelke, 2000). Da lahko analiziramo dolžino pomnožkov PCR z elektroforezo in laserskim detekcijskim sistemom, mora biti eden od začetnih oligonukleotidov fluorescentno označen npr. z 6-karboskil-fluorescinom, heksakloro-6-karboksil-fluorescinom ... Schuelke (2000) je predlagal novo tehniko fluorescentnega označevanja pomnožkov PCR, ki se uporablja za vse lokuse. V eni PCR reakciji sodelujejo trije začetni oligonukleotidi. Poleg vodilnega z M13 repom in povratnega, je v mešanici še začetni oligonukleotid FAM. Začetni oligonukleotid FAM je univerzalni, fluorescentno označen začetni oligonukleotid M13. Pogoji termociklov so izbrani tako, da se najprej vgraje v pomnožke PCR vodilni oligonukleotid z M13 repom. Ko se ta porabi, se zmanjša temperatura prileganja, kar olajša

prileganje univerzalno označenega začetnega oligonukleotida M13. Tako ta prevzame mesto vodilnega oligonukleotidnega začetnika in vključi fluorescentno barvilo v pomnožek PCR.

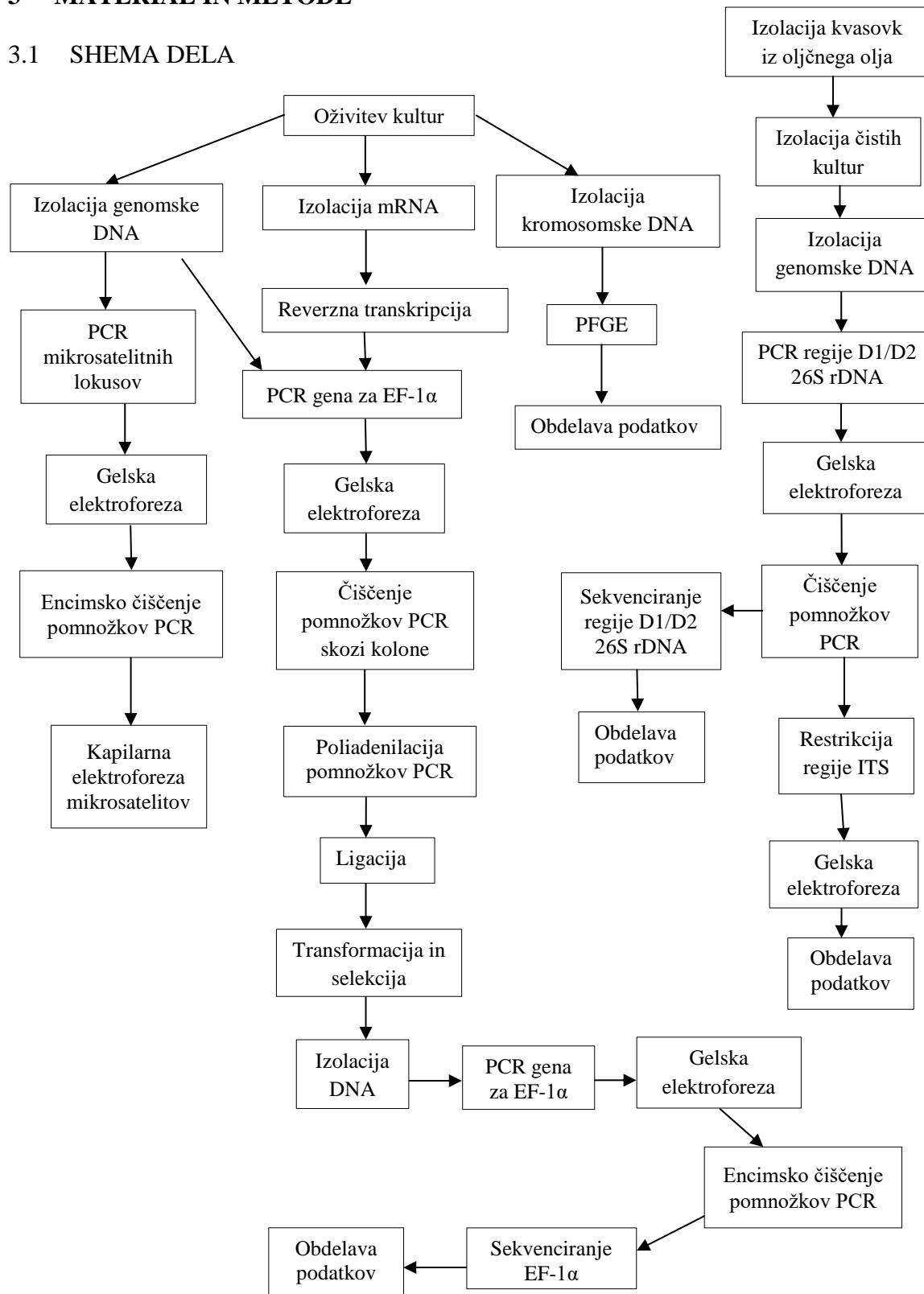
2.6.4 Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju

Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju (PFGE) je metoda, ki omogoča ločevanje velikih DNA molekul velikosti do 10 Mb. Uporablja se pri analizah intaktne kromosomske DNA za oceno velikosti genoma, števila kromosomov in njihovo velikost ter pri analizah velikih restriktijskih fragmentov. Omogoča tudi ugotavljanje polimorfizmov in prerazporeditev genomov v vseh vrstah organizmov od bakterij, kvasovk do sesalskih celic (Herschleb in sod., 2007). Ločevanje poteka tako, da molekula DNA potuje skozi agarozni gel pod vplivom električnega pola, ki se vklaplja periodično. Električna polja so usmerjena drug proti drugem pod kotom večjim od 90°, kar prisili DNA, da se reorientira po vsaki spremembi v smeri električnega polja. Čas, ko električno polje deluje v eno smer preden se nenadoma preklopi na drugo, imenujemo pulzni čas. Ko se spremeni smer električnega polja, večje molekule porabijo več časa za reorientacijo preden začnejo ponovno prehajati skozi gel. Ker so večje molekule DNA bolj okorne in težje spremenijo smer potovanja, po gelu potujejo počasneje kot manjše DNA molekule (Waschk in sod., 2005).

Pri pripravi vzorcev moramo biti pozorni, da molekul DNA ne poškodujemo, saj so molekule večje od 500 kb mehansko nestabilne in se lahko zlomijo (Herschleb in sod., 2007). Vzorce običajno pripravimo tako, da intaktne celice ali protoplaste vnesemo v agarozo in jih tam liziramo oz. sprostimo celično vsebino. Agaroza pri tem ohranja molekule DNA nepoškodovane, medtem ko dovoljuje prosto difuzijo pufrov in encimov. Parametre ločevanja določimo glede na pričakovano velikost molekul DNA. Po končani elektroforezi, ki traja 2-3 dni, na gelu opazimo specifični vzorec prog, ki je odvisen od števila in velikosti kromosomov ali fragmentov (Waschk in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SHEMA DELA



Slika 2: Shema poteka eksperimentalnega dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Laboratorijski material in oprema

V laboratoriju smo med raziskavo uporabili naslednji laboratorijski material:

- haljo
- rokavice
- plastične cepilne zanke
- spatulo
- injekcijska brizgo
- nitrozo-celulozni filter velikosti por 0,2 µm (Sartorius)
- mikrotiterske plošče (Thermo Scientific, Life science products)
- nastavke za pipete
- pipete (Eppendorf, Gilson)
- merilne valje
- laboratorijske steklenice
- magnetke
- petrijeve plošče
- PCR mikrocentrifugirke
- mikrocentrifugirke - 1,5 mL, 2 mL in 15 mL
- stojala za mikrocentrifugirke
- čaše
- nosilec za agarozni gel in glavnički
- epruvete z zamaškom
- plastično drigalsko spatulo
- sterilne zobotrebce
- falkonke 15 mL.

V laboratoriju smo med raziskavo uporabili naslednjo laboratorijsko opremo:

- elektroforezno banjico (BioRad)
- generator za elektroforezo (BioRad)
- komoro za fotografiranje agaroznega gela (BioRad)
- računalnik
- mikrovalovno pečico
- vodno kopel
- tehtnice (Exacta, Mono BIOC)
- magnetno mešalo (IKA)
- vibracijski mešalnik
- termoblok (Eppendorf)
- napravo za PCR (BioRad - iCycler, Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400)
- centrifuge (5415 C Eppendorf, Sigma 2 - 15, Mini Spin plus, Centric 322A)
- naprava za PFGE (BioRad - CHEF-DR® III System)
- zamrzovalne skrinje in hladilnik
- inkubator (Kambič)
- brezprašno komoro (SMBC 122AV)
- pH meter
- avtoklav (Sutjeska)
- homogenizator (Bullet Blender™)
- stresalnik (Infors HT)

- spektrofotometer Lambda Bio⁺ (Parkin Elmer).

3.2.2 Mikroorganizmi

V magistrskem delu smo preučevali 18 izolatov kvasovk rodu *Ogataea*, ki so bili v večini izolirani iz oljčnega olja z različnih lokacij (Preglednica 1): *Ogataea histrianaica*, *Ogataea kolombanensis* in *Ogataea deakii*. Uporabljeni izolati so vključeni v zbirk ZIM, kjer so tudi trajno shranjeni pri -80 °C. Zbirka industrijskih mikroorganizmov je del Mreže raziskovalnih infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRIC UL) in se nahaja na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih izolatov s podatki o izvoru

vrsta	ZIM oznaka	leto	substrat	lokacija
<i>Ogataea histrianaica</i>	ZIM 2467	2011	sediment oljčnega olja sorte ascolana	Barižoni, Slovenija
	ZIM 2466			
	ZIM 2463			
	ZIM 2476		sediment oljčnega olja mešanih sort	
	ZIM 2477			
	ZIM 2482	2012	nefiltrirano ekstra deviško oljčno olje	Sicilija, Italija
	ZIM 2524			Kolomban, Slovenija
	ZIM 2528			
	ZIM 2530		sediment oljčnega olja mešanih sort	Barižoni, Slovenija
	ZIM 2532			
	ZIM 2535			
	ZIM 2536			
	ZIM 2537			
<i>Ogataea kolombanensis</i>	ZIM 2470	2011		Kolomban, Slovenija
	ZIM 2533	2012	sediment oljčnega olja mešanih sort	
	ZIM 2534			
	ZIM 2322	2009	sediment oljčnega olja sorte istrska belica	Bertoki, Slovenija
<i>Ogataea deakii</i>	ZIM 2481	2003	rjava gniloba lesa bukve (<i>Fagus sylvatica</i>)	Pilis gore, Madžarska

Za kloniranje smo potrebovali tudi kompetentne celice *Escherichia coli* seva DH5α, ki so bile shranjene pri -80 °C.

3.2.3 Mikrobiološka gojišča

- agar YPD s kloramfenikolom

Za pripravo 1 L gojišča YPD (angl. Yeast Peptone Dextrose agar) smo natehtali 50 g YPD (Sigma) in 20 g bakteriološkega agarja. Osnovo smo raztopili v 1 L destilirane vode in mešanico sterilizirali v avtoklavu pri tlaku 1,1 bar in pri 121 °C 15 min. Pred razlitjem ohlajene mešanice smo dodali kloramfenikol raztopljen v etanolu s končno konc. 1 g/L.

- tekoče in trdno LB gojišče z ampicilinom

Za pripravo 0,75 L agarja LB (angl. Luria-Bertani) smo natehtali 7,5 g NaCl, 7,5 g triptofana, 3,75 g kvasnega ekstrakta in 15 g bakteriološkega agarja. Osnovo smo raztopili v 0,75 L destilirane vode in umerili pH na 7. Po sterilizaciji z avtoklavom smo gojišče ohladili na 50 °C in vmešali 3,75 mL prefiltriranega ampicilina s konc. 10 mg/mL. Na isti način smo pripravili tekoče LB gojišče z ampicilinom le, da v osnovo nismo dodali bakteriološkega agarja.

- gojišče SOC⁺

Za pripravo 1 L gojišča SOC⁺ (angl. Super Optimal broth with Catabolite repression) smo natehtali 20 g triptona, 5 g kvasnega ekstrakta, 0,5 g NaCl in 0,19 g KCl. Nato smo dodali 950 mL destilirane vode in umerili pH na 7. Po avtoklaviranju smo mešanici dodali še 5 mL sterilne 2 M raztopine MgCl, 18 mL sterilne 20 % glukoze in sterilne destilirane vode do oznake 1 L.

3.2.4 Pufri in raztopine

- Fiziološka raztopina

Za pripravo 1 L fizološke raztopine smo natehtali 80 g NaCl, 2 g KCl, 7,4 g Na₂HPO₄ x H₂O in 2,4 g KH₂PO₄. Osnovo smo raztopili v 1 L destilirane vode in umerili pH na 7,4. Po sterilizaciji z avtoklavom smo fiziološko raztopino shranili v hladilnik.

- 50 x pufer TAE

Za pripravo 1 L 50 x pufer TAE (angl. Tris-acetate-EDTA buffer) smo natehtali 242 g Tris baze in 37,2 g Na₂EDTA x 2H₂O. Nato smo dodali še 57,1 mL ocetne kisline in destilirano vodo do oznake 1 L. Po 15 minutni sterilizaciji pri 121 °C z avtoklavom smo ohlajen pufer shranili v hladilnik.

- 10 x pufer TBE

Za pripravo 1 L 10 x pufra TBE (angl. Tris-borate-EDTA buffer) smo natehtali 102 g Tris baze, 55,0 g borove kisline in 7,4 g EDTA. Nato smo dodali še destilirano vodo do oznake 1 L in avtoklavirali.

- 1,0 M EDTA (pH 8,0)

V približno 90 mL destilirane vode smo ob starnem mešanju raztopili 37,22 g EDTA in umerili pH na 8,0. Nato smo mešanico dopolnili z destilirano vodo do oznake 100 mL in jo sterilizirali v avtoklavu. Po istem principu smo pripravili še 0,5 M (pH 9,0), 50 mM (pH 9,0) in 50 mM (pH 7,5) EDTA.

- 1 M TRIZMA baze (pH 8,0)

V 20 mL destilirane vode smo ob stalnem mešanju raztopili 2,42 g TRIZMA baze. S pomočjo koncentriranega HCl smo uravnali pH na 8,0 in mešanico avtoklavirali.

- 20 % Na-lauril-sarkozin

V 5 mL destilirane vode smo raztopili 1 g trdnega reagenta Na-lauril-sarkozina in prefiltrirali skozi nitrozo-celulozni filter z velikostjo por 0,2 µm.

- CPESa (pH 6,0)

V 0,5 L destilirane vode smo ob stalnem mešanju raztopili 12,3 g citronske kisline, 21,4 g Na₂HPO₄ in 219 g sorbitola. Sterilnost smo dosegli z avtoklaviranjem.

- CPEa (pH 6,0)

V 1 L destilirane vode smo ob stalnem mešanju raztopili 24,5 g citronske kisline in 42,7 g Na₂HPO₄. Sterilnost smo dosegli z avtoklaviranjem.

- Raztopina 3

Zmešali smo 90 mL 0,5 M EDTA (pH 9), 1,0 mL 1 M TRIZMA baze (pH 8), 5,0 mL 20 % Na-lauril-sarkozina in 4,0 mL sterilne destilirane vode.

- 0,1 M raztopina IPTG

Zatehtali smo 1,2 g IPTG in dodali destilirano vodo do oznake 50 mL ter prefiltrirali skozi filter z 0,2 µm porami in shranili v hladilnik.

- X-Gal raztopina

V 2 mL N,N'-dimetil-formamid smo raztopili 100 mg X-Gal. Falkonko smo pokrili z alu-folio in shranili pri -20 °C.

3.2.5 Reagenti

Uporabljeni reagenti:

- izopropanol, 70 % etanol, dithiotreitol
- PCR pufri, restrikcijski pufri (Thermo Scientific, NEB, Fermentas)
- DMSO (Roche)
- MgCl₂ (Promega)
- dNTP, dATP (Roche)
- voda za PCR (Sigma), destilirana voda (Millipore)
- agarosa (Sigma), Pulsed Field Certified agarosa, LMP agarosa (BioRad)
- 6 x nanašalni pufer (Thermo Scientific)
- GeneRuler™ 100 bp DNA lestvica, GeneRuler™ Mix (Thermo Scientific)

- etidijev bromid, SYBR® Safe DNA Gel Strain (Thermo Scientific)
- Rnase Away® Reagent (Thermo Scientific)
- PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Scientific)
- CHEF DNA Size Marker - *S. cerevisiae* (BioRad).

3.2.6 Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje

Preglednica 2: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov

začetni oligonukleotid	nukleotidno zaporedje (5`-3`)
YTEF-1G	GGT AAG GGT TCT TTC AGT ACG CTT GGG
YTEF-6G	CGT TCT TGG AGT CAC CAC AGA CGT TAC CTC
NL-1	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG
NL-4	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
M13	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M14	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G
M13-FAM	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
O-(CTC) ₂₁ -ch4-F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATC TTC TTG TCG AAC TAA CGG C
O-(CTC) ₂₁ -ch4-R	GAG ACC GGA GAA AAC TCA GAA A
O-(GAC) ₆ -ch7-F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCG ACA CAG AAC TGA AAC TTG A
O-(GAC) ₆ -ch7-R	GTA CAT CAC CAC ATC CTC CTT G
O-(AG) ₆ -ch5-F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCG AGC CTA TCA CTT ACT TGC T
O-(AG) ₆ -ch5-R	AAT TCC TCA TCC TGC ACA ATC T
O-(GAA) ₇ -ch2-F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCA GAA AGT TAG CTC TGG CAA T
O-(GAA) ₇ -ch2-R	ACA CGT TCG TCT TCA ATT CCT T

3.2.7 Encimi in komercialni kompleti

Uporabljeni encimi:

- *Taq* polimeraza DNA (Promega)
- *Pfu* polimeraza DNA (Promega)
- restrikcijski encimi: *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI* (Thermo Scientific, NEB)
- eksonukleaza I (NEB)
- raka alkalna fosfataza (Fermentas)
- FastStart mešanica encimov, FastStart High Fidelity Enzyme Blend (Roche).

Uporabljeni komercialni kompleti:

- MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
- pGEM[®] - T Easy Vector System I (Promega)
- Rneasy Mini Kit (QIAGEN)
- SuperScript[®] VILOTM cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific).

3.3 METODE DELA

3.3.1 Izolacija in identifikacija kvasovk iz sedimenta oljčnega olja

3.3.1.1 Izolacija kvasovk

Dva vzorca sedimenta oljčnega olja smo redčili tako, da smo prenesli 1 mL izvorne vsebine v epruveto z 9 mL fiziološke raztopine, homogenizirali in postopek ponavljali do redčitve 10^{-5} . S pipeto smo nato 3 x prenesli po 0,1 mL posamezne redčitve na petrijeve plošče z YPD agarjem s kloramfenikolom (zavira rast bakterij), razmazali po celiem gojišču in inkubirali 4 dni pri 28 °C. Po 4 dneh smo plošče pregledali in precepili kolonije, ki so se razlikovale po morfologiji, do čistih kultur ter jih ustreznno označili s številko izolata.

3.3.1.2 Izolacija genomske DNA

DNA smo izolirali s pomočjo kompleta MasterPure Yeast DNA Purification Kit. V epico smo dodali 300 µL »Yeast Cell Lysis Solution« in 1 µL RNaze A (5 µg/µL). S pomočjo cepilne zanke smo v mešanico prenesli eno kolonijo iz YPD gojišča in resuspendirali celice na vibracijskem mešalniku. Nato je sledila 15 min inkubacija v termobloku pri 65 °C in 5 min na ledu. Za precipitacijo proteinov smo dodali 150 µL »MPC Protein Precipitation Reagent« in mešali z vibracijskim mešalnikom 10 s. Ostanke celic smo odcentrifugirali 10 min pri 10.000 obr/min in prenesli supernatant v svežo epico, ki smo ji dodali 500 µL izopropanola. Vsebino epice smo premešali z obračanjem epice in centrifugirali DNA 10 min pri 10.000 obr/min. Supernatant smo zavrgli, pelet pa sprali z 0,6 mL 70 % etanola in ga na kratko centrifugirali. Ponovno smo pazljivo odstranili etanol in pelet (DNA) resuspendirali v 35 µL pufra TE.

3.3.1.3 Pomnoževanje DNA

Predhodno izolirano genomsko DNA izolatov smo pomnožili z metodo PCR. Z začetnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4 smo pomnožili regijo ITS, z začetnima oligonukleotidoma NL-1 in NL-4 pa domeno D1/D2 26S podenote rDNA. PCR mešanica je vsebovala 6 µL PCR pufra, 2,4 µL MgCl₂, 2,4 µL dNTP, 1,5 µL vodilnega oligonukleotida, 1,5 µL povratnega oligonukleotida, 13,1 µL PCR vode, 0,1 µL *Taq* polimeraze in 3 µL DNA. Kadar pri PCR reakciji nismo dobili pomnožka PCR, zaradi

prisotnosti morebitnih inhibitorjev reakcije, smo si pomagali z uporabo FastStart mešanice encimov (Roche). Takrat je bila mešanica sestavljena iz 2 µL PCR pufra z 18 mM MgCl₂, 1,5 µL DMSO, 0,4 µL dNTP, 0,9 µL vodilnega oligonukleotida, 0,9 µL povratnega oligonukleotida, 12,3 µL PCR vode, 0,5 µL FastStart mešanice encimov in 2 µL DNA. Pripravljene PCR mešanice smo inkubirali v napravi za PCR po različnih programih glede na regijo katero smo žeeli pomnožiti. Program za pomnoževanje regije ITS (levo) in domene D1/D2 26S podenote rDNA (desno).

<u>95,0 °C – 5,0 min</u>	<u>95,0 °C – 5,0 min</u>
95,0 °C – 0,5 min	95,0 °C – 0,5 min
55,5 °C – 0,5 min - 30 x	53,7 °C – 0,5 min - 35 x
<u>72,0 °C – 1,0 min</u>	<u>72,0 °C – 1,0 min</u>
<u>72,0 °C – 7,0 min</u>	<u>72,0 °C – 7,0 min</u>
4,0 °C – ∞	4,0 °C – ∞

3.3.1.4 Gelska elektroforeza

Z gelsko elektroforezo smo preverili prisotnost in velikost pomnožkov PCR. Natehtali smo ustrezeno količino agaroze in jo raztopili v 90 mL (gel srednje velikosti) ali 180 mL (gel večje velikosti) 1 x pufra TAE. Pred razlitjem mešanice v nosilec z glavnico, smo ji dodali ustrezen volumen SYBR® Safe barvila. Tako smo pripravili 1,5 % agarozni gel in ga postavili v elektroforezno banjico. Pred nanosom pomnožkov PCR smo 5 µL pomnožka zmešali z 2 µL 6 x nanašalnega pufra. V prvo luknjico smo nanesli 3 µL velikostnega standarda, v ostale pa 5 µL posameznega pomnožka PCR. Elektroforeza je potekala v 1 x pufru TAE 30 minut pri napetosti 120 V ali 180 V. Po končani elektroforezi smo gele fotografirali pod UV svetlobo.

3.3.1.5 Čiščenje pomnožkov PCR skozi kolone

Pomnožke PCR smo čistili s pomočjo kompleta za čiščenje pomnožkov PCR, High Pure PCR Product Purification Kit. Zmešali smo 15 µL pomnožka PCR in 75 µL vezavnega pufra (angl. binding buffer) ter mešanico nanesli v kolono s filtrom, ki je priložena kompletu. Dobro vezavo DNA na filter smo dosegli s centrifugirjanje pri 13.500 x g 1 min. Filtrat smo zavrgli in v kolono nanesli najprej 500 µL in nato še 200 µL spiralnega pufra (angl. washing buffer). Med obema korakoma spiranja smo kolone centrifugirali pri 13.000 x g 1 min in zavrgli filtrat. Nato smo kolono prenesli v novo epico, ji dodali 30 µL elucijskega pufra (angl. elution buffer) in pustili 1 min na delovnem pultu. Po centrifugirjanju pri 13.000 x g 1 min smo kolone zavrgli in očiščene pomnožke PCR regije ITS shranili pri -20 °C. K 5 µL očiščenim pomnožkom PCR domene D1/D2 smo dodali 5 µL začetnih oligonukleotidov (NL-1 in NL-4) in jih poslali sekvencirati v podjetje Macrogen (Nizozemska).

3.3.1.6 Restrikcija regije ITS

Pomnožke regije ITS smo rezali s tremi restriktijskimi encimi: *CfoI*, *HaeIII* in *HinfI*. Restriktijska mešanica je bila sestavljena iz 5,0 µL pomnožka PCR, 1,0 µL restriktijskega pufra, 0,2 µL restriktijskega encima in 3,8 µL PCR vode. Po tri uri inkubaciji na 37 °C, smo restriktijske produkte preverili na 2,5 % agaroznem gelu.

3.3.1.7 Obdelava elektroforetskih slik in nukleotidnih zaporedij

Slike gelov smo analizirali s programom BioNumerics 7.5. V program smo najprej uvozili slike gelov, katere smo normalizirali na podlagi 100 bp lestvice, določili lise in jih povezali z ustrezno številko izolata. Posamezne restriktijske profile smo primerjali z restriktijskimi profili v podatkovni bazi s koeficientom Dice in s pomočjo metode UPMGA izrisali dendrograme. Toleranca zamika med lisami je bila 1 %. Nukleotidna zaporedja domene D1/D2 smo vnesli v algoritem BLAST in preverili zadetke.

3.3.2 Molekularno kloniranje gena za EF-1 α

3.3.2.1 Oživitev kultur in izolacija genomske DNA

S cepilno zanko smo v aseptičnih pogojih prenesli 18 shranjenih sevov kvasovk rodu *Ogataea* iz krionepruvete na agar YPD. Plošče smo inkubirali v inkubatorju 3 dni pri 28 °C. DNA smo izolirali po že opisanem postopku s pomočjo kompleta MasterPure Yeast DNA Purification Kit.

3.3.2.2 Pomnoževanje gena za EF-1 α

Regijo gena za EF-1 α smo pomnožili s polimerazo *Pfu* in z začetnima oligonukleotidoma YTEF-1G in YTEF-6G. PCR mešanica je vsebovala 2,0 µL PCR pufra z MgSO₄, 1,8 µL dNTP, 1,2 µL vodilnega oligonukleotida, 1,2 µL povratnega oligonukleotida, 11,7 µL PCR vode, 0,1 µL *Pfu* polimeraze in 2,0 µL DNA. Kadar pri reakciji PCR nismo dobili pomnožka PCR, smo si pomagali z uporabo FastStart mešanice encimov. Pripravljene PCR mešanice smo inkubirali v napravi za PCR po naslednjem programu:

94,0 °C – 2,0 min

94,0 °C – 0,5 min

56,0 °C – 0,5 min - 30 x

72,0 °C – 2,0 min

72,0 °C – 7,0 min

4,0 °C – ∞

3.3.2.3 Gelska elektroforeza in čiščenje pomnožkov PCR

Prisotnost pomnožkov PCR smo preverjali na 1,5 % agaroznem gelu. Pomnožke PCR smo očistili skozi kolone s pomočjo kompleta za čiščenje pomnožkov PCR.

3.3.2.4 Poliadenilacija pomnožkov PCR

Ker smo gen za EF-1 α pomnožili s polimerazo *Pfu*, ki ustvarja fragmente s topimi konci, smo morali pomnožke PCR modificirati tako, da smo na vsak 3' konec DNA vezali več adeninov. K 5 μ L pomnožka PCR smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 2 μ L PCR pufera, 0,8 μ L MgCl₂, 1 μ L *Taq* polimeraze, 0,02 μ L dATP (konc. 25 mM) in 1,2 μ L PCR vode. Vse skupaj smo na kratko centrifugirali in inkubirali 30 min pri 70 °C.

3.3.2.5 Ligacija

Pripravljeno ligacijsko mešanico (Preglednica 3) smo na kratko centrifugirali in inkubirali čez noč pri 4 °C, da bi pridobili večje število transformant.

Preglednica 3: Sestava mešanice za ligacijo

reagent	količina za 1 reakcijo (μ L)
2 x ligacijski pufer	2,5
pGEM® - T Easy vektor (50 ng)	0,5
pomnožek PCR	1,5
T4 DNA ligaza	0,5

3.3.2.6 Transformacija in selekcija

Ligacijsko mešanico smo na kratko centrifugirali in prenesli 2 μ L ligacijske mešanice k 50 μ L nežno premešanih kompetentnih celic *E. coli* DH5 α . Po nežnem mešanju smo mešanico položili na led za 20 min. Nato je sledila 45-50 sekundna inkubacija pri 42 °C. Po 2 min inkubaciji celic na ledu, smo jim dodali 950 μ L SOC⁺ gojišča in inkubirali 1,5 ure pri 37 °C z mešanjem 300 rpm. Med inkubacijo smo pripravili 2 LB plošči z ampicilinom za vsako ligacijsko reakcijo, na katere smo razmazali 100 μ L 0,1 M IPTG, 100 μ L SOC⁺ gojišča in 100 μ L X-Gal. IPTG je induktor gena *lacZ* in spodbuja izražanje encima β-galaktozidaza. Po končani inkubaciji smo 100 μ L transformacijske mešanice nacepili na 2 LB plošči z ampicilinom in inkubirali čez noč pri 37 °C.

Naslednji dan smo izvršili selekcijo. Vse transformirane celice, ki so zrasle na selektivnem gojišču z ampicilinom, so sprejele plazmid na katerem je zapis za rezistenco na ampicilin. Ali so transformante vsebovale insert nam je pokazal modro-beli test. S pomočjo sterilnih zobrebcev smo v aseptičnih pogojih precepili 24 (60 pri ZIM 2463) belih kolonij posameznega seva v 1 mL tekočega gojišča LB z ampicilinom in jih inkubirali na 37 °C z

mešanjem 650 rpm preko noči. Bakterijske celice so se preko noči delile in s tem eksponentno povečale število kopij vstavljenega gena za EF-1 α .

3.3.2.7 Izolacija DNA klonov

DNA klonov smo izolirali s pomočjo PrepMan® Ultra reagenta. Prekonočno biomaso smo centrifugirali 10 min pri 3500 obr/min, odlili supernatant, pelet (celice) resuspendirali v 20 μ L PrepMan reagenta in vorteksirali. Sledila je 10 min inkubacija pri 100 °C in ponovno centrifugiranje 15 min pri 3500 obr/min. Po 2 μ L supernatanta smo uporabili za PCR reakcijo, ostali supernatant smo prenesli v novo PCR ploščo in ga shranili pri -20 °C.

3.3.2.8 Pomnoževanje DNA in gelska elektroforeza

Insert vstavljen v vektor pGEM®-T Easy smo pomnožili z uporabo *Taq* polimeraze in z začetnima oligonukleotidoma M13 in M14. Pripravljene PCR mešanice smo inkubirali v napravi za PCR po naslednjem programu:

95,0 °C – 5,0 min
95,0 °C – 30 s
60,0 °C – 30 s – 25 x
72,0 °C – 80 s
4,0 °C – ∞

Prisotnost pomnožkov PCR smo preverili na 1,5 % agroznem gelu.

3.3.2.9 Encimsko čiščenje pomnožkov PCR

12 (45 pri ZIM 2463) pomnožkov PCR velikosti 1000-1100 bp, ki so vsebovali insert, smo encimsko čistili z mešanico ExoISAP, ki smo jo pripravili iz 150 μ L alkalne fosfataze, 30 μ L 10 x SAP defosforilacijskega pufra in 7,5 μ L eksonukleaze I. Nato smo zmešali 3,7 μ L pomnožka PCR in 1,3 μ L mešanice ExoISAP ter na kratko centrifugirali. Encimsko čiščenje je potekalo v PCR napravi v treh korakih: degradacija nevezanih dNTP in začetnih oligonukleotidov je potekala pri 37 °C 45 min, inaktivacija encimov pri 80 °C 20 min in ohlajanje reakcije pri 4 °C. Po končanem programu čiščenja smo pomnožkom PCR dodali še 5 μ L univerzalnih začetnih oligonukleotidov M13 in M14 ter jih poslali sekvencirati v Macrogen (Nizozemska).

3.3.2.10 Obdelava podatkov

Nukleotidna zaporedja gena za EF-1 α smo uvozili v program BioNumerics 7.5. Za računalniško analizo smo uporabili le nukleotidno zaporedje od začetka oligonukleotida YTEF-1G in konca oligonukleotida YTEF-6G. Nato smo preverili, če je nukleotidno

zaporedjem kvalitetno. Nukleotidna zaporedja z delnimi pomnožki EF-1 α smo odstranili iz baze. Prav tako smo ročno popravljali posamezna neskladja nukleotidov glede na kromatograme nukleotidnega zaporedja. Nukleotidna zaporedja smo prepisali tudi v aminokislinska zaporedja z istim bralnim okvirjem. Genetsko sorodnost nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja med vsemi sevi znotraj iste vrste smo prikazali z minimalno vpetim drevesom (angl. Minimal Spanning Tree). Prav tako smo izrisali minimalno vpeto drevo na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α vseh treh vrst skupaj. V naslednjem koraku smo vsako nukleotidno variantno kopijo gena za EF-1 α znotraj iste vrste označili s svojo številko alela in izrisali krožne diagrame glede na lokacijo izvora sevov.

3.3.3 Molekularno kloniranje cDNA gena za EF-1 α

3.3.3.1 Izolacija mRNA

Pred začetkom dela smo vse delovne pulte in pipete obrisali z Rnase Away[®] reagentom ter si nadeli rokavice. Po priporočilih proizvajalca kompleta Rneasy Mini Kit smo zadovoljili optimalno število celic (ne več kot 2×10^7 celic) z merjenjem OD (OD 0,5-1) suspenzije posameznih tipskih sevov (ZIM 2463, ZIM 2481, ZIM 2322). 1 mL suspenzije celic smo centrifugirali pri $1000 \times g$ 5 min pri $4^\circ C$ in odlili supernatant. Centrifugo smo za poznejšo uporabo segreli na $20-25^\circ C$. Celice smo resuspendirali v $600 \mu\text{L}$ pufra RLT in dodali steklene kroglice. Vse skupaj smo vorteksirali in centrifugirali 5 min pri najvišji hitrosti v homogenizatorju s hlajenjem, dokler celice niso bile popolnoma zdrobljene. Lizat smo prenesli v novo epico in centrifugirali 2 min pri najvišji hitrosti. Supernatantu, katerega smo prenesli v novo epico, smo dodali enak volumen 70 % etanola in dobro premešali. Vzorec smo prenesli na Rneasy kolono in centrifugirali 15 s pri $\geq 8000 \times g$ ter odlili ostank. Nato smo dodali $350 \mu\text{L}$ pufra RW1 in ponovno centrifugirali. V vsako kolono smo nato dodali $80 \mu\text{L}$ inkubacijske mešanice DNAze I, ki smo jo pripravili iz $40 \mu\text{L}$ DNAze I in $280 \mu\text{L}$ RDD pufra, ter jih pustili 15 min na delovnem pultu. Na kolono smo nato najprej dodali $350 \mu\text{L}$ pufra RW1 in nato še 2 x po $500 \mu\text{L}$ pufra RPE. Po prvem in drugem koraku spiranja je sledilo 15 s centrifugiranje, po tretjem koraku pa 2 min centrifugiranje pri $\geq 8000 \times g$. Kolono smo nato najprej prenesli v novo 2 mL zbiralno epico in centrifugirali pri najvišji hitrosti 1 min, nato pa še v novo 1,5 mL epico. Po dodatku $30 \mu\text{L}$ RNase-proste vode in centrifugiranju 1 min, smo kolone zavrgli in izmerili koncentracijo mRNA s spektrofotometrom, ki nam jo je podala vrednost A260 (UV absorbanca pri 260 nm).

3.3.3.2 Reverzna transkripcija

S pomočjo kompleta SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis smo prepisali enoverižno mRNA v komplementarno DNA (cDNA). Pri sestavi mešanice (Preglednica 4) smo morali biti pozorni, da koncentracija mRNA ni presegala $2,5 \mu\text{g}$ v $20 \mu\text{L}$ reakciji. Inkubacija je potekala v napravi za PCR v 3 korakih: 10 min na $25^\circ C$ (prilagajanje začetnih

oligonukleotidov), 60 min na 42 °C (reverzna transkripcija s transkriptazo) in 5 min na 85 °C (prekinitev reakcije). Vsi nadaljnji postopki so bili isti kot pri molekularnem kloniranju genomske DNA, zapisani pod točkami od 3.3.2.2 do 3.3.2.10.

Preglednica 4: Sestava mešanice za sintezo cDNA

reagent	količina za 1 reakcijo (μ L)
5 x VILO Reaction mix	4,0
10 x SuperScript Enzyme mix	2,0
mRNA	14,0

3.3.4 PFGE analiza kromosomske DNA

3.3.4.1 Izolacija kromosomske DNA

K 1 mL sterilne destilirane vode smo v aseptičnih pogojih dodali pol cepilne zanke biomase celic čiste, 2-3 dni stare kulture, dobro homogenizirali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali pri 4000 rpm 5 min. Supernatant, v katerem so bili ostanki gojišča, smo odlili in celice resuspendirali v 1 mL 50 mM EDTA (pH 7,5) ter ponovno centrifugirali. V posebni centrifugirki smo zmešali 1mL CPESa, 1 mL 1 M EDTA (pH 8,0) in zrno dithiotreitol. Pripravljeno raztopino smo dodali po 40 μ L k vsaki biomasi ter vse skupaj homogenizirali na vibracijskem mešalniku. V 4,1 mL sterilne destilirane vode smo raztopili 55 mg LPM agaroze, jo inkubirali pri 42 °C in ji dodali 16 mg litičnega encima Novozym-a 234. K predhodno obdelani biomasi smo dodali 85 μ L raztopine agarosa/Novozym in inkubirali pri 42 °C, da smo preprečili strjevanje agaroze. Vsebino posamezne centrifugirke smo s pipeto 3 x premešali in napolnili 2 blokca. Model za pripravo blokcev smo predhodno sprali z etanolom in ga dobro osušili v brezprašni komori. Model z blokci smo postavili v hladilnik za 20 min in tako pospešili strjevanje blokcev. Po dva strjena blokca z isto biomaso smo prenesli v 15 mL mikrocentrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 2 mL CPE pufra, ki smo ga pripravili iz 20 mL CPEa in 20 mL 1 M EDTA (pH 8,0). Po 1 urni inkubaciji blokcev pri 30 °C, smo odstranili CPE pufer in blokce spirali 3 x po 15 minut s 50 mM EDTA (pH 9,0). Nato smo dodali 1 mL raztopine 3 s proteinazo K, ki smo jo pripravimo tako, da smo zmešali 37 mL raztopine 3 in 25 mg proteinaze K. Blokce smo ob rahlem mešanju inkubirali preko noči pri 50 °C in naslednji dan raztopino z encimom zamenjali s 50 mM EDTA (pH 9,0). Po 1 urni inkubaciji smo raztopino 50 mM EDTA (pH 9,0) zamenjali z 0,5 M EDTA (pH 9,0) in blokce shranili v hladilnik.

3.3.4.2 PFGE

Natehtali smo 0,75 g agaroze za elektroforezo v pulzirajočem polju ter ji dodali 7,5 mL 5 x pufra TBE in 67,5 mL sterilne destilirane vode. Mešanico smo raztopili v mikrovalovni pečici in jo po ohladitvi na 60 °C razlili v plastični okvir za vlivanje gela z glavničkom. V jamice smo nato prenesli rezine, ki smo jih odrezali od blokcev s krovnim stekelcem. V prvo jamico smo nanesli rezino velikostnega standarda - *S. cerevisiae*, v naslednje pa rezine blokcev z izolirano kromosomsko DNA naših vzorcev. Jamice smo zalili z gelom, ki smo ga pripravili tako, da smo v 10 mL sterilne destilirane vode raztopili 0,1 g LMP agaroze. V elektroforezno komoro smo nalili 3 L 0,5 x pufra TBE in ga ohladili na temperaturo 10 °C. Nosilni gel smo postavili v elektroforezno banjico in nastavili potrebne nastavitev. Elektroforeza je potekala pri napetosti 3 V/cm, z začetnim pulznim časom 200-300 sekund 36 ur (ločevanje malih fragmentov) in končnim pulznim časom 300-600 sekund 60 ur (ločevanje velikih fragmentov). Po končani elektroforezi smo agarozni gel barvali 10 min v raztopini etidijevega bromida s konc. 0,5 µg/mL. Gel smo nato razbarvali v sterilni destilirani vodi 20 min in ga fotografirali pod UV svetlogo.

3.3.4.3 Obdelava podatkov kromosomske DNA

Slike elektroforetskih gelov smo uvozili v program BioNumerics 7.5. Za medsebojno primerjavo pulzotipov smo uporabili koeficient Dice in metodo UPMGA za risanje dendrogramov. Toleranca zamika med progami je bila 1 %.

3.3.5 Analiza mikrosatelitnih lokusov

3.3.5.1 Pomnoževanje DNA in gelska elektroforeza

Pri pomnoževanju odsekov DNA, na katerih se nahajajo različni mikrosatelitni lokusi, smo uporabili metodo PCR s fluorescentno označenim univerzalnim začetnim oligonukleotidom imenovano »Poor man PCR« (Schuelke, 2000). DNA smo pomnožili s pomočjo *Taq* polimeraze in z uporabo začetnih oligonukleotidov O-(CTC)₂₁-F, O-(CTC)₂₁-R, O-(GAC)₆-F, O-(GAC)₆-R, O-(AG)₆-F, O-(AG)₆-R, O-(GAA)₇-F, O-(GAA)₇-R ter univerzalnega začetnega oligonukleotida FAM. PCR mešanica je vsebovala 4,0 µL PCR pufra, 1,6 µL MgCl₂, 1,6 µL dNTP, 0,4 µL vodilnega oligonukleotida, 1,6 µL povratnega oligonukleotida, 1,6 µL označenega univerzalnega začetnega oligonukleotida FAM, 7,1 µL PCR vode, 0,1 µL *Taq* polimeraze in 2,0 µL DNA. Kadar pri PCR reakciji nismo dobili pomnožkov PCR, smo si pomagali z uporabo FastStart encima. Takrat je bila mešanica sestavljena iz 2,0 µL PCR pufra z 18 mM MgCl₂, 1,5 µL DMSO, 0,4 µL dNTP, 0,4 µL vodilnega oligonukleotida, 1,6 µL povratnega oligonukleotida, 1,6 µL označenega univerzalnega začetnega oligonukleotida FAM, 8,0 µL PCR vode, 0,5 µL FastStart

mešanice encimov in 2,0 µL DNA. Pripravljene PCR mešanice smo inkubirali v napravi za PCR po naslednjem programu:

94,0 °C – 5,0 min
94,0 °C – 30 s
56,0 °C – 45 s – 30 x
72,0 °C – 45 s
94,0 °C – 30 s
53,0 °C – 45 s – 8 x
72,0 °C – 45 s
72,0 °C – 10,0 min
4,0 °C – ∞

Pomnožke mikrosatelitnih lokusov smo preverili na 2,5 % agroznem gelu, jih encimsko očistili z mešanico ExoISAP in jih poslali na kapilarno elektroforezo v podjetje Macrogen (Južna Koreja).

3.3.5.2 Obdelava podatkov mikrosatelitov

V programu BioNumerics 7.1. smo elektroferograme povezali z ustreznim zaporedjem mikrosatelita. Podatke smo obdelali z metodo MLVA (hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev), ki nam je podala spremenljivo število tandemskih ponovitev mikrosatelita oz. VNTR.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA KVASOVK IZ OLJČNEGA OLJA

Obdelali smo dva vzorca oljčnega olja, ki sta bila od leta 2013 in 2014 shranjena v hladilniku. V obeh primerih smo imeli sediment oljčnega olja mešanih sort. V vzorcih smo želeli preveriti prisotnost kvasovk rodu *Ogataea* in morebitne nove izolirane seve uporabiti pri nadaljnjih analizah.



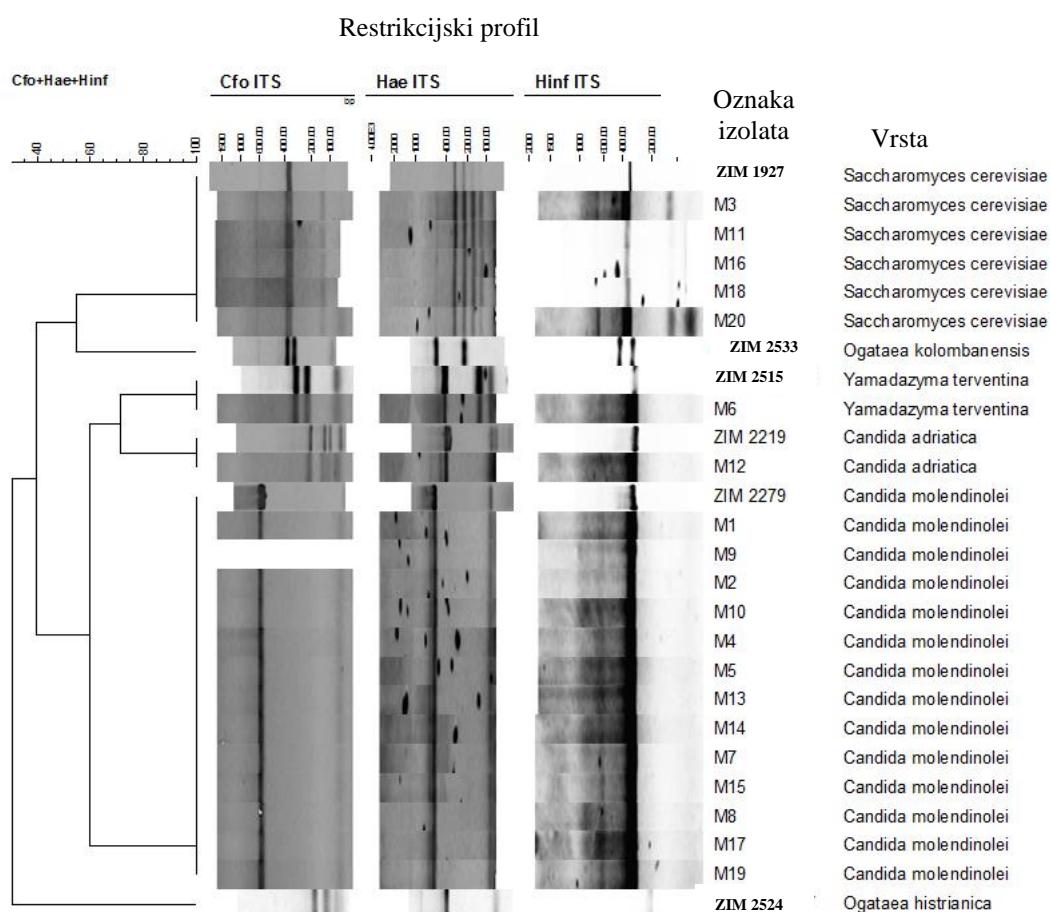
Slika 3: Gojišče YPD z nacepljenim sedimentom oljčnega olja pridobljenega v letu 2014, redčitev 10^{-3}



Slika 4: Gojišče YPD z nacepljenim sedimentom oljčnega olja pridobljenega v letu 2013, redčitev 10^{-1}

Ob pregledu plošč smo na gojišču YPD z nacepljenim sedimentom oljčnega olja pridobljenega v letu 2013 med seboj ločili šest različnih tipov morfologije kolonij in jih označili z oznakami M11, M16, M17, M18, M19 in M20. Koncentracija kvasovk je znašala $6,7 \times 10^2$ CFU/mL. Na gojišču YPD z nacepljenim sedimentom oljčnega olja pridobljenega v letu 2014, smo med seboj ločili 14 različnih tipov morfologije kolonij in jih označili z oznakami M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M14

in M15. Koncentracija kvasovk je znašala $4,2 \times 10^5$ CFU/mL. Pomnožki PCR regije ITS vseh izolatov so bili velikosti 600-700 bp, razen pri izolatih M3, M11, M16, M18 in M20, kjer so bili pomnožki PCR velikosti 800-900 bp. Nato smo restriktijske profile vseh izolatov primerjali s restriktijskimi profili izbranih kvasovk iz podatkovne baze (Slika 5).



Slika 5: Dendrogram sorodnosti sevov izrisan glede na restriktijski profil rezanja z *CfoI*, *HaeIII* in *Hinfl* s prikazom pripadajočih oznak izolatov in identificirane vrste

S pomočjo dendrograma sorodnosti sevov smo predvideli, da so izolati z oznako M3, M11, M16, M18 in M20 *Saccharomyces cerevisiae* in izolati z oznako M1, M2, M4, M5, M9, M10, M13, M14 in M19 *Candida molandinolei*. Izolat z oznako M12 je *Candida adriatica* in izolat z oznako M6 *Yamadazyma terventina*. Pri izolatih z oznako M3, M11, M12, M16 in M18 smo njihovo identiteto še dodatno preverili s sekvenciranjem pomnožkov PCR domene D1/D2. Zadetki analize nukleotidnega zaporedja so sovpadali z rezultati restrikcije. Ker kvasovk rodu *Ogataea* v naših vzorcih nismo uspeli izolirati, smo delo nadaljevali z 18-imi sevi kvasovk rodu *Ogataea* shranjenih v zbirkki ZIM.

4.2 MOLEKULARNO KLONIRANJE

4.2.1 Določitev števila variant genov za EF-1 α sevov rodu *Ogataea*

Število variant gena za EF-1 α smo določili v 13-ih sevih vrste *Ogataea histrianaica*, štirih sevih vrste *Ogataea kolombanensis* in v enem sevu vrste *Ogataea deakii*. Z metodo PCR smo pomnožili gen za EF-1 α in ga po molekularnem kloniranju v kompetentne celice *Escherichia coli* sekvencirali. Za vsak sev smo sekvencirali 12 klonov. Pridobljena nukleotidna zaporedja EF-1 α (823 bp) smo računalniško obdelali v programu BioNumerics 7.5. Po računalniški in ročni obdelavi nukleotidnega zaporedja ter njihovi translaciji, smo izrisali minimalna vpeta drevesa na podlagi nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja. Vsa nukleotidna in aminokislinska zaporedja istega seva smo označili z isto barvo. Tako smo dobili vpogled kako so si variante kopij gena za EF-1 α enega seva podobne/različne z variantami kopij gena za EF-1 α ostalih sevov znotraj iste vrste.

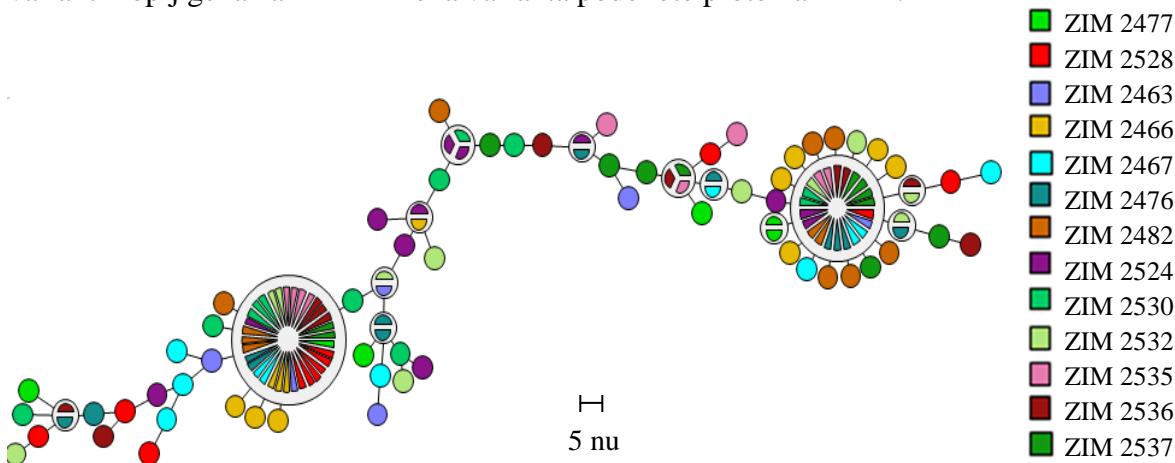
Po neposrednjem sekvenciranju pomnožkov PCR iste vrste smo opazili, da se na kromatogramu pojavljajo dvojni vrhovi na istih mestih znotraj nukleotidnega zaporedja. Sklepamo, da je dvomljivo poimenovanje baz na tretjem mestu kodona posledica mutacij, kar nakazuje, da EF-1 α ni primeren označevalec za filogenetske študije.

Vrsta *O. histrianaica* ima 13 predstavnikov in sicer sev ZIM 2477, ZIM 2528, ZIM 2463, ZIM 2466, ZIM 2467, ZIM 2476, ZIM 2482, ZIM 2524, ZIM 2530, ZIM 2532, ZIM 2535, ZIM 2536 in ZIM 2537. Število analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α in oblik podenote EF-1 α za posamezni sev vrste *O. histrianaica* predstavlja preglednica 5. Preglednica 5 predstavlja tudi število variabilnih nukleotidov glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α in število variabilnih aminokislin glede na 274 aminokislin dolgo zaporedje EF-1 α .

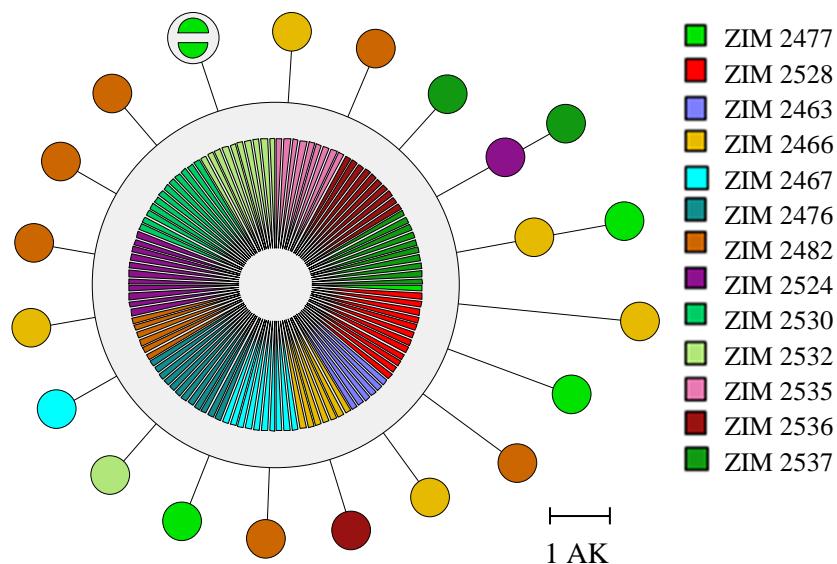
Preglednica 5: Prikaz števila analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α , oblik podenote EF-1 α in števila variabilnih nukleotidov/aminokislin za posamezni sev vrste *O. histriana*

sev	št. zaporedij gena za EF-1 α	št. variant kopij gena za EF-1 α	št. variabilnih nukleotidov	št. oblik podenote EF-1 α	št. variabilnih aminokislin
ZIM 2467	11	9	29	2	1
ZIM 2466	12	10	43	6	8
ZIM 2463	6	6	28	1	0
ZIM 2476	12	9	29	1	0
ZIM 2477	6	5	37	5	6
ZIM 2482	12	9	36	1	0
ZIM 2524	12	10	29	2	1
ZIM 2528	12	7	29	1	0
ZIM 2530	12	9	28	1	0
ZIM 2532	11	10	29	2	1
ZIM 2535	9	5	26	1	0
ZIM 2536	11	8	29	2	1
ZIM 2537	12	8	31	3	2

Na podlagi vseh rezultatov nuklotidnega zaporedja gena za EF-1 α , smo znotraj vrste *O. histriana* dokazali prisotnost 72 variant kopij gena za EF-1 α (Slika 6), ki se prepišejo v 22 variant podenote proteina EF-1 α (Slika 7). Pri *O. histriana* močno prevladujeta dve varianti kopij gena za EF-1 α in ena varianta podenote proteina EF-1 α .



Slika 6: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α , ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α znotraj vrste *O. histriana*. Vsak krog predstavlja varianto kopije gena za EF-1 α , velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto kopije gena za EF-1 α . Dolžina merila na sliki predstavlja spremembo v petih nukleotidih (nu) glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α .



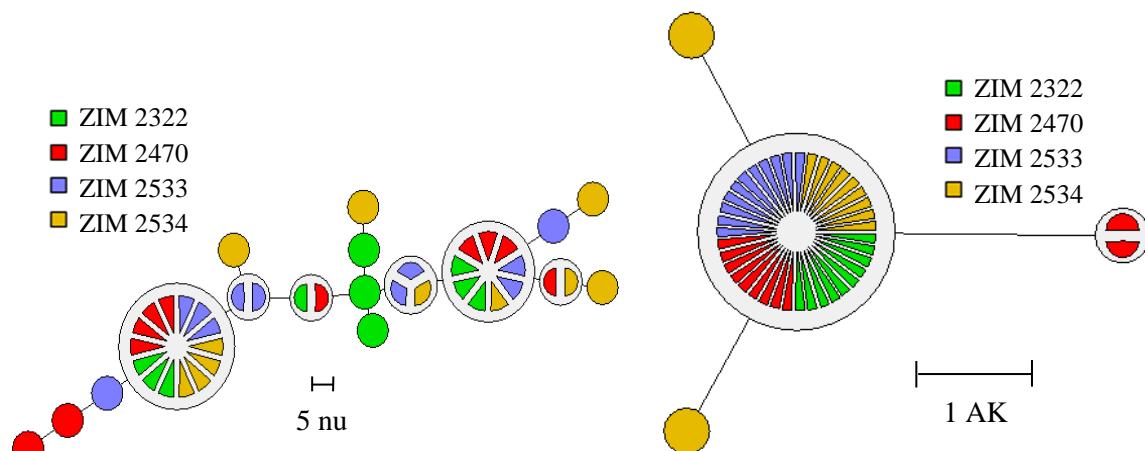
Slika 7: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi aminokislinskega zaporedja EF-1 α , ki prikazuje variante podenot proteina EF-1 α znotraj vrste *O. histriana*. Vsak krog predstavlja varianto podenote EF-1 α , velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto podenote. Dolžina merila na sliki predstavlja spremembo v eni aminokislini (AK) glede na 274 aminokislin dolgo zaporedje EF-1 α .

Vrsta *O. kolombanensis* ima štiri predstavnike, in sicer sev ZIM 2322, ZIM 2470, ZIM 2533 in ZIM 2534. Število analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α in oblik podenote EF-1 α za posamezni sev vrste *O. kolombanensis* predstavlja preglednica 6. Preglednica 6 predstavlja tudi število variabilnih nukleotidov glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α in število variabilnih aminokislin glede na 274 aminokislin dolgo zaporedje EF-1 α .

Preglednica 6: Prikaz števila analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α , oblik podenote EF-1 α in števila variabilnih nukleotidov/aminokislin za posamezni sev vrste *O. kolombanensis*

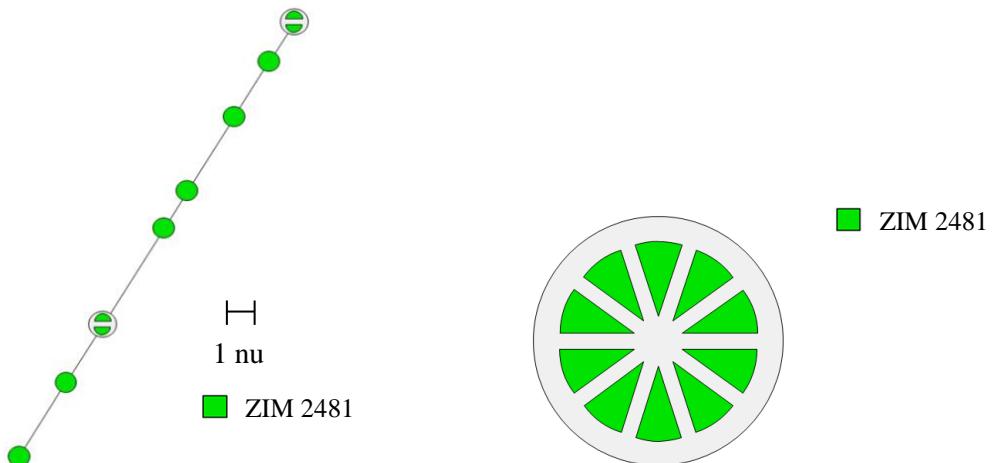
sev	št. zaporedij gena za EF-1 α	št. variant kopij gena za EF-1 α	št. variabilnih nukleotidov	št. oblik podenote EF-1 α	št. variabilnih aminokislin
ZIM 2470	11	6	14	2	2
ZIM 2533	12	6	12	1	0
ZIM 2534	11	8	14	3	2
ZIM 2322	10	6	12	1	0

Na podlagi vseh rezultatov nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α smo znotraj vrste *O. kolombanensis* dokazali prisotnost 17-ih variant kopij gena za EF-1 α (Slika 8), ki se prepišejo v štiri oblike podenote proteina EF-1 α (Slika 8). Prav tako kot pri *O. histriana* tudi pri *O. kolombanensis* močno prevladujeta dve varianti kopij gena za EF-1 α in ena varianta podenote proteina EF-1 α .



Slika 8: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) znotraj vrste *O. kolombanensis*. Vsak krog predstavlja varianto kopije gena za EF-1 α (levo) ali varianto podenote EF-1 α (desno), velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto kopije gena za EF-1 α (levo) ali varianto podenote EF-1 α (desno). Dolžina merila na levi sliki predstavlja spremembo v petih nukleotidih (nu) glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α . Dolžina merila na desni sliki predstavlja spremembo v eni aminokislini (AK) glede na 274 aminokislin dolgo zaporedje EF-1 α .

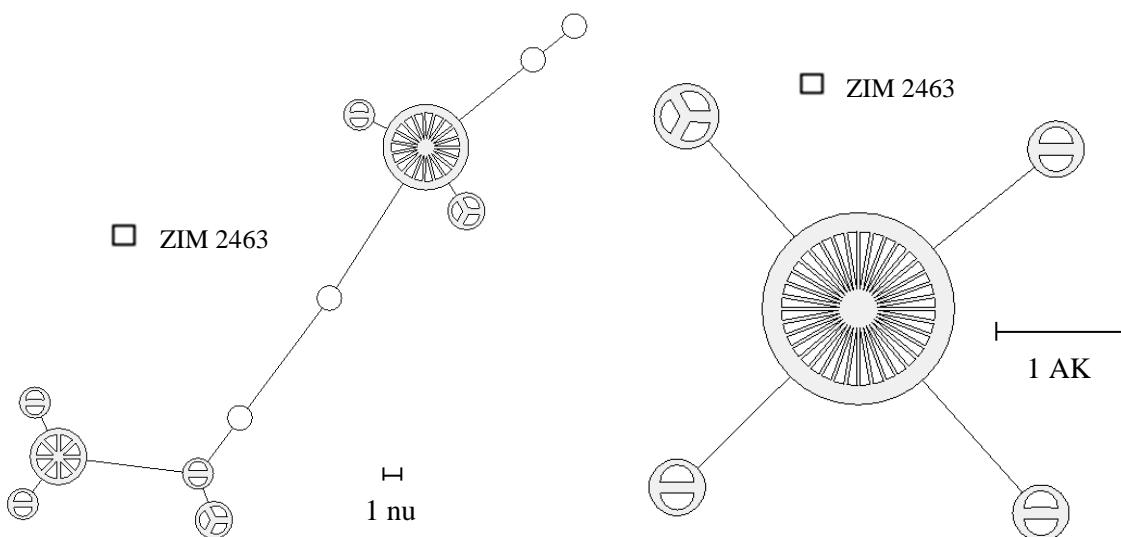
Vrsta *O. deakii* ima samo enega predstavnika in to je sev ZIM 2481. Na podlagi desetih nukleotidnih zaporedij gena za EF-1 α , smo znotraj vrste *O. deakii* dokazali prisotnost osmih variant kopij gena za EF-1 α (Slika 9), ki se vse prepišejo v eno samo varianto podenote proteina EF-1 α (Slika 9). V 823 nukleotidov dolgem zaporedju gena za EF-1 α smo dokazali 10 variabilnih nukleotidov.



Slika 9: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) znotraj vrste *O. deakii*. Vsak krog predstavlja varianto kopije gena za EF-1 α (levo) ali varianto podenote EF-1 α (desno), velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto kopije gena za EF-1 α (levo) ali varianto podenote EF-1 α (desno). Dolžina merila na levi sliki predstavlja spremembo v enem nukleotidu (nu) glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α .

Zanimalo nas je tudi, s kakšno frekvenco se pojavljajo variante kopij gena za EF-1 α in podenote proteina EF-1 α , kar smo preverili pri tipskem sevu ZIM 2463 vrste *O. histrianaica*. Pomnožke PCR gena za EF-1 α smo klonirali in izbrali 45 belih kolonij, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje gena za EF-1 α na plazmidu.

Po računalniški obdelavi 45 nukleotidnih zaporedij gena za EF-1 α smo pridobili 12 variant kopij gena za EF-1 α (Slika 10), ki se razlikujejo v 31 variabilnih nukleotidih glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α . Te se prepišejo v pet variant podenote proteina EF-1 α , ki se med seboj razlikujejo v eni aminokislini (Slika 10). Tudi pri tipskem sevu vrste *O. histrianaica* močno prevladujeta dve varianti kopij gena za EF-1 α in ena varianta podenote proteina EF-1 α . Tako smo v povprečju pri sevu ZIM 2463 na vsake tri do štiri vzorce plazmida z insertom pridobili novo varianto kopije gena za EF-1 α in na vsakih devet vzorcev plazmida z insertom novo variantu podenote proteina EF-1 α .

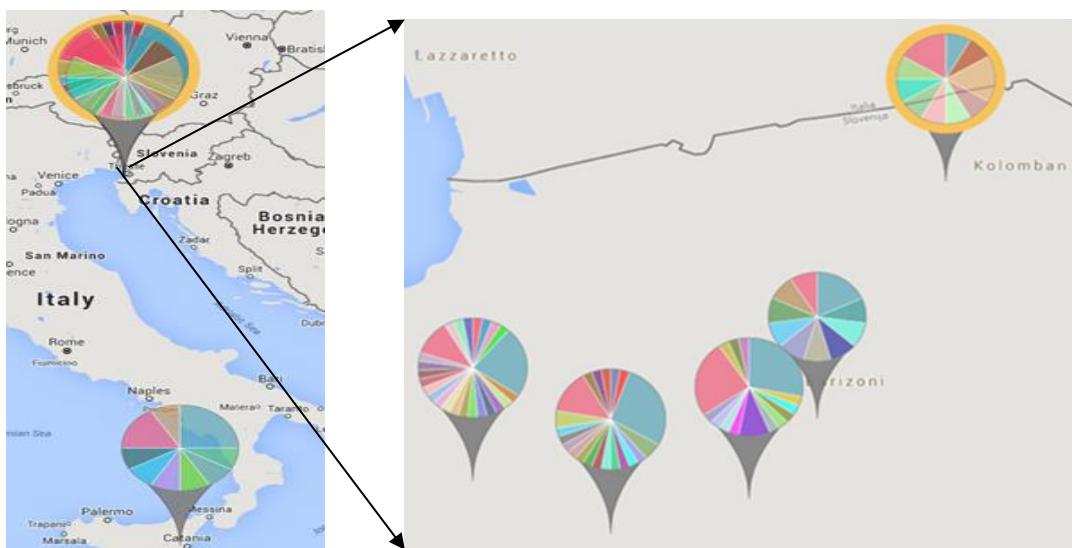


Slika 10: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) tipskega seva ZIM 2463 vrste *O. histrianaica*. Vsak krog predstavlja variante kopije gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote EF-1 α (desno), velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto kopije gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote EF-1 α (desno). Dolžina merila na levi sliki predstavlja spremembo v enem nukleotidu (nu) glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α . Dolžina merila na desni sliki predstavlja spremembo v eni aminokislini (AK) glede na 274 aminokislin dolgo zaporedje EF-1 α .

V nadaljevanju smo vsako varianto kopije gena za EF-1 α vseh sevov treh vrst oštivilčili in barvno označili. Vsaka varianta kopije gena za EF-1 α je predstavljala en alelni tip. Tako smo pridobili pri *O. histrianaica* 72, pri *O. kolombanensis* 17 in pri *O. deakii* osem alelnih tipov. Glede na lokacijo izvora sevov smo narisali krožne diagrame porazdelitve posameznih alelnih tipov znotraj posamezne vrste. Države izvora sevov so bile Madžarska (ZIM 2481), Italija (ZIM 2482) in Slovenija. V Sloveniji so bili sevi izolirani v Bertokih (ZIM 2322), Kolombanu (ZIM 2470, ZIM 2533, ZIM 2534, ZIM 2524) in v Barižoni (ZIM

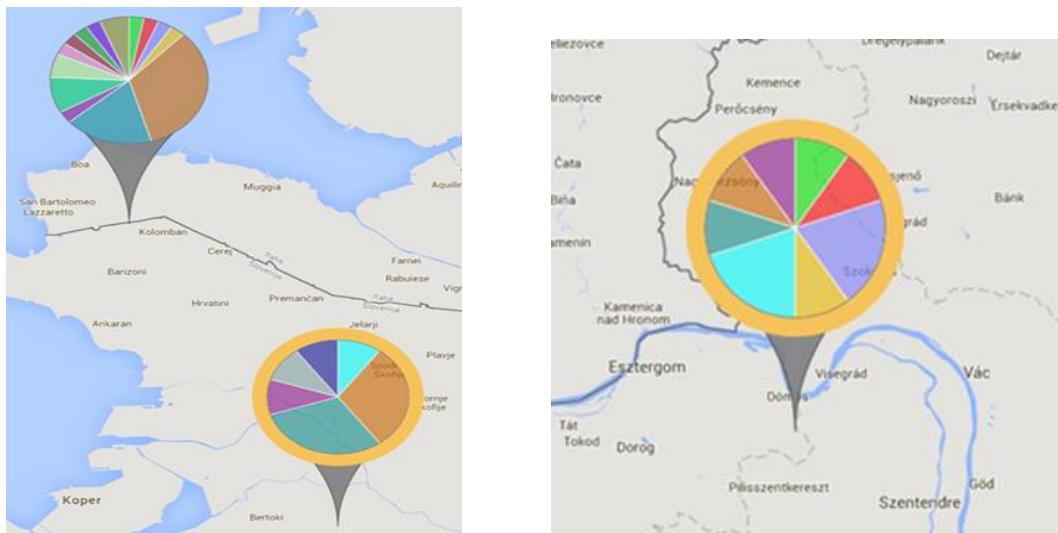
2477, ZIM 2528, ZIM 2463, ZIM 2466, ZIM 2467, ZIM 2476, ZIM 2530, ZIM 2532, ZIM 2535, ZIM 2536, ZIM 2537).

Krožni diagram porazdelitve posameznih alelnih tipov znotraj vrste *O. histrianaica* (Slika 11) prikazuje, da skoraj na vseh lokacijah (Sicilija, Kolomban in Barižoni), kjer so bili izolirani sevi ZIM 2477, ZIM 2528, ZIM 2463, ZIM 2466, ZIM 2467, ZIM 2476, ZIM 2482, ZIM 2524, ZIM 2530, ZIM 2532, ZIM 2535, ZIM 2536, ZIM 2537, prevladujeta ista dva alelna tipa. Ostali alelni tipi se pojavljajo v manjših deležih, brez logičnega vzorca.



Slika 11: Krožni diagram porazdelitve posameznih alelnih tipov vrste *O. histrianaica* glede na lokacijo izvora (Sicilija, Kolomban in Barižoni). Vsak krožni diagram predstavlja lokacijo izvora sevov ZIM 2477, ZIM 2528, ZIM 2463, ZIM 2466, ZIM 2467, ZIM 2476, ZIM 2482, ZIM 2524, ZIM 2530, ZIM 2532, ZIM 2535, ZIM 2536, ZIM 2537, barve diagrama posamezni alelni tip in delež barv v delilnem krogu število vzorcev, ki se je uvrstilo v ta alelni tip

Krožni diagram porazdelitve posameznih alelnih tipov znotraj vrste *O. kolombanensis* (Slika 12) prikazuje, da na obeh lokacijah (Kolomban in Bertoki), kjer so bili izolirani sevi ZIM 2322, ZIM 2470, ZIM 2533 in ZIM 2534, prevladujeta ista dva alelna tipa. Ostali alelni tipi se pojavljajo v manjših deležih, brez logičnega vzorca. Krožni diagram porazdelitve posameznih alelnih tipov znotraj vrste *O. deakii* (Slika 12) prikazuje, da je na lokaciji izolacije seva ZIM 2481 v Pilis gorah na Madžarskem dokaj enakomerna distribucija vseh alelnih tipov.



Slika 12: Krožni diagram porazdelitve posameznih alelnih tipov vrste *O. kolombanensis* (levo) in *O. deakii* (desno) glede na lokacijo izvora Kolomban in Bertoki (levo) ali Pilis gore na Madžarskem (desno). Vsak krožni diagram predstavlja lokacijo izvora sevov ZIM 2322, ZIM 2470, ZIM 2533, ZIM 2534 (levo) ali seva ZIM 2481 (desno), barve diagrama posamezni alelni tip in delež barv v delilnem krogu število vzorcev, ki se je uvrstilo v ta alelni tip

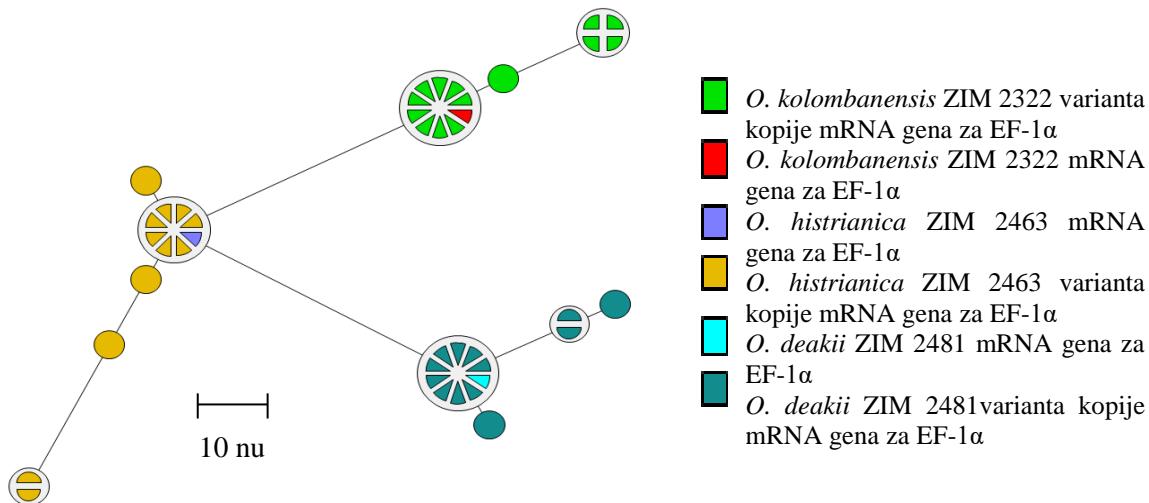
4.2.2 Določitev števila kopij variant mRNA gena za EF-1 α

Ker je EF-1 α zelo pomemben protein pri translaciji, smo predvidevali, da se vse variante kopij gena za EF-1 α prepišejo tudi v mRNA. To smo dokazali s pomočjo reverzne transkripcije. Del izolirane mRNA gena za EF-1 α smo sekvencirali, preostanek pa smo porabili za molekularno kloniranje. Pridobljena nukleotidna zaporedja (823 bp) gena za EF-1 α tipskih sevov smo analizirali s programom BioNumerics 7.5 tako kot smo analizirali nukleotidna zaporedja pridobljena pri molekularnem kloniranju DNA. Tudi tu smo dokazali dvomljivo poimenovanje baz na tretjem mestu kodona, kar nakazuje, da EF-1 α ni primeren označevalec za filogenetske študije. Število analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α in število variabilnih nukleotidov glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α tipskih sevov prikazuje preglednica 7.

Preglednica 7: Prikaz števila analiziranih zaporedij, pridobljenih variant kopij gena za EF-1 α in števila variabilnih nukleotidov za posamezni tipski sev vrste *O. kolombanensis*, *O. deakii* in *O. histriatica*

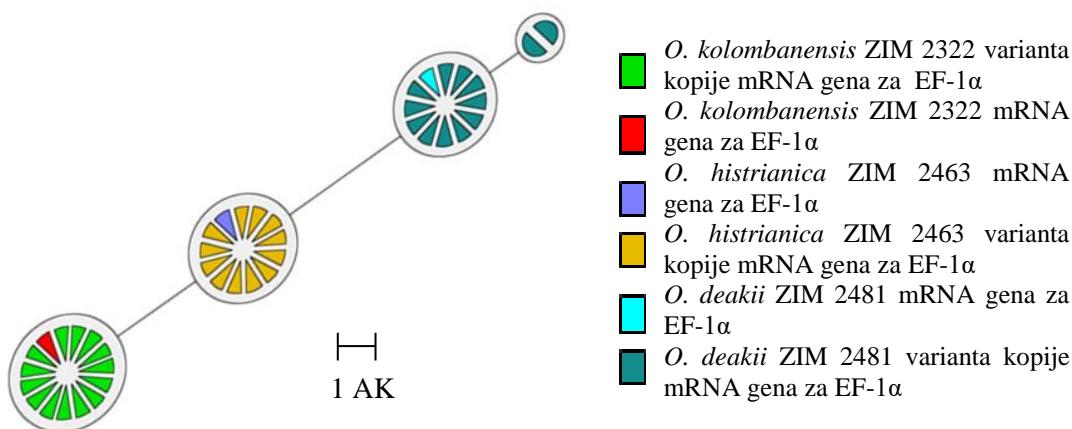
vrsta	sev	št. zaporedij gena za EF-1 α	št. variant kopij gena za EF-1 α	št. variabilnih nukleotidov
<i>O. histriatica</i>	ZIM 2463	13	5	28
<i>O. deakii</i>	ZIM 2481	14	4	11
<i>O. kolombanensis</i>	ZIM 2322	15	3	10

Z minimalnim vpetim drevesom narejenim na podlagi nukleotidnega zaporedja mRNA gena za EF-1 α (Slika 13), smo dokazali tri variante kopij mRNA gena za EF-1 α pri vrsti *O. kolombanensis* ZIM 2322, pet variant kopij mRNA gena za EF-1 α pri vrsti *O. histriatica* ZIM 2463 in štiri variante kopij gena mRNA za EF-1 α pri vrsti *O. deakii* ZIM 2481.



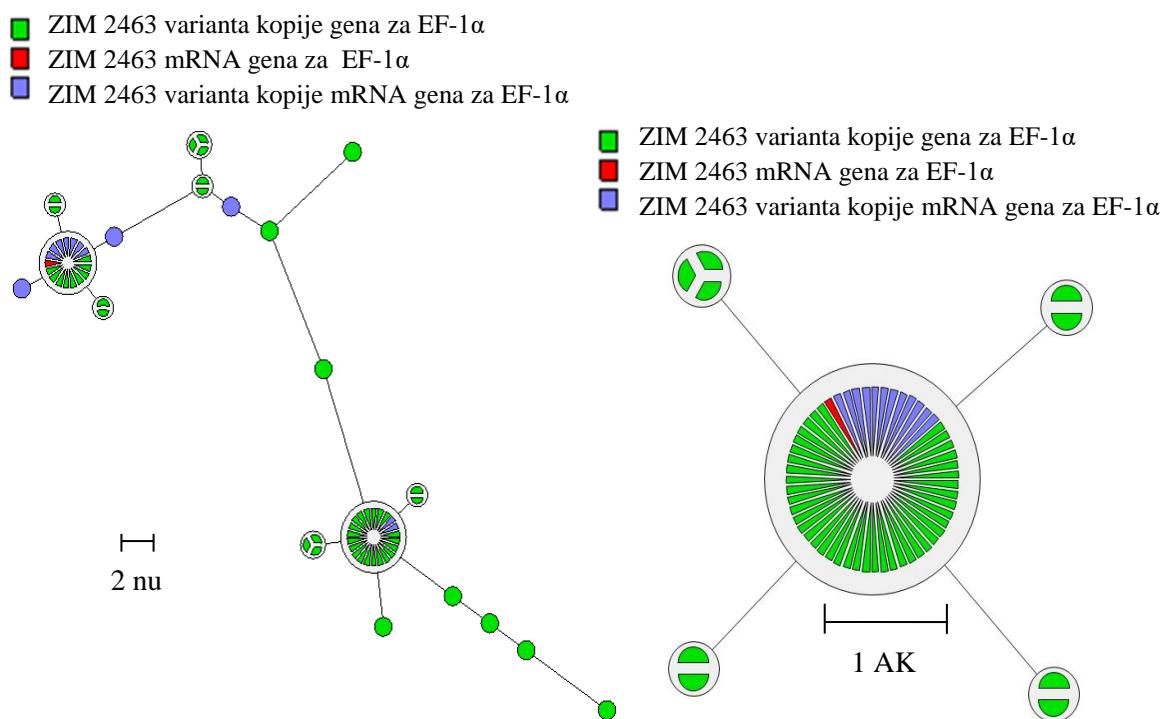
Slika 13: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi variant nukleotidnega zaporedja mRNA gena za EF-1 α vrste *O. kolombanensis* ZIM 2322, *O. histriatica* ZIM 2463 in *O. deakii* ZIM 2481. Vsak krog predstavlja varianto gena za EF-1 α v mRNA, velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto kopije gena za EF-1 α . Dolžina merila na sliki predstavlja spremembo v desetih nukleotidih (nu) glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α .

Nukleotidna zaporedja in vitro prepisane mRNA gena za EF-1 α smo prepisali tudi v aminokislinska zaporedja in izrisali minimalno vpeto drevo (Slika 14). Rezultati so pokazali, da se tri variante kopij mRNA gena za EF-1 α pri vrsti *O. kolombanensis* ZIM 2322 in pet variant kopij mRNA gena za EF-1 α pri vrsti *O. histriatica* ZIM 2463 prepišejo vsak v svojo varianto podenote proteine EF-1 α , medtem ko se štiri variante kopij mRNA gena za EF-1 α pri vrsti *O. deakii* ZIM 2481 prepišejo v dve varianti podenote proteine EF-1 α , ki se razlikujeta v eni aminokislini.



Slika 14: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi variant aminokislinskega zaporedja mRNA EF-1 α vrste *O. kolombanensis* ZIM 2322, *O. histriana* ZIM 2463 in *O. deakii* ZIM 2481. Vsak krog predstavlja varianto podenote EF-1 α , velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto podenote EF-1 α . Dolžina merila na sliki predstavlja spremembo v eni aminokislini (AK) glede na 274 aminokislin dolgo zaporedje EF-1 α .

Da bi prikazali vse pridobljene variante kopij gena za EF-1 α , smo združili pridobljene podatke na nivoju DNA in mRNA. Izrisali smo minimalno vpeto drevo (Slika 15) za sev ZIM 2463 (*O. histriana*), ker smo zanj imeli največ podatkov. Tako smo združili 64 nukleotidnih zaporedij gena za EF-1 α : variante kopije gena za EF-1 α v DNA in mRNA. Opazili smo, da tako v DNA kot v mRNA prevladujeta isti dve varianti kopije gena za EF-1 α . Tudi varianta kopije gena v mRNA spada v eno izmed teh dveh variant. Ostale variante kopije gena za EF-1 α v DNA in mRNA se med seboj razlikujejo hkrati pa se tudi pojavijo nove variante kopij gena. Ko smo vse variante kopij gena za EF-1 α prepisali v aminokislinsko zaporedje in izrisali minimalno vpeto drevo (Slika 15), smo dokazali pet variant podenote proteina EF-1 α , med katerimi močno prevladuje samo ena varianта podenote proteina EF-1 α . Ostale štiri variante podenote predstavljajo aminokislinska zaporedja variant kopij gena v DNA, ki se med seboj razlikujejo v eni aminokislini.



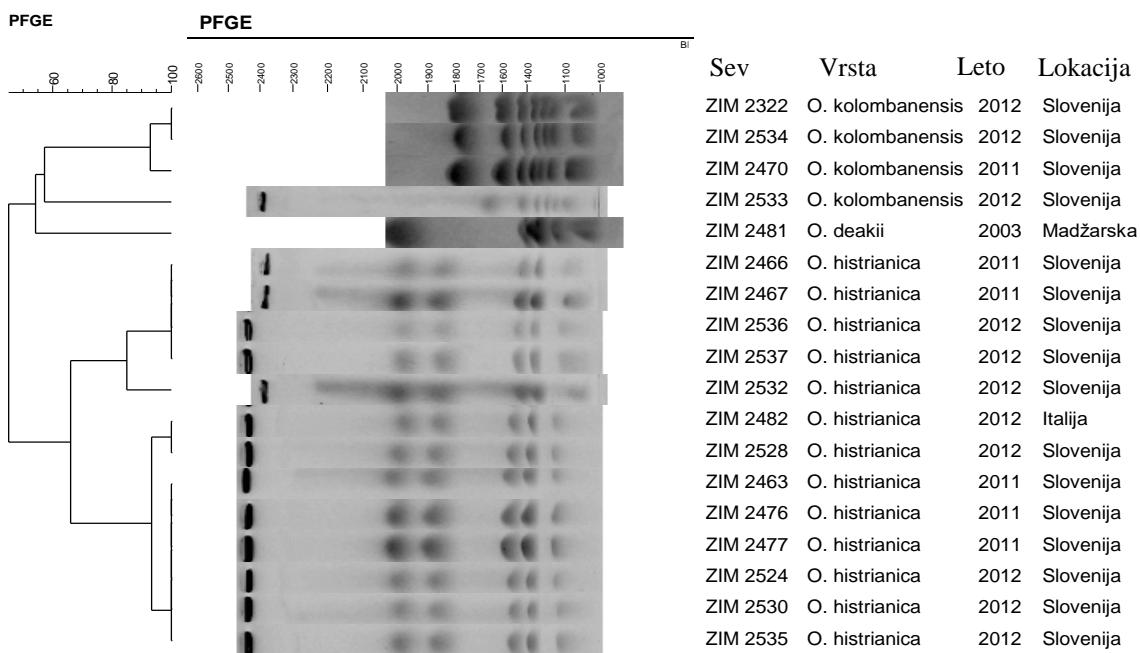
Slika 15: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α v DNA/mRNA (levo) in aminokislinskega zaporedja EF-1 α v DNA/mRNA (desno), ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α (levo) ali variante podenote proteina EF-1 α (desno) v sevu ZIM 2463 (*O. histriana*). Vsak krog predstavlja varianto kopije gena za EF-1 α v DNA/mRNA (levo) ali varianto podenote EF-1 α v DNA/mRNA (desno), velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto kopije gena za EF-1 α (levo) ali varianto podenote EF-1 α (desno). Dolžina merila na levi sliki predstavlja spremembo v dveh nukleotidih (nu) glede na 823 nukleotidov dolgo zaporedje gena za EF-1 α . Dolžina merila na desni sliki predstavlja spremembo v eni aminokislini (AK) glede na 274 aminokislin dolgo zaporedje EF-1 α .

4.3 ANALIZA KROMOSOMSKE DNA

Eden od možnih vzrokov za prisotnost različnih kopij gena za EF-1 α je, da imajo kvasovke rodu *Ogataea* mozaični genom. Predvidevali smo, da so vrste nastale z medvrstno hibridizacijo genomov, kar bi en-krat povečalo število kromosomov. Da bi to hipotezo preverili, smo se lotili analize kromosomske DNA.

Kromosomsko DNA smo ločili z elektroforezo v pulzirajočem polju in slike gela uvozili v program BioNumerics 7.5, kjer smo z metodo UPGMA izrisali dendrogram (Slika 16), ki jasno loči posamezne vrste med seboj glede na število in velikost prog. Pri vseh sevih vrste *O. histriana* in pri sevu *O. deakii* je bilo na gelu vidnih pet prog, medtem ko je bilo pri vseh sevih vrste *O. kolombanensis* vidnih sedem prog. Pri *O. histriana* smo med seboj ločili fragmente DNA velikosti okoli 2000 kbp, 1900 kbp, 1600 kbp, 1400 kbp in 1150 kbp ter pri *O. deakii* fragmente DNA velikosti okoli 2000 kbp, 1450 kbp, 1350 kbp, 1200 kbp in 1050 kbp. Velikost DNA fragmentov sevov vrste *O. kolombanensis* je bila okoli 1800 kbp, 1600 kbp, 1450 kbp, 1350 kbp, 1250 kbp, 1150 kbp in 1050 kbp. Očitno se vse

tri vrste jasno ločijo po svojem kariotipu, zato na podlagi teh rezultatov ne moremo potrditi medvrstne hibridizacije.

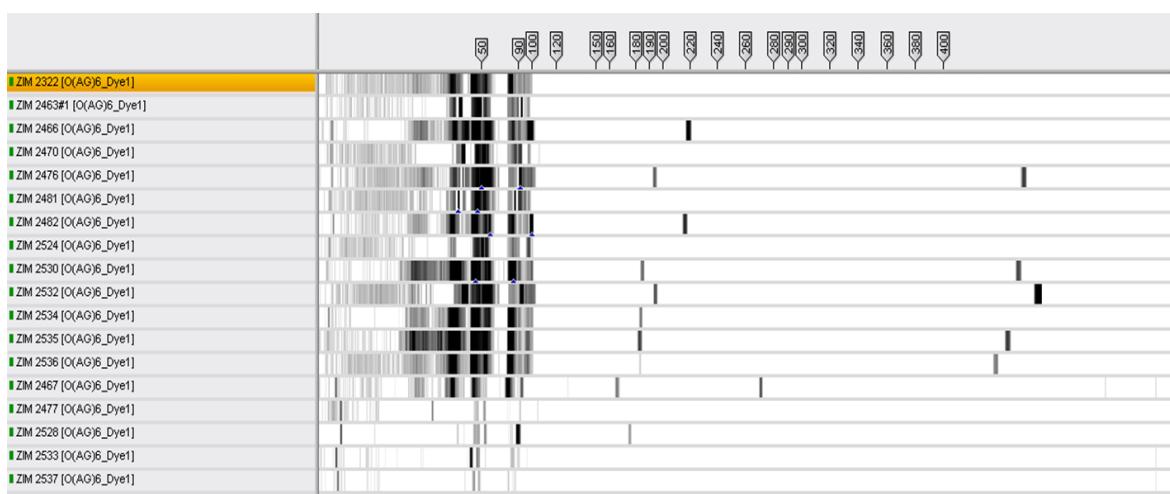


Slika 16: Dendrogram sorodnosti vseh sevov kvasovk rodu *Ogataea* izrisan glede na tipizacijo z metodo PFGE s prikazom pripadajoče vrste, leta in lokacije izvora

4.4 ANALIZA MIKROSATELITOV

Da bi preverili ali je vzrok za prisotnost različnih kopij gena za EF-1 α heterozigotna narava vrst kvasovk *Ogataea*, smo uporabili mikrosatelite kot dodaten variabilen filogenetski označevalec.

Pri vseh 18-ih sevih smo analizirali štiri mikrosatelite skonstruirane glede na zaporedje genoma *O. parapolymorpha* DL-1, kjer leži zaporedje mikrosatelita (CTC)₂₁ v kromosому 4, zaporedje mikrosatelita (GAC)₆ v kromosому 7, zaporedje mikrosatelita (AG)₆ v kromosому 5 in zaporedje mikrosatelita (GAA)₇ v kromosому 2. Na osnovi natančnih dolžin pomnožkov PCR določenih s kapilarno elektroforezo, smo s pomočjo programa Bionumerics ovrednotili variabilnost mikrosatelitov in sicer v številu ponovitev ponavljačega zaporedja na enem lokusu oz. VNTR. Če se mikrosatelit razlikuje po številu ponovitev znotraj enega seva pomeni, da ta sev vsebuje več alelov različnih velikosti oz. dolžin. Slika 17 predstavlja elektroforetskih profilov vseh sevov, kjer so pomnožki PCR mikrosatelita (AG)₆ dolgi od 150 do 450 bp.



Slika 17: Elektroforetski profili pomnožkov PCR mikrosatelita (AG)₆ dolžine od 150 do 450 bp za seve vrst *O. deakii*, *O. histrianaica* in *O. kolombanensis*

V preglednici 8 smo predstavili število ponovitev le najintenzivnejšega vrha na elektroforetskem profilu posameznega pomnožka PCR oz. prevladujočega mikrosatelitnega zaporedja. Opazili smo, da se mikrosatelitna zaporedja razlikujejo v številu ponovitev ponavljajoče enote med vrstami in tudi med sevi znotraj vrst. Tako smo med sevi vrste *O. histrianaica* na mikrosatelitnem lokusu kromosoma 5 našli šest alelov, na mikrosatelitnem lokusu kromosomov 2 in 4 pet alelov ter na mikrosatelitnem lokusu kromosoma 7 štiri alele. Sevi vrste *O. kolombanensis* so na mikrosatelitnem lokusu kromosomov 4, 5 in 7 imeli dva alela ter na mikrosatelitnem lokusu kromosoma 2 tri alele. Pri določenih sevih nismo pridobili pomnožka PCR.

Preglednica 8: Prikaz števila ponovitev najintenzivnejšega vrha mikrosatelitnega zaporedja za vsak posamezni sev

vrsta	ZIM oznaka	leto izolacije	lokacija izolacije	št. ponovitev mikrosatelitnega zaporedja				
				(AG) ₆	(GAA) ₇	(GAC) ₆	(CTC) ₂₁	
<i>Ogataea histriana</i>	ZIM 2467	2011	Barižoni, Slovenija	8	19	13	54	
	ZIM 2466			28	40	50	87	
	ZIM 2463			29	26	50	66	
	ZIM 2476			78	40	50	66	
	ZIM 2477			8	12	15	54	
	ZIM 2482	2012	Sicilija, Italija	78	40	50	16	
	ZIM 2524		Kolomban, Slovenija	26	40	nd	87	
	ZIM 2528		Barižoni, Slovenija	8	12	14	54	
	ZIM 2530			28	12	50	87	
	ZIM 2532			79	41	50	66	
<i>Ogataea kolombanensis</i>	ZIM 2535	2012	Barižoni, Slovenija	79	41	50	87	
	ZIM 2536			26	40	50	87	
	ZIM 2537			8	40	50	7	
	ZIM 2470	2011	Kolomban, Slovenija	63	65	52	51	
<i>Ogataea deakii</i>	ZIM 2533	2012		nd	7	8	12	
	ZIM 2534			nd	nd	nd	51	
	ZIM 2322	2009	Bertoki, Slovenija	32	27	nd	51	
	ZIM 2481	2003	Pilis gore, Madžarska	39	64	51	46	

nd = ni določeno

Nato smo se lotili bolj natančne obdelave rezultatov samo na tipskih sevih (Preglednica 9). Pri *O. kolombanensis* smo na mikrosatelitnem lokusu kromosomov 2 in 5 našli samo en alel ter na mikrosatelitnem lokusu kromosoma 2 dva alela. Ni pa nam uspelo pomnožiti mikrosatelitnega lokusa kromosoma 7, zato število ponovitev mikrosatelita (GAC)₆ ni določeno. Pri *O. deakii* smo na mikrosatelitnem lokusu kromosomov 2, 5 in 7 našli dva alela in na mikrosatelitnem lokusu kromosoma 2 tri alele. Pri *O. histriani* smo na mikrosatelitnem lokusu kromosomov 2 in 5 našli samo en alel, na mikrosatelitnem lokusu kromosoma 4 dva alela ter na mikrosatelitnem lokusu kromosoma 7 tri alele.

Preglednica 9: Prikaz števila ponovitev zaporedja 4 mikrosatelitov za vsak tipski sev in njihova intenziteta vrha na elektroforegramu

vrsta	ZIM oznaka	zaporedje mikrosatelite	št. ponovitev	intenziteta
<i>Ogataea kolombanensis</i>	ZIM 2322	(AG) ₆	32	375
		(GAA) ₇	27	1911
			36	840
		(GAC) ₆	nd	nd
		(CTC) ₂₁	51	74
<i>Ogataea deakii</i>	ZIM 2481	(AG) ₆	35	978
			39	2452
		(GAA) ₇	64	712
			81	548
			83	560
		(GAC) ₆	37	327
			51	806
		(CTC) ₂₁	66	720
			87	312
<i>Ogataea histrianaica</i>	ZIM 2463	(AG) ₆	29	6000
		(GAA) ₇	26	3674
		(GAC) ₆	21	233
			24	360
			50	719
		(CTC) ₂₁	66	270
			87	432

nd = ni določeno

S pomočjo analize mikrosatelitov smo potrdili heterozigotno naravo kvasovk *Ogataea*. Rezultati so nakazali, da so vrste lahko triploidi, in sicer homozigoti v dveh setih kromosomov in heterozigoti v tretjem setu kromosomov, saj se ponekod alela razlikujeta po intenziteti vrha za dva-krat. Lahko pa se število tandemskih ponovitev spremeni že ob prepisu druge kromatide zaradi napak polimeraze DNA med mejozo, ki vodijo v nastanek novih mutacij.

5 RAZPRAVA

5.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA KVASOVK

Iz sedimenta oljčnega olja mešanih sort pridelanega leta 2013 smo izolirali *Saccharomyces cerevisiae* in *Candida molentinolei*, iz sedimenta oljčnega olja mešanih sort pridelanega leta 2014 pa smo izolirali *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida molentinolei*, *Candida adriatica* in *Yamadazyma terventina*. Vzorca sta bila odvzeta v razmiku enega leta iz istega soda v naselju Kolomban.

Ker smo želeli iz obeh vzorcev sedimenta izolirati kvasovke rodu *Ogataea*, smo se pri izolaciji mikroorganizmov osredotočili predvsem na izolacijo kvasovk. V obeh vzorcih sedimenta je po številu kolonij prevladovala *C. molentinolei*, tako kot v predhodnih vzorcih oljčnega olja leta 2011 in 2012, kar kaže, da je *C. molentinolei* zelo dobro prilagojena na rast v olju. Prav tako je bila v obeh vzorcih sedimenta prisotna *S. cerevisiae*, ki je pogosto sestavni del mikrobiote sadja. Poleg *S. cerevisiae* in *C. molentinolei* sta bili v vzorcu sedimenta oljčnega olja iz leta 2014 prisotni še *C. adriatica* in *Y. terventina*. Večjo mikrobnou pestrost v sedimentu oljčnega olja iz leta 2014 lahko pripisemo vremenskim razmeram v letu 2014, ki so močno vplivala na oljke in kakovost oljčnega olja. Poletne temperature in trajanje sončnega obsevanja so bili v letu 2014 nižji od povprečnega leta. Prav tako je bilo izredno mokro leto zaradi visokih količin padavin v obdobju dozorevanja oljk (Kaltnekar in Vesel, 2015). Prisotnost vode pa je eden od pomembnih dejavnikov mikrobne rasti, ki vpliva na pestrost mikrobiote oljk in na število mikrobnih celic. Število CFU/mL je bilo v vzorcu iz leta 2014 bistveno višje kot v letu 2013. Vendar ne smemo zanemariti dejstva, da je bil vzorec iz leta 2013 eno leto dlje v shrambi. V tem času se je celokupno število kvasovk v vzorcu še dodatno zmanjšalo. Ciafardini in Zullo (2002b) sta opazila, da se je koncentracija kvasovk v nefiltriranem olju po petih mesecih bistrenja zmanjšala za dva log CFU/mL. Opazila sta tudi, da filtrirano olje vsebuje manj kvasovk kot nefiltrirano in da filtrirano olje po treh mesecih sedimentacije ne vsebuje več kvasovk, medtem ko so te še prisotne v nefiltriranem olju po petih mesecih sedimentacije. Tudi El Haouhay in sod. (2015) so opazili, da se število kvasovk v oljčnem olju po šestih mesecih skladiščenja znatno zmanjša, kot posledica izčrpanja razpoložljivih hranil in/ali kopiranja produktov, ki za rast kvasovk niso ugodni.

Mikrobna sestava v oljčnem olju je odvisna od sorte, zrelosti oljk, vremenskih razmer in načina pridelave olja. Izjemno pomemben dejavnik pri ugotavljanju mikrobine strukture v oljčnem olju je vzorčenje. Mikrobiološko analiziramo le 1 mL vzorca, kar je nizek delež v primerjavi s celotnim volumnom olja v sodu, ki lahko predstavlja tudi nekaj 100 L. Pomembno je tudi, v katerem delu soda vzorčimo in čas vzorčenja (med ali po sedimentaciji). Koidis in sod. (2008) so pri vzorčenju motnega svežega oljčnega olja opazili, da vzorci iz spodnjega dela posode vsebujejo večje število kvasovk kot vzorci

pridobljeni iz zgornjega dela po 90 dneh vzorčenja. Že po 1 mesecu sedimentacije je bila v spodnjem delu posode večja koncentracija mikrokopljic vode, v katerih so bili ujeti mikroorganizmi kot v zgornjem, kar je tudi razlog za večje število kvasovk na dnu posode.

V obeh vzorcih sedimenta oljčnega olja želenih kvasovk rodu *Ogataea* nismo našli. Razlogov za to je več. Možno je, da kvasovke rodu *Ogataea* zaradi ekstremnih vremenskih razmer ali ostalih dejavnikov sploh niso bile prisotne v obeh vzorcih sedimenta. Obstaja tudi možnost, da so bile sestavni del mikroflore obeh sedimentov, vendar celice zaradi predolgega časa med vzorčenjem (januar 2013 in 2014) in mikrobiološko analizo (marca 2015) niso preživele. Ključno vlogo za neuspelo izolacijo kvasovk rodu *Ogataea* je imelo tudi naključno vzorčenje sedimenta. Zelo težko rečemo, da sta dejansko naša dva vzorca reprezentativna za celotni sedimenta oljčnega olja v tem letu na območju Slovenske Istre. Tako so lahko bile kvasovke rodu *Ogataea* prisotne v delu sedimenta, ki ni bil vzorčen.

5.2 DOLOČITEV ŠTEVILA VARIANT GENA ZA EF-1 α

Pri vseh sevih vrste *Ogataea histrianica*, *Ogataea kolombanensis* in *Ogataea deakii* smo potrdili prisotnost različnih variant kopij gena za EF-1 α . V *O. deakii* smo dokazali prisotnost osem variant kopij gena za EF-1 α , ki kodirajo isto varianto podenote proteina EF-1 α . V *O. histrianica* smo dokazali prisotnost 72 variant kopij gena za EF-1 α , ki kodirajo 22 variant podenote proteina EF-1 α . V *O. kolombanensis* smo dokazali prisotnost 17 variant kopij gena za EF-1 α , ki se prepišejo v štiri variante podenote proteina EF-1 α . Pri vseh vrstah prevladujeta dve varianti kopij gena za EF-1 α oz. alela in ena varianta podenote proteina EF-1 α . Ker je vsaka varianta kopije gena za EF-1 α specifična za eno vrsto lahko sklepamo, da med omenjenimi vrstami ne prihaja do paritve (Priloga D). Prihaja pa do paritve sevov iste vrste, kar lahko vodi v nastanek novih variant kopije gena zaradi rekombinacije genov. K nastanku novih kopij gena pripomorejo tudi mutacije in poškodbe DNA, ki vodijo do delecij in insercij. Eden od možnih vzrokov je tudi, da so vse tri vrste heterozigoti, ki vsebujejo različne alele znotraj istega genskega lokusa (Dujon, 2010). Lachance in sod. (2013) so dokazali, da obstaja tudi povezava med genetsko raznolikostjo in geografsko razdaljo. Ocenili so, da si populacije, ki so ločene več kot 1300 km, ne delijo več skupnih alelov, kar vodi do nastanka ozko sorodnih, vendar različnih vrst kvasovk. Rezultati pri kvasovkah rodu *Ogataea* so pokazali, da si vsi sevi znotraj vrste delijo skupne alele. Največja zračna razdalja med sevi je bila okoli 950 km (od Kolombana, Slovenija do Catanie, Italija) zato ocene Lachance in sod. (2013) moremo potrditi niti ovreči. Lachance in sod. (2013) so tudi dokazali, da se največje genetske raznolikosti pojavijo na majhnem področju znotraj populacije, kar potrjujejo tudi naši rezultati sevov izoliranih v občini Ankaran, ki so med seboj oddaljeni maksimalno 10 km. Pri teh sevih opazimo največ različnih alelnih tipov.

Zakaj obstaja toliko kopij gena za EF-1 α ni znano. Papp in sod. (2004) menijo, da imajo nepotrebni/pogrešljivi geni pomemben prispevek k fitnesu modelnega organizma *S. cerevisiae* v posebnih okoljskih razmerah, kar se kaže kot okoljska prilagoditev. Wagner (2000) meni, da celice z velikim številom kopij genov, ki nastanejo z duplikacijami, preprečijo usodne mutacije, ki bi bile lahko letalne ob prisotnosti ene kopije gena. Predvidevajo, da je sposobnost celic preprečiti mutacije odvisna od prehranskega okolja (Harrison in sod., 2007).

Ko smo ocenjevali distribucijo alelnih tipov glede na lokacijo izvora sevov znotraj posamezne vrste, smo opazili, da je na lokaciji seva vrste *O. deakii* Pilis gore na Madžarskem dokaj enakomerna distribucija vseh alelnih tipov. Vendar pa bi morali te rezultate preveriti pri večjem številu sevov. Zaradi neuspešnosti pri izolaciji novih sevov *O. deakii* je ta vrsta opisana le na enem predstavniku (Čadež in sod., 2013).

Povsem drugačno distribucijo alelnih tipov smo opazili pri vrsti *O. histrianaica* in *O. kolombanensis*. Dokazali smo, da na vseh lokacijah sevov vrste *O. histrianaica* in *O. kolombanensis* prevladujeta ista dva alelna tipa. Verjetno gre za ortologna gena *TEF1* in *TEF2*, ki so jih Kiel in sod. (2007) nedavno izolirali iz *O. polymorpha*. Opazili so, da oba gena kodirata identični protein, kar potrjujejo tudi naši rezultati. Ob primerjavi istega odseka nukleotidnega zaporedja obeh genov (AY179868 in AY179869), smo opazili, da se gena pri *O. polymorpha* razlikujeta v treh nukleotidih (99,64 % homolognost), pri *O. histrianaica* v 28 nukleotidih (96,60 % homolognost), pri *O. kolombanensis* v 12 nukleotidih (98,55 % homolognost) in pri *O. deakii* v 9 nukleotidih (98,91 % homolognost). Ker se *TEF1* in *TEF2* geni v vrstah *O. histrianaica*, *O. kolombanensis* in *O. deakii* bolj razlikujejo kot v *O. polymorpha*, nam ni uspelo določiti kateri prevladujoči alelni tip pripada genu *TEF1* in *TEF2*. Vrste, ki pripadajo istemu rodu in si delijo visoko ohranjene gene npr. ribosomske DNA, lahko kažejo veliko raznolikost ortolognih genov, kar nakazuje, da te niso ozko sorodne vrste (Dujon, 2010). Opazili smo tudi, da se največ substitucij nukleotidov zgodi na tretjem mestu kodona. Substitucije nukleotidov zaradi degeneriranosti kodona v aminokislinskem zaporedju EF-1 α spremenijo do tri aminokisline pri *O. histrianaica*, do dve aminokislini pri *O. kolombanensis* in nobene pri *O. deakii*. Podenoto proteina EF-1 α v naši analizi sestavlja 274 aminokislin. Paralognih genov za EF-1 α nismo odkrili.

Tudi v mRNA smo odkrili več variant kopij gena za EF-1 α . Pri tipskemu sevu *O. histrianaica* smo odkrili pet variant kopij gena za EF-1 α , pri tipskemu sevu *O. kolombanensis* tri in pri tipskemu sevu *O. deakii* štiri. Vse variante kopij gena za EF-1 α se prepišejo v eno varianto podenote proteina EF-1 α , razen pri tipskem sevu *O. deakii*, kjer nastaneta dve varianti podenote proteina EF-1 α . Pri vseh treh tipskih sevih se je mRNA gena za EF-1 α uvrstila v varianto kopije gena za EF-1 α , ki je najpogostejša znotraj seva. Iz tega lahko predvidevamo, da je v mRNA prevladovala ena varianta kopije gena za EF-1 α ,

ostale variante pa so bile v manjših koncentracijah. Tako se je tekom PCR reakcije, med katero je prišlo do medsebojne kompeticije vseh cDNA, še bolj (eksponentno) povečala koncentracija samo ene variante gena za EF-1 α v primerjavi z ostalimi variantami gena.

Tudi v mRNA prevladujeta dve varianti kopije gena za EF-1 α znotraj vsake vrste, ki pripadata *TEF1* in *TEF2* genu. Prav tako smo v mRNA našli nove variante kopij gena za EF-1 α , ki jih v DNA nismo našli. Pri *O. deakii* smo našli tudi novo varianto podenote proteina EF-1 α . Vsi rezultati kažejo, da bi s povečevanjem števila vzorcev, vedno znova odkrivali nove variante kopij gena za EF-1 α in variante podenote proteina. To smo opazili tudi pri tipskemu sevu *O. histriatica*, kjer smo ugotovili, da na vsake tri do štiri nukleotidna zaporedja najdemo novo varianto kopije gena za EF-1 α in novo varianto podenote proteina EF-1 α na vsakih devet aminokislinskih zaporedij. Vendar bi bilo potrebno preveriti ali ta frekvanca genov velja samo za omenjeni tipski sev ali tudi za ostale seve znotraj vrste. Predvidevamo pa, da so frekvence pojavljanja genov pri vseh treh vrstah podobne, saj gre za ozko sorodne vrste.

Prisotnost toliko različnih variant kopij gena za EF-1 α kaže, da ima EF-1 α zelo pomembno vlogo pri metilotrofnih kvasovkah. Številne študije so že dokazale, da je EF-1 α povezan z peroksisomi (Marelli in sod., 2004; Kiel in sod. 2007). To kaže, da je EF-1 α temeljni protein, ki se lahko veže dokaj neselektivno na negativno nabito membrano peroksisoma. Marelli in sod. (2004) so odkrili GTPazo Rho1, katere vezava na peroksisom je odvisna od njegove interakcije s proteinom Pex25. GTPaza Rho1 ureja sestavljanje aktina na membrani peroksisoma, s čimer kontrolira dinamiko in biogenezo membrane. Druga možnost je, da EF-1 α opravlja specifično funkcijo na peroksisomu npr. lokalizirano translacijo (Condeelis, 1995; Gonsalvez in sod., 2005). Gonsalvez in sod. (2005) menijo, da kvasovke uporabljajo mRNA lokalizacijo v različnih poteh sortiranja proteinov. Za ustrezno lokalizacijo mRNA pa je potrebna tudi translacijska regulacija, kjer ima verjetno pomembno vlogo tudi EF-1 α pri sortiranju peroksinov.

5.3 VARIABILNOST KROMOSOMSKE DNA

Pulzna gelska elektroforeza (PFGE) nam je omogočila jasno razlikovanje med posameznimi vrstami. Ker je bila jakost oz. intenzivnost vseh prog znotraj posameznega seva enaka, lahko sklepamo, da ena proga predstavlja samo en kromosom. Tako smo dokazali, da ima *O. histriatica* pet kromosomov velikosti od 2000 do 1150 kbp. *O. deakii* ima tudi pet kromosomov, ki so velikosti od 2000 do 1050 kbp. *O. kolombanensis* pa ima za razliko od ostalih dveh vrst sedem kromosomov, ki so velikosti od 1800 do 1050 kbp. Iz teh podatkov lahko tudi ocenimo velikosti genoma. Ocenjena velikost genoma je za *O. histriatica* 8050 kbp, za *O. deakii* 7050 kbp in za *O. kolombanensis* 9650 kbp. Ti podatki držijo za haploidni set kromosomov.

Velikost genomov se med vrstami razlikuje. *O. kolombanensis* je po velikosti genoma še najbolj podobna *O. polymorpha*. Se pa razlikuje od *O. polymorpha* (sev CBS 4732), da ima en kromosom več in da so ti krajsi. Pojavljajo se tudi razlike v genomu med sevi znotraj posameznih vrst. To smo tudi pričakovali, saj smo z dokazom prisotnosti različnih variant kopij gena za EF-1 α predvidevali, da se genomi sevov znotraj vrst malo razlikujejo. Pri edinemu sevu vrste *O. deakii* smo opazili tudi prisotnost prog v obliki raket, ki nastanejo zaradi temperaturnega gradiента v gelu. Očitno bi morali narediti tanjši gel za učinkovitejše ohlajevanje gela med elektroforezo, kar bi še dodatno izboljšalo ločbo DNA fragmentov (Römling in sod., 1998).

5.4 VARIABILNOST MIKROSATELITOV

Osemnajst sevov kvasovk vrst *O. histrianaica*, *O. kolombanensis* in *O. deakii* smo genotipizirali na podlagi štirih mikrosatelitnih lokusov. Opazili smo, da so mikrosatelitna zaporedja zelo variabilna med vrstami in tudi znotraj vrst. Zaradi različnega števila tandemskih ponovitev lahko dobro opazimo dolžinsko variabilnost mikrosatelitov. Mikrosatelitni lokusi so visoko polimorfni. Polimorfizmi lahko nastanejo zaradi genskih sprememb (insercije in delekcije), neenakomerne homologne rekombinacije med tandemskimi ponovitvami ali zaradi zdrsa DNA polimeraze med replikacijo in neučinkovitega DNA replikacijskega popravljalnega mehanizma (Fowler in sod., 1988; Strand in sod., 1993). Pri tipskih sevih smo pokazali prisotnost od enega do treh alelov določenega mikrosatelita na istem mikrosatelitnem lokusu, ki se med seboj razlikujejo po dolžini ponovitev. Tako kot pri EF-1 α smo tudi pri mikrosatelitih opazili heterogenost genov. Ker smo dokazali prisotnost dveh ali več različnih alelov gena za EF-1 α in mikrosatelitov v populaciji sklepamo, da gre za heterozigotne kvasovke.

Pri nekaterih sevih nismo pridobili pomnožkov PCR določenega mikrosatelita, kar smo na elektroforetskem profilu pomnožkov PCR opazili kot odsotnost vrha. To je bilo še posebno opazno pri sevu ZIM 2534, kjer smo pridobili le en pomnožek PCR mikrosatelita od štirih. To nakazuje, da je omenjeni sev genetsko drugačen od ostalih sevov znotraj vrste *O. kolombanensis*. Možno je, da je prišlo znotraj takšnih sevov do propada določenega mikrosatelita. Za propad mikrosatelita je potrebna kombinacija dveh mutacij in sicer prva mutacija povzroči prekinitve popolnega mikrosatelita, medtem ko druga povzroči delekcijo večjega odseka ponovitve. Ta proces lahko pojmenujejo z izrazom smrt mikrosatelita, saj je končni rezultat teh prekinitiv in izbrisov skoraj neprepoznavno homologno zaporedje DNA, ki vsebuje le majhen del prvotne ponovitve regije (Taylor in sod., 1999). Druga možna razlaga je tudi prisotnost ničnih alelov. Gre za alele, kjer je na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov prišlo do nukleotidnih mutacij kot so insercije, substitucije in delekcije, kar povzroči, da začetni oligonukleotidi ne prepozna mesta prileganja. To lahko privede do podcenjevanja heterozigotnosti alelov mikrosatelitov in do navidezne neskladnosti oz. nezdružljivosti genotipov znotraj družine (Callen in sod., 1993). V tem

primeru gre torej za lažno smrt mikrosatelita, ki je veliko bolj verjetna, saj so bili naši začetni oligonukleotidi skonstruirani na podlagi poznanega zaporedja genoma *O. parapolymorpha* DL-1, ki se očitno v obrobnih regijah mikrosatelitnih lokusov razlikuje od sevov kvasovk vrste *O. histrianaica*, *O. kolombanensis* in *O. deakii*.

Pri pregledovanju rezultatov števila ponovitev pri tipskem sevu *O. histrianaica*, *O. kolombanensis* in *O. deakii* smo ugotovili, da se med seboj razlikujejo po številu alelov na določenem mikrosatelitnemu lokusu. Opazili smo tudi zanimiv vzorec, saj se v mikrosatelitnih lokusih, ki vsebujejo dva alela, alela med seboj razlikujeta po intenziteti vrha za dva-krat. Glede na dva-krat večjo intenziteto vrha obstaja možnost, da se pod istim vrhom skrivata dva alela enake dolžine. Pojav, da sta dva alela identična po dolžini na istem lokusu ne pa tudi po izvoru, imenujemo homoplazija (Estoup in sod., 2000). Aleli so lahko strukturno enaki in evolucijsko različni. Homoplazija lahko privede do napačne interpretacije rezultatov in podcenjevanja dejanske raznolikosti med populacijami, saj smo variabilnost mikrosatelitov ovrednotili glede na dolžino pomnožkov PCR.

6 SKLEPI

- Sediment oljčnega olja pridelanega leta 2013 in 2014 vsebuje heterogeno populacijo v kateri prevladujeta vrsti *Saccharomyces cerevisiae* in *Candida molandinolei*. Kvasovk rodu *Ogataea*, ki so specifične za oljke v Slovenski Istri, nismo uspeli izolirati.
- DNA zapis za filogenetski označevalec EF-1 α ni primeren za filogenetske študije v rodu *Ogataea* zaradi prisotnosti različnih kopij znotraj vrste, ki jih najdemo tudi v mRNA. V izolatih iz različnih lokacij vrst *O. histrianaica* in *O. kolombanensis* sta prevladovala dva alelna tipa, ki sta po vsej verjetnosti ortologna gena *TEF1* in *TEF2*. Vsi alelni tipi določene vrste v večini primerov kodirajo identičen protein.
- Različnost zapisa za filogenetski označevalec EF-1 α je pogojena s heterozigotno naravo vrst kvasovk *Ogataea*, ki smo jo dokazali z genotipizacijo štirih mikrosatelitnih lokusov. Ti mikrosatelitni lokusi lahko vsebujejo od enega do treh alelov. Pri tipskem sevu *O. histrianaica* je najbolj polimorfen lokus kromosoma 7 s tremi aleli, pri tipskem sevu *O. kolombanensis* lokus kromosoma 2 z dvema aleloma in pri tipskem sevu *O. deakii* lokus kromosoma 2 z tremi aleli.
- *O. histrianaica* ima pet kromosomov velikosti od 2000 do 1150 kbp in domnevno 8,0 Mbp velik genom. *O. deakii* ima tudi pet kromosomov velikosti od 2000 do 1050 kbp in domnevno 7,0 Mbp velik genom. Sedem kromosomov velikosti od 1800 do 1050 kbp in domnevno 9,6 Mbp velik genom pa ima *O. kolombanensis*. Ti podatki držijo za haploidni set kromosomov. Vse tri vrste se med seboj jasno razlikujejo po kariotipu. Med sevi iste vrste lahko opazimo genetsko variabilnost, ki je posledica prisotnosti različnih alelov oz. heterozigotnosti.

7 POVZETEK

Metilotrofne kvasovke, ki so sposobne rasti na metanolu kot edinemu viru ogljika in energije, najpogosteje najdemo na substratih bogatih s pektinom in ligninom kot so oljke in preperel les. Oljčno olje pridelano v Slovenski Istri vsebuje heterogeno populacijo kvasovk, med katerimi vsako leto močno prevladuje *Candida molandinolei*. Občasno so v oljčnem olju prisotne tudi kvasovke rodu *Ogataea*, ki so specifične za oljke v Slovenski Istri.

EF-1 α se uporablja kot filogenetski označevalec za filogenetske študije, vendar je njegova uporaba vprašljiva zaradi prisotnost različnih kopij gena za EF-1 α znotraj vrst *Ogataea histrianaica*, *Ogataea deakii* in *Ogataea kolombanensis*. Pri *O. histrianaica* smo dokazali prisotnost 72 variant kopij gena za EF-1 α , ki kodirajo 22 variant podenote proteina EF-1 α . Pri *O. kolombanensis* smo dokazali prisotnost 17 variant kopij gena za EF-1 α , ki se prepišejo v štiri variante podenote proteina EF-1 α . Pri *O. deakii* smo dokazali prisotnost osmih variant kopij gena za EF-1 α , ki kodirajo isto varianto podenote proteina EF-1 α . Tudi na nivoju mRNA smo znotraj vrst potrdili različne variante kopij gena za EF-1 α in podenote proteina EF-1 α . Če bi povečevali število vzorcev, bi na vsake tri do štiri nukleotidna zaporedja našli novo varianto kopije gena za EF-1 α in na vsakih devet aminokislinskih zaporedij novo varianto podenote proteina EF-1 α . Pri primerjanju variant kopij gena za EF-1 α na nivoju DNA in mRNA smo odkrili, da znotraj vrste *O. histrianaica* in *O. kolombanensis* močno prevladujeta dva alelna tipa, ki sta verjetno ortologna gena *TEF1* in *TEF2*.

EF-1 α ima očitno pomembno vlogo v metilotrofnih kvasovkah saj ga najdemo tudi v peroksisomih. Poleg njegove pomembne vloge v elongacijski fazi translacije, ima verjetno vlogo tudi pri lokalizirani translaciji peroksinov in predstavlja temeljni protein, ki se dokaj neselektivno veže na negativno nabito membrano peroksisoma.

Genetsko variabilnost sevov smo analizirali tudi na podlagi štirih mikrosatelitnih lokusov. Odkrili smo, da ti mikrosatelitni lokusi vsebujejo od enega do tri alele, ki se med seboj razlikujejo po številu ponovitev mikrosatelita oz. dolžini alela (bp). To nakazuje heterozigotno naravo kvasovk *O. histrianaica*, *O. deakii* in *O. kolombanensis*, ki je deloma tudi vzrok za prisotnost različnih kopij gena za EF-1 α v genomu.

Na podlagi PFGE analize smo dokazali, da ima *O. histrianaica* pet kromosomov velikosti od 2000 do 1150 kbp in 8,0 Mbp velik genom. *O. deakii* ima tudi pet kromosomov velikosti od 2000 do 1050 kbp in 7,0 Mbp velik genom. *O. kolombanensis* pa ima za razliko od ostalih dveh vrst sedem kromosomov velikosti od 1800 do 1050 kbp in 9,6 Mbp velik genom, ki je skoraj enak velikosti genoma *Ogataea polymorpha*. Ti podatki držijo za haploidni set kromosomov.

8 VIRI

- Ahmad-Qasem M.H., Cánovas J., Barrajón-Catalán E., Micol V., Cárcel J.A., García-Pérez J.V. 2013. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 17: 120-129
- Arroyo López F.N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. International Journal of Food Microbiology, 128, 2: 189-196
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theoretical and Applied Genetics, 107, 4: 736-744
- Bennett J.W., Wunch K.G., Faison B.D. 2002. Use of fungi in biodegradation. V: Manual of environmental microbiology. Hurst C.J. (ed.). Washington, ASM Press: 960-971
- Callen D.F., Thompson A.D., Shen Y., Phillips H.A., Richards R.I., Mulley J.C., Sutherland G.R. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. American Journal of Human Genetics, 52, 5: 922-927
- Cereghino G.P. Cregg J.M. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. Current Opinion in Biotechnology, 10, 5: 422-427
- Ciafardini G., Zullo B.A. 2002a. Microbiological activity in stored olive oil. International Journal of Food Microbiology, 75, 1: 111-118
- Ciafardini G., Zullo B.A. 2002b. Survival of microorganisms in extra virgin olive oil during storage. Food Microbiology, 19, 1: 105-109
- Ciafardini G., Zullo B.A., Peca G. 2004. Presence of microorganisms in flavoured extra virgin olive oil. Annals of Microbiology, 54, 2: 161-168
- Ciafardini G., Zullo B.A., Iride A. 2006. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. Food Microbiology, 23, 1: 60-67
- Ciafardini G., Zullo B.A., Antonielli L., Corte L., Roscini L., Cardinali G. 2013. *Yamadazyma terventina* sp. nov., a yeast species of the *Yamadazyma* clade from Italian olive oils. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 1: 372-376
- Clark A.G. 1990. Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. Molecular Biology and Evolution, 7, 2: 111-122
- Coimbra M.A., Waldron K.W., Selvendran R.R. 1995. Investigation of the occurrence of xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of olive pulp (*Olea europaea*). Carbohydrate Polymers, 27, 4: 277-284
- Condeelis J. 1995. Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. Trends in Biochemical Science, 20, 5: 169-170

- Clegg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., Thill G.P., Stillman C.A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cell Biology*, 9, 3: 1316-1323
- Čadež N., Raspor P., Turchetti B., Cardinali G., Ciafardini G., Veneziani G., Péter G. 2012. *Candida adriatica* sp. nov. and *Candida molentinolei* sp. nov., two yeast species isolated from olive oil and its by-products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 9: 2296-2302
- Čadež N., Dlauchy D., Raspor P., Gabor P. 2013. *Ogataea kolombanensis* sp. nov., *Ogataea histrianica* sp. nov. and *Ogataea deakii* sp. nov., three novel yeast species from plant sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 3115-3123
- De Koning W., Harder W. 1992. Methanol-utilizing yeasts V: Methane and methanol utilizers. Murell J.C., Dalton H. (eds.). New York, Plenum Press: 207-244
- Dlauchy D., Tornai-Lehoczki J., Peter G. 1999. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 3: 445-453
- Drouin G., Moniz de Sam M., Zuker M. 1995. The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 6: 841-849
- Dujon B. 2010. Yeast evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 11, 7: 512-524
- Edlind T.D., Li J., Visvesvara G.S., Vodkin M.H., McLaughlin G.L., Katayir S.K. 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 5, 2: 359-367
- El Haouhay N., Samaniego-Sánchez C., Asehraou A., Villalón-Mir M., López-García de la Serrana H. 2015. Microbiological characterization of Picholine variety olives and analysis of olive oil produced in traditional oil mills in Morocco. *CyTA - Journal of Food*, 13, 1: 107-115
- Eldarov M.A., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G. 2011. Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *FEMS Yeast Research*, 11, 6: 464-472
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 6: 435-445
- Esteves da Silva J.C.G. 2010. Chemometric classification of cultivars of olives: perspectives on Portuguese olives. V: Olives and olive oil in health and disease prevention. Preedy V.R., Watson R.R. (eds.). San Diego, Academic Press: 33-42
- Estoup A., Largiader C.R., Cornuet J.M., Gharbi K., Presa P., Guyomard R. 2000. Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: an empirical evaluation with brown trout (*Salmo trutta*) as model organism. *Molecular Ecology*, 9, 11: 1873-1886
- Fall R., Benson A.A. 1996. Leaf methanol - the simplest natural product from plants. *Trends in Plant Science*, 1, 9: 296-301

- Foulet F., Nicolas N., Eloy O., Botterel F., Gantier J.C., Costa J.C., Bretagne S. 2005. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. Journal of Clinical Microbiology, 43, 9: 4574-4579
- Fowler J., Burgoyne L., Scott A., Harding H. 1988. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation - a concise review relevant to forensic biology. Journal of Forensic Sciences, 33, 5: 1111-1126
- Galanakis C.M. 2011. Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. Trends in Food Science & Technology, 22, 4: 175-184
- Garrido A., García P., Brenes M. 1995. Olive fermentation. V: Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise. Vol. 9. Rehm H.J., Reed G. (eds.). Weinheim, VCH: 593-627
- Gellissen G., Melber K., Janowicz Z.A., Dahlems U.M., Weydemann U., Piontek M., Strasser A.W., Hollenberg C.P. 1992. Heterologous protein production in yeast. Antonie Van Leeuwenhoek, 62, 1-2: 79-93
- Gleeson M.A., Sudbery P.E. 1988. The methylotrophic yeasts. Yeast, 4:1-15
- Gonsalvez G.B., Urbinati C.R., Long R.M. 2005. RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. Biology of the Cell, 97, 1: 75-86
- Goodsell D.S. 2002. The molecular perspective: restriction endonucleases. Stem Cells, 20, 2: 190-191
- Guillamón J.M., Sabaté J., Barrio E., Cano J., Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Archives of Microbiology, 169, 5: 387-392
- Hamdi M. 1993. Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment: a review. Bioprocess Engeneering, 8, 5: 209-214
- Harrison R., Papp B., Pal C., Oliver S.G., Delneri D. 2007. Plasticity of genetic interactions in metabolic networks of yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 7: 2307-2312
- Herschleb J., Ananiev G., Schwartz D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. Nature Protocols, 2, 3: 677-684
- Hollenberg C.P., Gellissen G. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. Current Opinion in Biotechnology, 8, 5: 554-560
- Jarvis M.C. 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. Plant, Cell & Environment, 7, 3: 153-164
- Kaltnekar Z., Vesel V. 2015. Porčilo poskusnega centra za oljkarstvo za leto 2014. Nova Gorica, Kmetijsko gospodarska zbornica Slovenije: 10 str.
http://www.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/podrocja/Kmetijstvo/Codex/POROCILO_PCO_2014_splet.docx (februar 2016)
- Keeling P.J., Doolittle W.F. 1996. Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. Molecular Phylogenetic and Evolution, 13, 10: 1297-1305

- Kiel J.A.K.W., Veenhuis M., Van der Klei I.J. 2006. PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic Copenhagen Denmark*, 7, 10: 1291-1303
- Kiel J.A.K.W., Titorenko I., Van der Klei I.J. Veenhuis M. 2007. Overproduction of translation elongationfactor1-a (eEF1A) suppresses the peroxisome biogenesis defect in a *Hansenula polymorpha* pex3 mutant via translational read-through. *FEMS Yeast Research*, 7, 7: 1114-1125
- Koidis A., Triantafillou E., Boskou D. 2008. Endogenous microflora in turbid virgin olive oils and the physicochemical characteristics of these oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 2: 164-171
- Kunze G., Kang H., Gellissen G. 2009. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): biology and applications. V: Yeast biotechnology: diversity and application. Satyanarayana T., Kunze G. (eds.). Dordrecht, Springer: 47-64
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 5: 1216-1223
- Kurtzman C.P. 1998. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. V: The Yeasts: a taxonomic study. Kurtzman C.P., Fell J.W. (eds.). 4st ed. Amsterdam, Elsevier: 273-352
- Kurtzman C.P. 2011. A new methanol assimilating yeast, *Ogataea parapolymorpha*, the ascosporic state of *Candida parapolymorpha*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 3: 455-462
- Lachance M.A., Perri A.M., Farahbakhsh A.S., Starmer W.T. 2013. Genetic structure of *Kurtzmaniella cleridarum*, a cactus flower beetle yeast of the Sonoran and Mojave Deserts: speciation by distance? *FEMS Yeast Research*, 13, 7: 674-681
- Lahtchev K. 2002. Basic genetics of *Hansenula polymorpha*. V: *Hansenula polymorpha* - biology and applications. Gellissen G. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH: 8-20
- Lamberti A., Caraglia M., Longo O., Marra M., Abbruzzese A., Arcari P. 2004. The translation elongation factor 1α in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis. *Amino Acids*, 26, 4: 443-448
- Lamut M. 2010. *In vitro* ter *in vivo* antioksidativna učinkovitost metanolnih ekstraktov ekstra deviških oljčnih olj. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 4-4
- Lanza B., Di Serio M.G., Iannucci E., Russi F., Marfisi P. 2010. Nutritional, textural and sensorial characterisation of Italian table olives (*Olea europaea* L. cv. 'Intosso d'Abruzzo'). *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 1: 67-74
- Lee B., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N. 2002. Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology*, 148, 9: 2697-2704
- Mafra I., Coimbra M. 2004. Texture in food: solid foods. V: Improving the texture of processed fruit: the case of olives. Kilcast D. (ed.). Cornwall, CRC: 410-431

- Malheiro R., Sousa A., Casal S., Bento A., Pereira J.A. 2011. Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2: 450-457
- Marelli M., Smith J.J., Jung S., Yi E., Nesvizhskii A.I., Christmas R.H., Saleem R.A., Tam Y.Y., Fagarasanu A., Goodlett D.R., Aebersold R., Rachubinski R.A., Aitchison J.D. 2004. Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *The Journal of Cell Biology*, 167, 6: 1099-1112
- Marri L., Rossolini G.M., Satta G. 1993. Chromosome polymorphisms among strains of *Hansenula polymorpha* (syn. *Pichia angusta*). *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 939-941
- Merrick W.C. 1992. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological Reviews*, 56, 2: 291-315
- Meyer S.A., Payne R.W., Yarrow D. 1998. *Candida* Berkhouit. V: The Yeasts: a taxonomic study. Kurtzman C.P., Fell J.W. (eds.). 4st ed. Amsterdam, Elsevier: 454-573
- Mohini J., Deshpande J.D. 2011. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2, 1: 1-8
- Montaño A., Sánchez A.H., Casado F.J., Castro A., Rejano L. 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82, 2: 297-302
- Munshi R., Kndl K.A., Carr-Schmid A., Whitacre J.L., Adams A.E., Kinzy T.G. 2001. Overexpression of translation elongation factor 1 α affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast. *Genetics*, 157, 5: 1425-1436
- Nemecek-Marshall M., MacDonald R.C., Franzen J.J., Wojciechowsky C.I., Fall R. 1995. Methanol emission from leaves. *Plant Physiology*, 108, 4: 1359-1368
- O'Neill M., Albersheim P., Darvill A. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. V: Methods in plant biochemistry. Vol. 2. Dey P.M. (ed.). San Diego, Academic Press: 415-441
- Palumbo M., Harris L.J. 2011. Microbiological food safety of olive oil: a review of the literature. Davis, UC Davis Olive Center: 17 str.
<http://olivecenter.ucdavis.edu/research/files/microbialsafety120511.pdf> (februar 2016)
- Panagou E.Z., Schillinger U., Franz C.M., Nychas G.J. 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25, 2: 348-358
- Papp B., Pal C., Hurst L.D. 2004. Metabolic network analysis of the causes and evolution of enzyme dispensability in yeast. *Nature*, 429, 6992: 661-664
- Patova O.A., Golovchenko V.V., Ovodov Y.S. 2014. Pectic polysaccharides: structure and properties. *Russian Chemical Bulletin*, 63, 9: 1901-1924

- Polak Brenkič T. 2015. Program spremljanja kakovosti oljčnega olja v letu 2016. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 6 str.
www.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.../Priloga3_Program.doc (februar 2016)
- Promega. 2015. pGEM®-T and pGEM®-T easy vector systems: instructions for use. Madison, Promega Corporation: 28 str.
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf> (marec 2015)
- Ramezani-Rad M., Hollenberg C.P., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Michael P., Dahlems U., Gellissen G. 2003. *The Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. FEMS Yeast Research, 4, 2: 207-215
- Ravin N.V., Eldarov M.A., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Schneider J., Mardanova E.S., Smekalova E.M., Zvereva M.I., Dontsova O.A., Mardanov A.V., Skryabin K.G. 2013. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. BMC Genomics, 14: 837, doi: 10.1186/1471-2164-14-837: 20 str.
- Richard G.F., Hennequin C., Thierry A., Dujon B. 1999. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. Research in Microbiology, 150, 9-10: 589-602
- Riis B., Rattan S.I.S., Clark B.F.C., Merrick W.C. 1990. Eukaryotic protein elongation factors. Trends in Biochemical Science, 15, 11: 420-424
- Robert R.J., Murray K. 1976. Restriction endonucleases. Critical Reviews in Biochemistry, 4, 2: 123-164
- Robert V., Stegehuis G., Stalpers J. 2005. The MycoBank engine and related databases. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center
<http://www.mycobank.org> (marec 2016)
- Rodríguez H., Curiel J.A., Landete J.M., Rivas B., López F., Gómez-Cordovés C., Mancheño J.M., Muñoz R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 132, 2-3: 79-90
- Roger A.J., Sandblom O., Doolittle W.F., Philippe H. 1999. An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. Molecular Biology and Evolution, 16, 2: 218-233
- Römling U., Schmidt K., Tümmler B. 1998. Two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis V: Bacterial genomes: physical structure and analysis. Bruijn F. J., Lupski, J.R., Weinstock G.M. (eds.). 1st ed. Boston, Springer US: 326-336
- Ruiz-Barba J.L., Rios-Sánchez R.M., Fedriani-Iriso C., Olias J.M., Rios J.L., Jiménez-Díaz R. 1990. Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*. Systematic and Applied Microbiology, 13, 2: 199-205
- Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny A.A. 2003. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Research 4, 2: 157-164

- Sakai Y., Tani Y. 1992. Cloning and sequencing of the alcohol oxidase encoding gene (AOD1) from the formaldehyde-producing asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene*, 114, 1: 67-73
- Sakai Y., Murdanoto A.P., Konishi T., Iwamatsu A., Kato N. 1997. Regulation of the formate dehydrogenase gene, FDH1, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an FDH1-disrupted strain on methanol, methylamine, and choline. *Journal of Bacteriology*, 179, 14: 4480-4485
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27: 185-194
- Schirmaier F., Philippse P. 1984. Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 alpha of *S. cerevisiae*. *The EMBO journal*, 3, 13: 3311-3315
- Schlötterer C. 1998. Genome evolution: are microsatellites really simple sequences? *Current Biology*, 8, 4: R132-R134
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Consortium F.B. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 16: 6241-6246
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 2: 233-234
- Slobin L.I. 1980. The role of eukaryotic elongation factor Tu in protein synthesis. *European Journal of Biochemistry*, 110, 2: 555-563
- Solieri L. 2010. Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. *Trends in Microbiology*, 18, 11: 521-530
- Strand M., Prolla T.A., Liskay R.M., Petes T.D. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365, 6443: 274-276
- Squirrell J., Hollingsworth P.M., Woodhead M., Russell J., Lowe A.J., Gibby M., Powell W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, 12, 6: 1339-1348
- Sundstrom P., Lira L.M., Choi D., Linz J.E., Sypherd P.S. 1987. Sequence analysis of the EF-1 alpha gene family of *Mucor racemosus*. *Nucleic Acids Research*, 15, 23: 9997-10006
- Sundstrom P., Smith D., Sypherd P.S. 1990. Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 172, 4: 2036-2045
- Takezaki N., Nei M. 2008. Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. *Genetics*, 178, 1: 385-392
- Taylor J.S., Durkin J.M., Breden F. 1999. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 4: 567-572

- Tirabassi R., Bio B. 2014. Foundations of molecular cloning - past, present and future. New England, New England Biolabs: 16 str.
http://www.neb.uk.com/latest/documents/neb_uk_expressions_jan14.pdf (januar 2016)
- Valenčič V. 2004. Vrednotenje kakovosti deviškega ljčnega olja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 8-19
- Valenčič V., Bučar-Miklavčič M., Golob T. 2009. Assessment of Slovenian table olives produced by traditional technology. *Acta Alimentaria*, 38, 4: 451-457
- Valenčič V., Bandelj Mavsar D., Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Čadež N., Golob T., Raspot P., Smole Možina S. 2010. The impact of production technology on the growth of indigenous microflora and quality of table olives from Slovenian Istria. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 3: 404-410
- Valente P., Gouveia F.C., Lemos G.A., Pimentel D., Elsas J.D., Mendonça-Hagler L.C., Hagler A.N. 1996. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 137, 2-3: 253-256
- Valente L., Kinzy T.G. 2003. Yeast as a sensor of factors affecting the accuracy of protein synthesis. *Cellular and Molecular Life Science*, 60, 10: 2115-2130
- Van den Bosch H., Schutgens R.B., Wanders R.J., Tager J.M. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Annual Review of Biochemistry*, 61: 157-197
- Van der Klei I.J., Veenhuis M. 2002. *Hansenula polymorpha*: a versatile model organism in peroxisome research. V: *Hansenula polymorpha*: biology and applications. Gellissen G. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag: 76-94
- Van der Klei I.J., Yurimoto H., Sakai Y., Veenhuis M. 2006. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 12: 1453-1462
- Veenhuis M., Harder W. 1991. Microbodies. V: *The Yeasts*. Vol. 4. Rose A.H. (ed.). New York, Academic Press: 601-653
- Wagner A. 2000. Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nature Genetics*, 24, 4: 355-361
- Waschk D., Klabunde J., Suckow M., Hollenberg C.P. 2005. Characteristics of the *Hansenula polymorpha* genome. V: *Hansenula polymorpha*: biology and applications. Gellissen G. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag: 95-104
- Weiss S., Samson F., Navarro D., Casaregola S. 2012. YeastIP: a database for identification and phylogeny of Saccharomycotina yeasts. *FEMS Yeast Research*, 13, 1: 117-125

- Yamada Y., Maeda K., Mikata K. 1994. The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposal of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 7: 1245-1257
- Yamada Y., Matsuda M., Maeda K., Mikata K. 1995. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 3: 439-444
- Zinedine A., Mañes J. 2009. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, 20, 4: 334-344
- Zullo B.A., Cioccia G. Ciafardini G. 2010. Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 27, 8: 1035-1042

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Neži Čadež za vse nasvete, pomoč, trud, potrpežljivost in čas, ki mi ga je posvetila med laboratorijskim delom in pri nastajanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Poloni Zalar za strokoven pregled magistrske naloge in predsednici komisije prof. dr. Nini Gunde - Cimerman.

Za hiter pregled magistrskega dela se zahvaljujem tudi Barbari Slemenik.

Na koncu pa bi se rada zahvalila mojim staršem, bratu in fantu za vso finančno in moralno podporo tekom celotnega študija. Hvala za vse, kar ste mi omogočili in mi pomagali na poti do cilja.

PRILOGE

Priloga A: Najpogostejši nukleotidni zaporedji gena za EF-1 α pri *O. deakii*

- a) GGT AAG GGT TCT TTC AAG TAC GCT TGG GTT TTG GAC AAG TTG AAG
GCT GAG AGA GAG AGA GGT ATC ACT ATT GAT ATC GCT CTG TGG AAG
TTC GAG ACT CCA AAG TAC CAT GTT ACC GTT ATT GAT GCT CCA GGT CAC
AGA GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATT ACT GGT ACC TCC CAG GCT GAC TGT
GCT ATC TTG ATT ATT GCT GGA ACT GGT GAG TTC GAG GCT GGT ATT
TCT AAG GAC GGT CAG ACC AGA GAG CAC GCT CTG TTG GCT TTC ACC CTT
GGT GTC AGA CAA CTG ATT GTT GCT GTC AAC AAG ATG GAC TCT GTC CAG
TGG GCT GAG GCT AGA TTC GAG GAG ATT GTC AAG GAG ACC TCC AAC
TTC ATC AAG AAG GTC GGT TAC AAC CCT AAG ACT GTT CCA TTT GTC CCA
ATT TCC GGT TGG AAC GGT GAC AAC ATG ATT GAG TCA TCT CCT AAC TGC
CCA TGG TAC AAG GGA TGG CAA AAG GAG ACC AAG GCT GGT GTC GTC
AAG GGT AAG ACT CTT TTG GAC GCC ATT GAC GCC ATT GAG CCA CCT TCC
AGA CCA TCT GAC AAG CCA TTG AGA CTG CCA TTG CAA GAT GTG TAC
AAG ATC GGT GGT ATT GGA ACT GTT CCA GTC GGA AGA GTC GAG ACC
GGT GTC ATC AAG GCC GGT ATG GTT ACC TTT GCT CCA GCC GGT GTC
ACC ACC GAA GTC AAG TCC GTC GAG ATG CAC CAC GAG CAG CTC ACT
GAG GGT CTT CCA GGT GAC AAC GTC GGA TTC AAC GTC AAG AAC GTT TCC
GTC AAG GAG ATC AGA AGA GGT AAC GTC T
- b) GGT AAG GGT TCT TTC AAG TAC GCT TGG GTT TTG GAC AAG TTG AAG
GCT GAG AGA GAA AGA GGT ATC ACT ATT GAT ATC GCT CTG TGG AAG TTC
GAG ACT CCA AAG TAC CAC GTT ACC GTT ATT GAT GCT CCA GGT CAC AGA
GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATT ACT GGT ACC TCC CAG GCT GAC TGT GCT
ATC TTG ATT ATT GCT GGT GGA ACT GGT GAG TTC GAG GCA GGT ATT TCT
AAG GAC GGT CAG ACC AGA GAG CAC GCT CTG TTG GCT TTC ACC CTT GGT
GTC AGA CAA CTG ATT GTT GCT GTC AAC AAG ATG GAC TCT GTC CAG TGG
GCT GAG GCC AGA TTC GAA GAG ATT GTG AAG GAG ACC TCC AAC TTC
ATC AAG AAG GTC GGT TAC AAC CCT AAG ACT GTT CCG TTC GTC CCA ATT
TCC GGT TGG AAC GGT GAC AAC ATG ATT GAG TCA TCT CCT AAC TGC CCA
TGG TAC AAG GGA TGG CAA AAA GAG ACC AAG GCT GGT GTC GTC AAG
GGT AAG ACT CTT TTG GAC GCC ATT GAC GCC ATT GAG CCA CCT TCC AGA
CCA TCT GAC AAG CCA TTG AGA CTG CCA TTG CAA GAT GTG TAC AAG ATC
GGT GGT ATT GGA ACT GTT CCA GTC GGA AGA GTC GAG ACC GGT GTC ATC
AAG GCC GGT ATG GTT ACC TTT GCT CCA GCC GGT GTC ACC ACC GAA
GTC AAG TCC GTC GAG ATG CAC CAC GAG CAG CTC ACT GAG GGT CTT CCA
GGT GAC AAC GTC GGA TTC AAC GTC AAG AAC GTT TCC GTC AAG GAG
ATC AGA AGA GGT AAC GTC T

Priloga B: Najpogostejši nukleotidni zaporedji gena za EF-1 α pri *O. kolombanensis*

- a) GGT AAG GGT TCT TTC AAG TAC GCT TGG GTT TTG GAC AAG TTG AAG
GCT GAG AGA GAG AGA GGT ATC ACT ATT GAT ATC GCT CTG TGG AAG TTT
GAG ACT CCA AAG TAC CAC GTT ACT GTT ATT GAT GCT CCA GGT CAC
AGA GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATT ACC GGT ACC TCC CAG GCT GAC TGT
GCT ATC TTG ATT ATT GCC GGT GGA ACT GGT GAG TTC GAG GCT GGT ATC
TCT AAG GAC GGT CAG ACC AGA GAG CAC GCT CTT TTG GCT TTC ACC CTT
GGT GTC AGA CAA TTG ATC GTT GCT GTC AAT AAG ATG GAC TCT GTC CAG
TGG TCT GAG GCC AGA TTT GAT GAG ATT GTG AAG GAA ACT TCC AAC TTC
ATC AAG AAG GTC GGT TAC AAC CCA AAG ACC GTT CCA TTC GTT CCA ATT
TCT GGT TGG AAC GGA GAC AAC ATG ATT GAG GCT TCT CCT AAC TGC CCA
TGG TAC AAG GGA TGG CAA AAA GAG ACC AAG GCT GGT GTT GTC AAG
GGT AAG ACC CTT CTT GAT GCC ATC GAC GGT ATT GAG CCA CCT TCC AGA
CCT TCT GAC AAG CCA TTG AGA TTG CCA TTG CAA GAT GTG TAT AAG ATC
GGT GGT ATT GGA ACT GTT CCA GTC GGA AGA GTC GAG ACC GGT GTC ATC
AAG GCA GGT ATG GTC GTT ACT TTT GCT CCA GCC GGT GTC ACC ACC GAA
GTT AAG TCC GTC GAG ATG CAC CAC GAG CAG CTT GTT GAG GGT CTT CCA
GGT GAC AAC GTT GGT TTC AAC GTC AAG AAT GTT TCC GTC AAG GAG ATC
AGA AGA GGT AAC GTC T
- b) GGT AAG GGT TCT TTC AAG TAC GCT TGG GTT TTG GAC AAG TTG AAG
GCT GAG AGA GAG AGA GGT ATC ACT ATT GAT ATC GCT CTG TGG AAG
TTC GAG ACT CCA AAG TAC CAC GTT ACT GTT ATT GAT GCT CCA GGT CAC
AGA GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATT ACC GGT ACC TCC CAG GCT GAC TGT
GCT ATC TTG ATT ATT GCC GGT GGA ACT GGT GAG TTC GAG GCT GGT ATC
TCT AAG GAC GGT CAG ACC AGA GAG CAC GCT CTT TTG GCT TTC ACC CTT
GGT GTC AGA CAA TTG ATC GTT GCT AAC AAG ATG GAC TCT GTC CAG
TGG TCT GAG GCC AGA TTT GAT GAG ATT GTG AAG GAA ACT TCC AAC TTC
ATC AAG AAG GTC GGT TAC AAC CCA AAG ACC GTC CCA TTC GTC CCA ATT
TCT GGT TGG AAC GGA GAC AAC ATG ATT GAG GCT TCT CCT AAC TGC CCA
TGG TAC AAG GGA TGG CAA AAA GAG ACC AAG GCT GGT GTT GTC AAG
GGT AAG ACC CTT CTT GAC GCC ATC GAC GGT ATT GAG CCA CCT TCC AGA
CCT TCT GAC AAG CCA TTG AGA TTG CCA TTG CAA GAT GTG TAC AAG ATC
GGT GGT ATT GGA ACT GTT CCA GTC GGA AGA GTC GAG ACC GGT GTC ATC
AAG GCC GGT ATG GTC GTC ACT TTT GCC CCA GCC GGT GTC ACC ACC GAA
GTC AAG TCC GTC GAG ATG CAC CAC GAG CAG CTT GTT GAG GGT CTT CCA
GGT GAC AAT GTT GGT TTC AAC GTC AAG AAC GTT TCC GTC AAG GAG ATC
AGA AGA GGT AAC GTC T

Priloga C: Najpogosteji nukleotidni zaporedji gena za EF-1 α pri *O. histriana*

- a) GGT AAG GGT TCT TTC AAG TAC GCT TGG GTT TTG GAC AAG TTG AAG GCT GAG AGA GAG AGA GGT ATC ACC ATC GAT ATC GCT CTG TGG AAG TTC GAG ACT CCA AAG TAC CAC GTT ACC GTT ATT GAT GCT CCA GGT CAC AGA GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATT ACT GGT ACT TCC CAG GCT GAC TGT GCT ATC TTG ATT ATT GCC GGA ACT GGT GAG TTC GAG GCT GGT ATC TCT AAG GAC GGT CAG ACC AGA GAG CAC GCT CTG TTG GCT TTC ACC CTT GGT GTC AGA CAG CTG ATT GTT GCT GTC AAC AAG ATG GAC TCT GTC CAG TGG TCT GAG GCC AGA TTT GAG GAG ATT GTC AAG GAG ACT TCC AAC TTC ATC AAG AAG GTT GGT TAC AAC CCA AAG ACT GTT CCA TTC GTC CCA ATT TCT GGT TGG AAC GGA GAC AAC ATG ATT GAG GCT TCT GCT AAC TGC CCA TGG TAC AAG GGA TGG CAA AAA GAG ACC AAG GCT GGT GTC GTC AAG GGT AAG ACT CTT CTG GAT GCC ATT GAC GCC ATT GAG CCA CCT TCC AGA CCT TCT GAC AAG CCA TTG AGA CTT CCA TTG CAA GAT GTC TAC AAG ATC GGT GGT ATT GGA ACT GTT CCA GTC GGA AGA GTC GAG ACC GGT GTC ATC AAG GCT GGT ATG GTT GTT ACT TTC GCC CCA GCC GGT GTC ACT ACC GAA GTC AAG TCC GTC GAG ATG CAC CAC GAG CAG CTT GTT GAG GGT CTT CCA GGT GAC AAC GTT TTC AAC GTC AAG AAC GTT TCC GTC AAG GAG ATC AGA AGA GGT AAC GTC T
- b) GGT AAG GGT TCT TTC AAG TAC GCT TGG GTT TTG GAC AAG TTG AAG GCA GAG AGA GAG AGA GGT ATC ACT ATT GAT ATC GCT CTG TGG AAA TTC GAG ACT CCA AAG TAC CAC GTT ACT GTT ATT GAT GCT CCA GGT CAC AGA GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATT ACC GGT ACT TCC CAG GCT GAC TGT GCT ATC TTG ATT ATT GCC GGT GGA ACT GGT GAG TTT GAG GCT GGT ATC TCT AAG GAC GGT CAG ACC AGA GAG CAC GCT CTG TTG GCT TTC ACC CTT GGT GTC AGA CAG CTG ATT GTT GCT GTC AAC AAG ATG GAC TCT GTC CAG TGG TCC GAG GCC AGA TTT GAG GAG ATT GTC AAG GAA ACG TCC AAC TTC ATC AAG AAG GTC GGT TAC AAT CCA AAG ACC GTT CCA TTC GTC CCA ATT TCT GGT TGG AAT GGA GAC AAC ATG ATT GAG GCT TCT GCC AAC TGC CCA TGG TAC AAG GGA TGG CAA AAA GAG ACC AAG GCT GGT GTC GTC AAG GGT AAG ACC CTT CTG GAC GCC ATT GAT GCT ATT GAG CCA CCT TCC AGA CCT TCT GAC AAG CCA TTG AGA CTG CCA TTG CAG GAT GTG TAC AAG ATT GGT GGT ATT GGA ACT GTT CCA GTC GGA AGA GTC GAG ACC GGT GTC ATC AAG GCT GGT ATG GTC GTT ACT TTC GCC CCA GCC GGT GTC ACT ACC GAA GTC AAG TCC GTC GAG ATG CAC CAC GAA CAG CTT GTT GAG GGT CTT CCA GGT GAC AAT GTT GGC TTC AAC GTC AAG AAC GTT TCC GTT AAG GAG ATC AGA AGA GGT AAC GTC T

Priloga D: Minimalno vpeto drevo narejeno na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za EF-1 α , ki prikazuje variante kopij gena za EF-1 α znotraj treh vrst: *O. kolombanensis*, *O. histriatica* in *O. deakii*. Vsak krog predstavlja varianto kopije gena za EF-1 α , velikost in delež v krogu pa število vzorcev, ki so se uvrstili v to varianto kopije gena za EF-1 α

