

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko FLAJŠMAN

**DOLOČANJE VIRULENTNIH DEJAVNIKOV
FITOPATOGENE GLIVE *Verticillium albo-atrum* Z
MUTACIJSKO ANALIZO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI DOKTORSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM BIOMEDICINA
ZNANSTVENO PODROČJE GENETIKA

Marko FLAJŠMAN

**DOLOČANJE VIRULENTNIH DEJAVNIKOV FITOPATOGENE
GLIVE *Verticillium albo-atrum* Z MUTACIJSKO ANALIZO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IDENTIFICATION OF VIRULENCE FACTORS OF THE
PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *Verticillium albo-atrum* BY
MUTATION ANALYSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina, znanstveno področje genetika. Doktorsko delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, genetiko, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Del raziskave je bil opravljen na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu. Delo je bilo financirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (MR štipendija in projekt P4-0077).

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 13.11.2013 (po pooblastilu Senata Univerze v Ljubljani z dne 20.1.2009) je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, znanstveno področje genetika. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Branka Javornik.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: viš. znan. sod. dr. Sebastjan Radišek
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

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

Datum zagovora: 2. junij 2016

Podpisani izjavljam, da je disertacija 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.

Marko FLAJŠMAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 577.2:579.253.4:632.4:602.6:582.28(043.3)
KG fitopatogene glive/*Verticillium albo-atrum*/mutacijska analiza/viruletni dejavniki
AV FLAJŠMAN, Marko, univ. dipl. bioteh., dipl. inž. agr (UN)
SA JAVORNIK, Branka (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina, znanstveno področje genetika
LI 2016
IN DOLOČANJE VIRULENTNIH DEJAVNIKOV FITOPATOGENE GLIVE
Verticillium albo-atrum Z MUTACIJSKO ANALIZO
TD Doktorska disertacija
OP XII, 139 str., 9 pregl., 30 sl., 3 pril., 331 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Fitopatogeni mikroorganizmi ob napadu rastlin izločajo različne virulentne dejavnike (efektorje, encime za razgradnjo celične stene ali fitotoksine), s katerimi vplivajo na celično strukturo in celične procese gostitelja z namenom vzpostaviti uspešno kolonizacijo. V doktorskem delu smo proučevali virulentne dejavnike fitopatogene glive *Verticillium nonalfiae*, ki na hmelju povzroča verticilijsko uvelost hmelja, bolezen, ki lahko ogrozi pridelovanje hmelja. Na podlagi predhodnih genomskeh, proteomskeh, in transkriptomskih študij glive in interakcij *V. nonalfiae* – hmelj smo izbrali kandidatne gene, ki bi lahko bili vpleteni v virulenco. Kandidatne gene smo testirali s funkcionalno analizo, ki je vključevala pridobitev mutantov z izbitimi tarčnimi geni in pripravo njihovih komplementacijskih mutantov. Z mutatni smo nato okužili testne rastline ter z ocenjevanjem bolezenskih znamenj določili vpliv mutacije glivnega gena na pojav bolezenskih znamenj. Kot potencialne testne rastline smo preizkusili več vrst rastlin, vendar se je hmelj izkazal kot najbolj zanesljiva testna rastlina za naš patosistem. S proteomskim pristopom so bili odkriti trije proteini v ksilemskem soku hmelja, ki jih gliva izloča med kolonizacijo rastline. Za dva, lignin-peroksidazo in majhen bazični protein, smo z mutacijsko analizo potrdili njuno vlogo v virulenci. Predvidevamo, da lahko ima peroksidaza dvojno vlogo pri okužbi hmelja z *V. nonalfiae*, in sicer bi lahko bila vpletena v obrambo glive pred napadi gostitelja kot tudi v procese pospeševanja kolonizacije. Vloga majhnega bazičnega proteina, ki je pri vrstah iz rodu *Verticillium* prvi efektorski protein odkrit v ksilemskem soku po okužbi, zaenkrat še ni znana. S cDNA-AFLP analizo sta bila v transkriptomu okuženega hmelja določena protein z vezavno domeno za hitin, za katerega smo ugotovili, da nima vpliva na virulenco, in ohranjen hipotetični protein z neznano funkcijo, za katerega se je izkazalo, da ima negativen vpliv na virulenco *V. nonalfiae*. S pristopom primerjalne genomike so bili določeni genski modeli, ki se nahajajo samo v letalnem patotipu *V. nonalfiae*. Izmed njih smo na podlagi različnih kriterijev izbrali najboljše kandidate. Funkcionalna analiza delecijskih mutantov za osem kandidatnih genov je pokazala, da en gen zaviralno deluje na virulenco, trije geni v virulenco niso vpleteni, štirje geni pa signifikantno prispevajo k normalni stopnji povzročitve obolenja na testnih rastlinah. Potrjeni štirje geni iz letalnega patotipa specifične genomske regije so, poleg verjento nekaj drugih zaenkrat še neznanih genov, razlog za razliko v stopnji virulence med letalnim in blagim patotipom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.2:579.253.4:632.4:602.6:582.28(043.3)
CX phytopathogenic fungi/*Verticillium albo-atrum*/mutation analysis/ virulence factors
AU FLAJŠMAN, Marko
AA JAVORNIK, Branka (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme
in Biomedicine, Scientific Field Genetics
PY 2016
TI IDENTIFICATION OF VIRULENCE FACTORS OF THE PHYTOPATHOGENIC
FUNGUS *Verticillium albo-atrum* BY MUTATION ANALYSIS
DT Doctoral Dissertation
NO XII, 139 p., 9 tab., 30 fig., 3 ann., 331 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Phytopathogenic microorganisms secret various virulence factors (effectors, cell wall-degrading enzymes or phytotoxins) during plant infection, which modulate the host cell structure and processes in order to colonize the plant. In this doctoral project we studied the virulence factors of the phytopathogenic fungus *Verticillium nonalfafae*, which infects hop and causes important economic losses in hop production. Previous genomic, proteomic, and transcriptomic studies of *V. nonalfafae* – hop interactions revealed an arsenal of candidate virulence genes that might be implicated in fungal virulence. For functional analysis of candidate virulence genes, we generated knock-out and complementation mutants, which were used in phytopathogenicity essay and their changes in virulence were monitored by symptom evaluation. We used different host plants for artificial infection and hop proved to be most suitable host for phytopathogenicity essay in this pathosystem. Proteomic analysis of xylem sap revealed three abundant fungal proteins that are secreted during fungal colonization of the plant. By functional analysis, implication in fungal virulence was confirmed for lignin-degrading peroxidase and small secreted protein. Lignin-degrading peroxidase may have a double role for fungus, e.g. implication in protection against plant defense system and promotion of fungal colonization. Small secreted protein is the first *Verticillium* spp. effector protein to be identified in xylem sap and its role in virulence so far remains unknown. cDNA-AFLP analysis of transcriptome of infected hop revealed two candidates; chitin binding protein turned out not to be implicated in fungal virulence and conserved hypothetical protein with unknown function, which negatively regulates the virulence of *V. nonalfafae*. Gene models that only appeared in the lethal pathotype specific region of *V. nonalfafae* were identified by comparative genomics. Best candidates were chosen on the basis of various criteria. Functional analysis of gene deletion mutants for 8 candidate genes revealed that one gene is negatively implicated in fungal virulence, three genes have no impact on virulence and four genes have significant importance for the virulence of *V. nonalfafae*. The last four mentioned genes from the lethal pathotype specific genomic region, in addition to some still unknown genes, are the reason for difference in virulence between lethal and mild pathotypes.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Seznam prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA, TAKSONOMIJA IN NOMENKLATURA GLIV IZ RODU <i>Verticillium</i>	3
2.1.1 Nova klasifikacija je v rod <i>Verticillium</i> sensu stricto uvrstila 10 vrst	3
2.2 MORFOLOGIJA IN MORFOLOŠKE RAZLIKE MED VRSTAMI IZ RODU <i>Verticillium</i>	4
2.3 RAZVOJNI KROG	5
2.4 GENETSKI MEHANIZMI, KI OMOGOČajo VARIABILNOST	7
2.5 <i>Verticillium nonalfafae</i>	8
2.5.1 Morfološke lastnosti	8
2.5.2 Gostiteljske rastline in pojav bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah	8
2.5.3 Verticilijska uvelost hmelja	10
2.5.4 Virulentni dejavniki v <i>V. nonalfafae</i>	10
2.6 MEHANIZMI ODPORNOSTI RASTLIN NA BOLEZNI	11
2.6.1 Splošen odziv rastlinske obrambe pred mikroorganizmi	11
2.6.2 Specifičen odziv rastlinske obrambe pred mikroorganizmi	12
2.6.3 Povezava mehanizmov rastlinskega obrambnega odgovora	13
2.7 VIRULENTNI DEJAVNIKI V GLIVNIH FITOPATOGENIH	13
2.7.1 Efektorji	14
2.7.2 Encimi za razgradnjo celične stene	15
2.7.3 Fitotoksi	16
2.8 VIRULENTNI DEJAVNIKI V <i>Verticillium</i> spp., DOLOČENI Z MUTACIJSKO ANALIZO	17
2.8.1 Sekvencirani genomi vrst <i>Verticillium</i> spp.	18
2.8.2 Geni, ki so povezani z vdorom patogena v rastlino in prilagoditvijo na okolje	18
2.8.3 Geni, ki so pomembni za obrambo patogena pred prvim nivojem rastlinske obrambe	23
2.8.4 Geni, ki so pomembni za preprečevanje rastlinske signalizacije	25
2.8.5 Efektorski geni	25
2.8.5.1 NLP proteini	25
2.8.5.2 LysM proteini	26
2.8.5.3 Ave1 je prvi avirulentni efektor, odkrit v <i>Verticillium</i> spp.	27
2.8.6 Transkripcijski faktorji	28
2.8.7 Geni, ki so udeleženi v virulenco preko prenosa signala	29
2.9 METODE GENSKE TRANSFORMACIJE GLIV	34
2.9.1 Metoda ATMT (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>-mediated transformation) za transformacijo gliv	36

2.10	METODE MUTACIJSKE ANALIZE GLIV	37
2.10.1	Tarčna modifikacija genov	38
2.10.1.1	Homologna rekombinacija	38
2.10.1.2	Metode kloniranja vektorjev za tarčno modifikacijo genov	39
2.10.1.2.1	USER Friendly kloniranje	40
2.10.2	Naključna insercijska mutageneza	42
2.10.3	Utišanje genov preko RNAi mehanizma	43
2.10.4	Novejše metode genske manipulacije glivnih genomov	43
3	MATERIAL IN METODE	43
3.1	IZOLATA glive <i>Verticillium nonalfalfa</i>	45
3.2	IZOLACIJA VISOKOMOLEKULARNE GLIVNE DNA IZ IZOLATA T2	45
3.3	IZBOR KANDIDATNIH GENOV ZA IZBIJANJE IZ GENOMA	46
3.3.1	Kandidatni virulentni geni, določeni <i>in planta</i>	46
3.3.1.1	Proteomska analiza ksilemskih tekočin okuženih in neokuženih rastlin neodpornega kultivarja hmelja	46
3.3.1.2	cDNA-AFLP analiza transkriptomov odpornega in neodpornega kultivarja hmelja	46
3.3.2	Kandidatni virulentni geni, določeni <i>in silico</i>	47
3.4	USER KLONIRANJE KNOCK-OUT PLAZMIDA	47
3.4.1	Začetni oligonukleotidi za PCR reakcije pri USER kloniraju	47
3.4.2	PCR pomnoževanje homolognih rekombinantnih sekven (HRS) iz glivnega genoma	48
3.4.2.1	Analiza uspešnosti PCR reakcije	48
3.4.3	Priprava plazmida pRF-HU2 za kloniranje	49
3.4.3.1	Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5- α	49
3.4.3.2	Izolacija plazmida pRF-HU2 iz transformiranih celic <i>E. coli</i> DH5- α	49
3.4.3.3	Restrikcija plazmida pRF-HU2 za namene USER kloniranja	50
3.4.3.4	Čiščenje restrikcijske mešanice pRF-HU2 plazmida	50
3.4.4	Reakcija USER Friendly kloniranja	51
3.4.5	Preverjanje kloniranega knock-out plazmida s PCR na osnovi kolonije	51
3.5	ELEKTROPORACIJA KNOCK-OUT PLAZMIDA V <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
3.5.1	Priprava kompetentnih celic bakterij <i>A. tumefaciens</i> za elektroporacijo	52
3.5.2	Elektroporacija celic bakterij <i>A. tumefaciens</i> LBA4404	53
3.5.3	Preverjanje plazmida v bakterijah <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 s PCR na osnovi kolonije	53
3.5.4	Shranjevanje bakterij <i>A. tumefaciens</i> z zamrzovanjem	53
3.6	GENSKA TRANSFORMACIJA GLIVE <i>V. nonalfalfa</i>	54
3.6.1	Priprava kulture <i>A. tumefaciens</i> s knock-out plazmidom	54
3.6.2	Priprava konidijev <i>V. nonalfalfa</i>, izolat T2	54
3.6.3	Postopek transformacije glive <i>V. nonalfalfa</i>, izolat T2	54
3.6.4	Preverjanje transformantov s PCR metodo	55
3.6.4.1	Izolacija glivne DNA za namene PCR testiranja	55
3.6.4.2	Potrjevanje delecijskih mutantov s PCR testiranjem	56
3.7	UMETNO OKUŽEVANJE TESTNIH RASTLIN Z GLIVO <i>V. nonalfalfa</i>	57
3.7.1	Umetno okuževanje paradižnika in test reisolacije	57
3.7.2	Umetno okuževanje tobakovca (<i>Nicotiana benthamiana</i>), jajčevca (<i>Solanum melongena</i>) in rička (<i>Camelina sativa</i>)	58

3.7.3	Umetno okuževanje hmelja, test konidiacije in test reizolacije	59
3.8	EKSPRESIJSKI VZORCI GENOV <i>VnaPRX1.1277</i> IN <i>VnaSSP4.2</i>	60
3.8.1	Okuževanje in vzorčenje rastlin hmelja	60
3.8.2	Izolacija celokupne RNA iz hmelja in prepis v cDNA	61
3.8.3	Preverjanje ekspresije s kvantitativnim PCR v realnem času (RT-qPCR)	61
3.9	KOMPLEMENTACIJA genov <i>VnaPRX1.1277</i> IN <i>VnaSSP4.2</i>	61
3.9.1	Priprava komplementacijskega plazmida	61
3.9.1.1	Pomnoževanje zeomicinske kasete iz plazmida pBT081 za pripravo osnovnega komplementacijskega plazmida kHUEn	62
3.9.1.2	Restrikcija plazmida pRF-HUE	63
3.9.1.3	Kloniranje kHUEn plazmida	63
3.9.1.4	Priprava komplementacijskih plazmidov za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i>	64
3.9.2	Komplementacijska transformacija in testiranje virulentnosti komplementacijskih mutantov na testnih rastlinah	64
4	REZULTATI	66
4.1	IZBRANI KANDIDATNI GENI ZA FUNKCIJSKO ANALIZO	66
4.1.1	<i>In planta</i> določeni kandidatni geni	66
4.1.2	<i>In silico</i> določeni kandidatni geni	67
4.2	KLONIRANJE KNOCK-OUT PLAZMIDOV	70
4.2.1	Pomnoževanje HRS zaporedij	70
4.2.2	Restrikcija plazmida pRF-HU2	71
4.2.3	Preverjanje knock-out plazmida s PCR na osnovi kolonije	72
4.3	PRIDOBIVANJE DELECIJSKIH MUTANTOV	72
4.4	PREVERJANJE EKSPRESIJE GENOV <i>VnaPRX1.1277</i> IN <i>VnaSSP4.2</i> V DIVJEM TIPU <i>V. nonalfalfa</i> (IZOLAT T2)	73
4.5	TEST KOMPLEMENTACIJE	74
4.5.1	Kloniranje osnovnega komplementacijskega plazmida kHUEn	74
4.5.2	Kloniranje komplementacijskih plazmidov za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i>	75
4.5.3	Komplementacijska transformacija delecijskih mutantov Δ<i>VnaPRX1.1277</i> in Δ<i>VnaSSP4.2</i> ter potrjevanje komplementacijskih mutantov	76
4.6	TESTI UMETNEGA OKUŽEVANJA RASTLIN	77
4.6.1	Test umetnega okuževanja paradižnika	77
4.6.2	Test umetnega okuževanja tobakovca, jajčevca in rička	80
4.6.3	Test umetnega okuževanja hmelja	83
4.6.3.1	Testiranje delecijskih in komplementacijskih mutantov za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i>	84
4.6.3.2	Testiranje delecijskih mutantov za gene <i>VnaCBD8.213</i> , <i>VnaHYPO7.546</i> , <i>Vna9gUN.496</i> , <i>Vna11g4.791</i> in <i>Vna12gUN.279</i>	89
4.6.3.3	Testiranje delecijskih mutantov za gene <i>Vna4gUN.245</i> , <i>Vna5g9</i> , <i>Vna6g4.792</i> , <i>Vna8gUN.246</i> in <i>Vna10g4.803</i>	94
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	98
5.1	GENSKA TRANSFORMACIJA GLIVE <i>V. nonalfalfa</i>	98
5.2	GOSTITELJSKA SPECIFIČNOST GLIVE <i>V. nonalfalfa</i>	99
5.3	VPLIV KANDIDATNIH VIRULENTNIH GENOV NA VIRULENCO GLIVE <i>V. nonalfalfa</i>	103
5.3.1	<i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> sta nova virulentna dejavnika v letalnem patotipu PV1 (genotip PG2) glive <i>V. nonalfalfa</i>	104

5.3.2	Gen <i>VnaCBD8.213</i> ne vpliva na virulenco letalnega patotipa PV1 (genotip PG2) gline <i>V. nonalfalfa</i>e, gen <i>VnaHYPO7.546</i> ima negativen vpliv	107
5.3.3	<i>In silico</i> določeni geni kažejo različne vplive na virulenco patotipa PV1 (genotip PG2) gline <i>V. nonalfalfa</i>e	109
6	POVZETEK (SUMMARY)	113
6.1	POVZETEK	113
6.2	SUMMARY	116
7	VIRI	120
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Virulentni dejavniki v glivah iz rodu <i>Verticillium</i> .	32
Preglednica 2: Metode genske transformacije filamentoznih gliv (Rivera in sod., 2014; Gómez-Lim in sod., 2015; Jiang in sod., 2013; Ruiz-Diez, 2002; Jackson, 1995).	34
Preglednica 3: Zaporedja 9 bp dolgih preveskov na 5' koncu specifičnih ZO za pomnoževanje HRS iz glivnega genoma.	48
Preglednica 4: Ime <i>in planta</i> gena, okrajšava imena, genski model in dolžina za izbrane gene.	66
Preglednica 5: Genski model in mesto v genomu <i>V. nonalfafae</i> , okrajšava imena, dolžina regije, število cisteinskih ostankov in ekspresija za izbrane <i>in planta</i> regije.	68
Preglednica 6: Dolžine HRS1 in HRS2 zaporedij za kandidatne virulentne gene.	70
Preglednica 7: Ocena sporulacije, frekvenca obolenja rastlin, bolezenski indeks DSI in rAUDPC vrednosti za dva poskusa okuževanja hmelja z delecijskimi in komplementacijskimi mutanti za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> .	84
Preglednica 8: Ocena sporulacije, frekvenca obolenja rastlin, bolezenski indeks in rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja z delecijskimi mutanti za gene <i>VnaCBD8.213</i> , <i>VnaHYPO7.546</i> , <i>Vna9gUN.496</i> , <i>Vna11g4.791</i> in <i>Vna12gUN.279</i> .	89
Preglednica 9: Ocena sporulacije, frekvenca obolenja rastlin, bolezenski indeks DSI in rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja z delecijskimi mutanti za gene <i>Vna4gUN.245</i> , <i>Vna5g9</i> , <i>Vna6g4.792</i> , <i>Vna8gUN.246</i> in <i>Vna10g4.803</i> .	94

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Razvojni krog glice <i>Verticillium nonalfalfa</i> (Klimes in sod., 2015).	6
Slika 2: Melaniziran trajni micelij glice <i>V. nonalfalfa</i> .	8
Slika 3: Zamašitev prevodnih žil (Cregeen in sod., 2015).	9
Slika 4: Mehanizem prenosa T-DNA iz <i>A. tumefaciens</i> v glivno celico (Michielse in sod., 2005).	37
Slika 5: Prikaz homologne rekombinacije (Bhaduria in sod., 2009).	38
Slika 6: USER Friendly kloniranje za pripravo knock-out vektorja v enem koraku (Frandsen in sod., 2008).	41
Slika 7: Shema preverjanja sestavljenega knock-out plazmida.	51
Slika 8: PCR pomnoževanje HRS1 in HRS2 iz genoma izolata T2 glice <i>V. nonalfalfa</i> za kandidatne virulentne gene.	71
Slika 9: Razrezan plazmid pRF-HU2.	72
Slika 10: Transformanti <i>V. nonalfalfa</i> na selekcijskem gojišču.	73
Slika 11: Izražanje genov <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> .	74
Slika 12: Kloniranje osnovnega komplementacijskega plazmida kHUEn.	75
Slika 13: Kloniranje komplementacijskih plazmidov za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> .	76
Slika 14: Komplementacijski transformanti za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> .	76
Slika 15: PCR določanje komplementacijskega mutanta za gen <i>VnaPRX1.1277</i> .	77
Slika 16: PCR določanje komplementacijskega mutanta za gen <i>VnaSSP4.2</i> .	77
Slika 17: Rezultati poskusa umetnega okuževanja paradižnika (20 dpi).	78
Slika 18: Rezultati poskusa umetnega okuževanja paradižnika (54 dpi).	79
Slika 19: Rezultati okuževanja paradižnika na Nizozemskem.	80
Slika 20: Rezultati poskusa umetnega okuževanja tobakovca.	81
Slika 21: Rezultati poskusa umetnega okuževanja jajčevca.	82
Slika 22: Rezultati poskusa umetnega okuževanja rička.	83
Slika 23: Rezultati poskusa umetnega okuževanja hmelja z mutanti za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> .	85
Slika 24: Povprečne DSI vrednosti rastlin hmelja pri okuževanju z mutanti za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> .	87
Slika 25: Povprečne rAUDPC vrednosti za mutantne za gena <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i> .	88
Slika 26: Test umetnega okuževanja hmelja maj 2015.	90
Slika 27: DSI krivulje za poskus okuževanja hmelja maj 2015.	92
Slika 28: Povprečne rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja maj 2015.	93
Slika 29: DSI krivulje za poskus okuževanja hmelja avgust 2013.	96
Slika 30: Povprečja rangov rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja avgust 2013.	97

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Začetni oligonukleotidi (ZO), ki so bili uporabljeni v doktorskem delu. V opombah je naveden namen uporabe ZO.
- Priloga B: Dolžine predvidenih PCR produktov pri preverjanju knock-out plazmidov in slike gelske elektroforeze preverjanja posameznega knock-out plazmida. Na sliki gelov so prikazani dolžinski standard in fragmenti posameznih specifičnih ZO za knock-out plazmid za posamezen gen.
- Priloga C: Geli s PCR fragmenti za enega delecjskega mutanta za vsak kandidatni gen. Odsotnost ali prisotnost pričakovanih PCR produktov na gelu potrjuje izbitje kandidatnega gena.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
Cas	s CRISPR povezani proteini (angl. CRISPR-associated proteins)
CAZy	encimi za razgradnjo ogljikovih hidratov (angl. Carbohydrate-Active enZYmes)
CBM	ogljikohidratno-vezavni modul (angl. carbohydrate-binding module)
CRISPR	gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (angl. Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats)
CWDE	encim za razgradnjo celične stene (angl. cell wall degrading enzymes)
DAMP	s poškodbo povezani molekulski motivi (angl. Damage-Associated Molecular Patterns)
DSI	bolezenski indeks DSI (angl. Disease Severity Index)
dpi	dnevi po inokulaciji (angl. days post inoculation)
ETI	z efektorji sprožena imunost (angl. effector triggered immunity)
ETS	z efektorji povzročena občutljivost (angl. effector-triggered susceptibility)
gRNA	vodeča RNA (angl. guide RNA)
HR	hipersenzitiven odgovor (angl. hypersensitive response)
HRS	homologno rekombinantno zaporedje (angl. homologous recombination sequence)
IM	indukcijsko gojišče (angl. induction medium)
kbp	kilo bazni par
LS	linijsko specifičen (angl. lineage specific)
MAMP	mikrobeni ohranjeni molekulski vzorci (angl. microbe-associated molecular patterns)
mRNA	informacijska RNA molekula (angl. messenger RNA)
NHEJ	nehomologno združevanje koncev (angl. nonhomologous end joining)
NLP	angl. necrosis- and ethylene-inducing-like proteins
PAMP	s patogeni povezani molekulski motivi (angl. pathogen-associated molecular patterns)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PTI	z molekulami PAMP sprožena imunost (angl. PAMP triggered immunity)
REMI	angl. restriction enzyme mediated integration
RISC	ribonukleoprotein (angl. RNA induced silencing complex)
RNAi	interferenčna RNA (angl. RNA interference)
ROS	reaktivni kisikovi delci (angl. reactive oxygen species)
SA	salicilna kislina
SAR	sistemski pridobljena odpornost (angl. systemic acquired resistance)
siRNA	mala interferenčna RNA (angl. small interfering RNA)
SSP	mali sekrecijski protein (angl. small secreted protein)
TALE	angl. transcription activator-like effectors
TALEN	angl. TALE-nuclease
TE	transponzibilni elementi (angl. transposable elements)
UCS	angl. USER cloning site
USER	angl. uracil-specific excision reagent
VCG	vegetativne kompatibilne skupine (angl. vegetative compatibility groups)
ZFN	nukleaze cinkovih prstov (angl. zinc finger nucleases)

1 UVOD

Biotski stres, ki ga povzročajo glive, bakterije in virusi, ogroža pridelovanje kmetijskih rastlin (Boyd in sod., 2013). Fitopatogene glive povzročajo veliko ekonomsko škodo, ker ogrožajo pridelovanje rastlin na poljih, lahko pa napadejo pridelke šele v fazi skladiščenja. Ocena je, da je v kmetijski proizvodnji letna izguba zaradi glivičnih bolezni približno 10 % pridelka (Oerke, 2006). Rastlinski patogeni ne samo zmanjšujejo količino pridelka, ampak tudi znižujejo njegovo kakovost s sproščanjem toksinov, ki so nevarni človeškemu zdravju (Möbius in Hertweck, 2009).

Glivni patogeni predstavljajo resno grožnjo ne samo za rastline, ampak tudi za ljudi, živali ter ostale organizme v ekosistemih. Zato je potrebno nenehno razvijati diagnostične metode in ukrepe, ki bi omogočali trajno zaščito pred glivnimi patogeni (Oliver in Hewitt, 2014). Ključ do razvoja novih metod zaščite rastlin je poznavanje mehanizmov patogenosti, ki jih glive uporabljajo, da povzročajo bolezenska znamenja (Klosterman in sod., 2011). Analiza virulentnih dejavnikov fitopatogenih gliv nam omogoča vpogled v zapleten sistem glivno-rastlinskih interakcij in določanje ključnih igralcev v odnosu med glivo in njenim gostiteljem (Bhaduria in sod., 2009). S pristopom funkcijске genomike je že bilo odkritih veliko glivnih genov, ki imajo pomembno vlogo pri patogenezi in/ali virulenci (Ellis in sod., 2009; lo Presti in sod., 2015). Njihova biološka vloga je bila validirana z metodami posredne in neposredne genske transformacije vnosa vektorja v gostiteljsko celico, kjer lahko pride do tarčne prekinitev in izbijanja genov, utišanja ali povečanja ekspresije genov ter naključne insercije eksogene DNA v genom (Bhaduria in sod., 2009; Kück in Hoff, 2010; Jiang in sod., 2013; Cairns in sod., 2016).

V rod *Verticillium* spadajo tako glive, ki lahko parazitirajo različne organizme (rastline, žuželke, nematode, ostale glive) kot tudi drugim organizmom neškodljive vrste (Pegg in Brady, 2002; Bidochka in sod., 1999; Inderbitzin in sod., 2011). Fitopatogeni mikroorganizmi, ki želijo uspešno kolonizirati gostitelja, morajo zatreći ali omejiti delovanje njegove obrambe. Med okužbo patogeni iz rodu *Verticillium* izločajo različne molekule, ki vplivajo na strukturo in funkcijo gostiteljskih celic. *Verticillium* vrste poleg encimov za razgradnjo celične stene in fitotoksinov sproščajo še druge molekule, ki so udeležene pri uspešni kolonizaciji rastlin in pri razvoju bolezenskih znamenj, kot so nekroza listov in venenje rastline. Te molekule poimenujemo z različnimi izrazi, npr. elicitorji, faktorji patogeneze, virulentni dejavniki ali efektorji. Efektorji je izraz, ki se danes največ uporablja. Prav efektorski proteini iz bakterij, gliv in oomicet so v zadnjih letih predmet številnih raziskav in področje poznavnja delovanja posameznih efektorjev se hitro širi (lo Presti in sod., 2015).

Fitopatogene vrste iz rodu *Verticillium* so v zadnjih letih predmet številnih funkcijskih raziskav. Vpletene v patogenost in virulenco je bila potrjena za nekatere encime za razgrajevanje celične stene, ki so znani faktorji nastanka patogeneze (Walton, 1994). Vpliv na patogenezo je potrjen tudi za nekaj transkripcijskih faktorjev in encimov, ki omogočajo glivam prilagoditev na okolje in zaščito pred delovanjem gostiteljske obrambe. Leta 2012 je bil odkrit prvi mali sekretorni protein, pravi efektor, v rodu *Verticillium*, in sicer Ave1 iz *V. dahliae* (de Jonge in sod., 2012). Za efektor je bilo potrjeno, da se veže na

receptor Ve1 iz paradižnika (Kawchuk in sod., 2001), ki je do sedaj edini poznan lokus za odpornost na verticilijsko uvelost v rastlinah (Klimes in sod., 2015). Nedavno smo Flajšman in sod. (2016) poročali, poleg o encimu lignin-peroksidazi, tudi o prvem majhnem sekretornem proteinu v vrsti *V. nonalfalfa*, ki ima efektorjem podobne strukturne lastnosti in je udeležen v virulenci glive, vendar njegov mehanizem delovanja zaenkrat še ni poznan.

Do danes je po našem vedenju potrjenih skupno 30 genov, ki sodelujejo v patogenezi in/ali virulenci gliv iz rodu *Verticillium*. Največ virulentnih genov je določenih v vrsti *V. dahliae*, ki je tudi najbolj razširjena fitopatogena vrsta znotraj rodu, saj okužuje preko 200 rastlinskih vrst iz 14 rastlinskih družin (Agrios, 1997; Fradin in Thomma, 2006). Predmet večih raziskav je še *V. longisporum* in v manjši meri tudi *V. albo-atrum sensu lato*, medtem ko funkcijskih analiz na drugih predstavnikih rodu *Verticillium* v literaturi ni zaslediti.

Gliva *V. nonalfalfa* je pomemben fitopatogen v slovenskem prostoru, ker povzroča velike enkonomski izgube pri pridelavi hmelja. Bolezen se imenuje verticilijska uvelost hmelja. Najboljša možnost za zagotavljanje pridelka v prizadetih hmeljiščih je uporaba na bolezen odporne hmeljne kultivarje (Radišek in sod., 2006). V pričujoči raziskavi smo proučevali vzroke za visoko virulenco letalnega patotipa *V. nonalfalfa*.

Raziskovalni cilji

Pri proučevanju dejavnikov virulence fitopatogene glive *V. nonalfalfa* smo izhajali iz predhodno identificiranih kandidatnih genov, ki so bili določeni na dva načina:

- Kandidatni geni, določeni *in planta*:
 - pri proteomske primerjavi ksilemov z letalnim patotipom PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa* okuženih in neokuženih rastlin neodpornega kultivarja hmelja 'Celeia' so bili določeni trije glivni proteini, ki so se med okužbo v ksilemski sok izločali v takih količinah, da jih je bilo mogoče zaznati na gelu 2-D elektroforeze;
 - pri diferencialni ekspresijski analizi transkriptoma neodpornega kultivarja hmelja 'Celeia' in odpornega kultivarja 'Wye Target' okuženih z letalnim patotipom PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa* so bila poleg hmeljnih transkriptov identificirana tudi glivna zaporedja, od katerih smo izbrali dve kot kandidatna virulentna gena.
- Kandidatni geni določeni *in silico*:
 - z metodami visoko zmogljivega sekvenciranja, primerjalne genomike in RNA-seq podatkov so bili *in silico* določeni kandidatni virulentni geni v regiji genoma, ki je specifična za letalne patotipe glive *V. nonalfalfa*. Za funkcijsko analizo je bilo izbranih 12 genov.

Cilj doktorske disertacije je bil z mutacijsko analizo ugotoviti, ali imajo izbrani kandidatni geni vpliv na virulenco fitopatogene glive *V. nonalfalfa*. V pričujoči raziskavi se bo za obravnavano glivo uporabila klasifikacija po Inderbitzin in sod. (2011a), zato bomo glivo poimenovali z imenom *V. nonalfalfa* čez celotno disertacijo (ne pa z imenom *V. albo-atrum*, kot je navedeno v naslovu disertacije).

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA, TAKSONOMIJA IN NOMENKLATURA GLIV IZ RODU *Verticillium*

Letos mineva 200 let, odkar je bil rod *Verticillium* prvič opisan. Leta 1816 je nemški biolog Ness von Esenbeck opazil, da imajo konidiofori neznanega glivnega micelija vretenast razrast in ime rodu izpeljal iz latinske besede *verticillus* ali vretence. Vrsto je poimenoval *Verticillium tenerum* (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Leta 1879 sta nemška znanstvenika Reinke in Berthold opisala prvo fitopatogeno vrsto, in sicer sta iz okuženih rastlin krompirja izolirala vrsto *V. albo-atrum* Reinke & Berthold. Leta 1913 pa je Klebahn iz dalij izoliral vrsto, ki jo je poimenova *V. dahliae* Klebahn in se po tvorbi mikrosklerocijev razlikuje od *V. albo-atrum* (Pegg in Brady, 2002). Zaradi mnogih skupnih gostiteljskih rastlin, izgube sposobnosti tvorbe trajnih organov in pigmenta v procesu umetnega vzdrževanja so mnogi raziskovalci priznavali samo vrsto *V. albo-atrum* in je prihajalo do različnih taksonomskeh opisov vrste *V. dahliae*. Šele leta 1949 je bilo na osnovi dobro opisanih morfoloških, fizioloških in patoloških značilnosti dokončno sprejeto, da gre za dve ločeni vrsti (Radišek in Javornik, 2011). Barbara in Clewes (2003) sta v rod *Verticillium* uvrstila 6 vrst: *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* in *V. theobromae*. Zare in sod. (2007) so vrsti *V. nigrescens* in *V. theobromae* uvrstili v nova rodova (*Gibellulopsis* in *Musicillium*), tako so v rodu *Verticillium* ostale samo 4 vrste. Inderbitzin in sod. so leta 2011 na podlagi filogenetske analize v rod *Verticillium* uvrstili 10 vrst. Trenutno rod *Verticillium* uvrščamo v družino Plectosphaerellaceae, red Hypocreales, podrazred Hypocreomycetidae, razred Sordariomycetes, poddebelo Pezizomycotina in deblo Ascomycota (CBS, 2016). Glive iz rodu *Verticillium* so talni fitopatogeni, ki lahko kolonizirajo vaskularni sistem rastlin in povzročajo uvelost.

2.1.1 Nova klasifikacija je v rod *Verticillium* sensu stricto uvrstila 10 vrst

Leta 2011 so Inderbitzin in sod. (2011a) v rod *Verticillium* razvrstili 10 vrst. Filogenetska analiza je temeljila na analizi petih različnih lokusov, in sicer za aktin (ACT), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (GPD), regijo ITS, triptofan sintazo (TS) in elongacijski faktor 1-alfa (EF). K temu so dodali še morfološke lastnosti posameznih izolatov, analize herbarija različnih izolatov ter pregled obstoječe literature. Rod so poimenovali *Verticillium* sensu stricto in ga razvrstili v dve skupini. V skupino Flavnonexudans spadajo vrste, ki ne tvorijo rumenoobarvanih hif. V skupino Flavexudans spadajo vrste, ki tvorijo hife z rumenim pigmentom. Rod zajema samo rastlinske patogene, ki se med seboj ločijo glede na gostitelja in patogenost. Od tega je pet vrst že znanih (*V. albo-atrum* sensu stricto, *V. dahliae*, *V. longisporum*, *V. nubilum* in *V. tricorpus*), pet pa je določenih na novo (*V. zaregamianum*, *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*).

10 vrst po Inderbitzin in sod. (2011a) ter njihovi gostitelji:

Skupina Flavnonexudans:

- *V. nubilum* (gobe, krompir),
- *V. dahliae* (rastlinske vrste iz 14 različnih družin: *Aceraceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Araliaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Linaceae, Malvaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae*),
- *V. longisporum* (zelje, cvetača, hren, oljna ogrščica, redkev, repa, sladkorna pesa in divja redkev),
- *V. alfalfa* (samo lucerna),
- *V. nonalfalfa* (hmelj, krompir, petunija in špinača, ne pa lucerna).

Skupina Flavexudans:

- *V. albo-atrum sensu stricto* (krompir, zemlja),
- *V. tricorpus* (nekatere okrasne rastline, paradižnik in krompir),
- *V. zaregamianum* (dišavnice in solata),
- *V. isaacii* (paradižnik, artičoke, nekatere plevelne vrste, solata in špinača),
- *V. klebahni* (samo solata).

Pred klasifikacijo po Inderbitzin in sod. (2011a) je bila vrsta *V. albo-atrum* glede na analize regije ITS številnih sevov in morfologijo razdeljena v skupini Grp I in Grp II (Robb in sod., 1993). V Grp I skupini sta bili dve podskupini, in sicer ena patogena samo na lucerni, v drugi skupini pa so bili sevi, ki so okuževali druge vrste rastlin, razen lucerne. V skupini Grp II so bili sevi *V. albo-atrum*, ki so imeli nekatere skupne gostitelje z vrsto *V. tricorpus* (Klosterman in sod., 2009). Inderbitzin in sod. (2011a) pa so vsako izmed (pod)skupin vrste *V. albo-atrum* določili kot novo vrsto. Skupina Grp I se je razdelila v dve novi vrsti, *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa*, skupina Grp II pa predstavlja vrsto z istim imenom *V. albo-atrum*. Vrsti *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa* sta morfološko nerazločljivi, obe tvorita trajni micelij, se pa ločujeta po gostiteljskih rastlinah ter na nivoju DNA. Vrsta *V. albo-atrum* je daljni sorodnik obeh vrst (Inderbitzin in sod., 2011a).

Pred klasifikacijo po Inderbitzin in sod. (2011a) so bile vrste *V. albo-atrum sensu stricto*, *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa* obravnavane kot ena sama vrsta in poimenovane s skupnim imenom »*V. albo-atrum* Reinke and Berthold«. Po razčlenitvi vrste »*V. albo-atrum* Reinke and Berthold« v tri samostojne vrste pa za skupno poimenovanje teh treh vrst uporabljamo izraz *V. albo-atrum sensu lato* (Scientific ..., 2014).

V tej doktorski disertaciji bodo besedne zvezne »rod *Verticillium*« ali »vrste iz *Verticillium* spp.« pomenile vrste iz rodu *Verticillium* sensu stricto, torej 10 vrst po klasifikaciji Inderbitzin in sod. (2011a), razen če bo navedeno drugače.

2.2 MORFOLOGIJA IN MORFOLOŠKE RAZLIKE MED VRSTAMI IZ RODU *Verticillium*

Glive iz rodu *Verticillium* so talni fitopatogeni značilni za hladne in zmerno hladne klimatske predele, najdemo jih pa tudi v tropskih in subtropskih krajih. Vsem glivam je

skupno to, da tvorijo bel puhat micelij, ki je sestavljen iz hialinih ali steklasto obarvanih hif. Iz hif izraščajo za rod *Verticillium* značilni vretenasti konidiofori (trosonosci), ki imajo vretenca, iz katerih poganja 1 do 5 filaid. Na koncu filaid se v sluzastih sferičnih glavicah nahajajo konidiji ali trosi, ki so večinoma haplodini. V večini celic se nahaja samo eno jedro (Pegg in Brady, 2002). Glive iz rodu *Verticillium* okužujejo skupno več kot 400 rastlinskih vrst iz 80 rodov, število pa vsakoletno narašča. Samo v zadnjem desetletju je bilo odkritih več ko 60 novih gostiteljskih rastlin (Radišek in Javornik, 2011).

Med vrstami rodu *Verticillium* obstajajo določene nedvoumne morfološke razlike, ki temeljijo predvsem na tvorbi trajnih organov. Glive tvorijo trajne organe z namenom preživetja v neugodnih okoljskih razmerah. *V. albo-atrum sensu stricto*, ki ima rumeno obarvane hife, tvori trajni micelij. Ta je temno rjave do črne barve in nastane z diferenciacijo hif v melanizirane strukture z debelo celično steno ter z združevanjem teh hif v micelije. Tvoriti tudi mikrosklerocije, ki nastanejo z nabrekanjem in septiranjem hif ter ločevanjem hif od starševskega micelija do posameznih celic, ki imajo debelo celično steno, kar privede do sferične oblike. Vrsti *V. alfalfa* in *V. nonalfalfa* se morfološko ne razlikujeta med sabo, razlikujeta se v izboru gostiteljskih rastlin in stopnji patogenosti. Pri obeh vrstah rumena pigmentacija hif ni prisotna, prav tako tvorita trajni micelij in ne mikrosklerocijev. *V. dahliae* ne tvori trajnega micelija in oblikuje izključno mikrosklerocije. *V. tricorpus* je talni saprofit, ki velja za šibkejšega patogena, saj za uspešno rast ne potrebuje prisotnosti gostitelja. Tvoriti različne oblike trajnih organov – klamidiospore (povečane vegetativne spore temne barve, z odebeleno celično steno, tvorijo se znotraj ali na koncu hif), mikrosklerocije in melanizirane hife. Vrste morfološko ni mogoče ločiti od vrst *V. isaacii* in *V. klebahnii*. *V. nubilum* tvori samo klamidiospore. *V. zaregamsianum* oblikuje mikrosklerocije kot tudi rumeno obarvane hife, najbolj je soroden vrsti *V. tricorpus*. Značilnost *V. longisporum* je, da za trajne organe oblikuje mikrosklerocije, podobno kot *V. dahliae*. Posebnost vrste so konidiji, ki so daljši od konidijev, ki jih tvorijo ostali tipični sevi *V. dahliae*, prav tako ima micelij na konidioforih zmanjšano število filaid. Vrsta *V. longisporum* je diploidni hibrid, ki je nastala s hibridizacijami različnih vrst rodu *Verticillium* (Klosterman in sod., 2009; Barbara in Clewes, 2003; Inderbitzin in sod., 2011b; Inderbitzin in Subbarao, 2014).

2.3 RAZVOJNI KROG

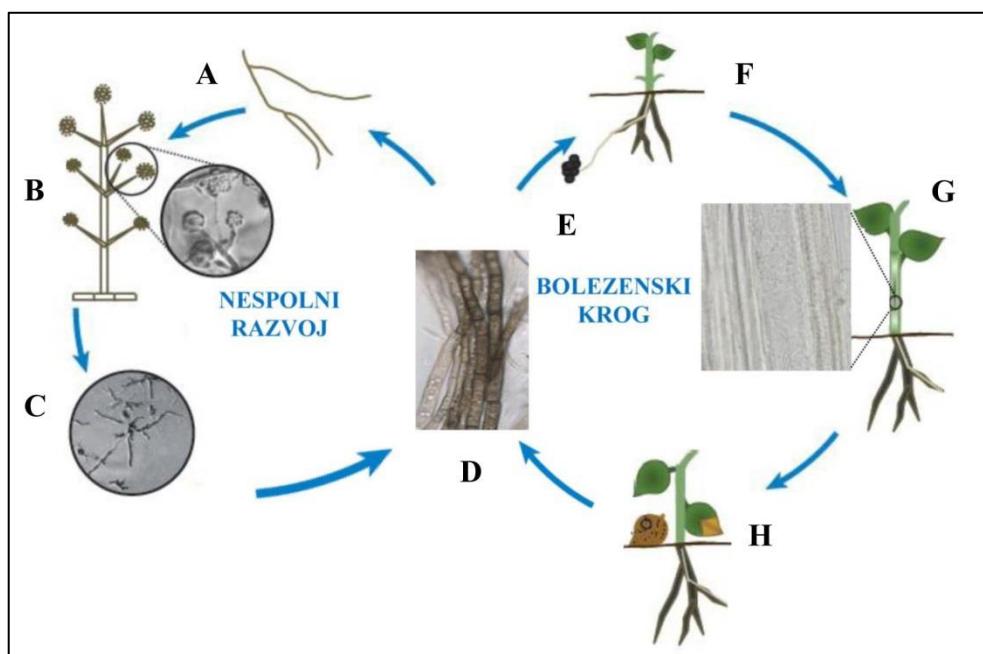
Glive iz rodu *Verticillium* se razmnožujejo izključno nespolno, spolni stadij še ni bil odkrit za nobeno vrsto iz rodu (Usami in sod., 2009; Inderbitzin in sod., 2011a). Razvojni krog gliv iz rodu *Verticillium* razdelimo na tri faze (Pegg in Brady, 2002; Fradin in Thomma, 2006; Radišek, 2004; Vallad in Subbarao, 2008):

- 1) Dormantna faza – gliva tvori trajne organe, ki ji omogočajo preživetje v neugodnih okoljskih razmerah. V naravi gliva v tleh prezimi v obliki trajnih organov na odmrlih rastlinskih ostankih gostiteljskih rastlin. Ob pojavu ugodnih razmer začne gliva nov življenjski cikel, v naravi se to zgodi ob začetku vegetacijske dobe rastlin. Stimulacija za začetek kalitve spor so koreninski eksudati rastlin. Trajne strukture omogočajo preživetje glivi v tleh do več let.
- 2) Parazitska faza – ob prisotnosti koreninskih izločkov gostiteljske rastline se prične kalitev trajnih struktur. Mesto vstopa glivnih hif v rastlino so poškodovani deli

korenin in koreninskih laskov. Preko endodermisa hife pridejo v prevodno tkivo in ga začnejo kolonizirati. Iz hif poženejo konidiofori, na katerih se tvorijo filaidi s konidiji. Transpiracijski tok odnese konidije navzgor po rastlini, kjer se ustavijo na mestih nepopolne perforacije žil, od koder se gliva širi tudi horizontalno v sosednje žile in postopoma kolonizira celo rastlino. Na ta način gliva nadaljuje kolonizacijo. Zaradi rasti glive v rastlinskih žilah pride do zamašitve le-teh, zaradi česar se začnejo pojavljati bolezenska znamenja, kot so venjenje, kloroze, zmanjšana rast in razbarvanje žilnega sistema, gostiteljska rastlina pa lahko tudi propade.

- 3) Saprofitska faza – ob uspešni vzpostavitvi kolonizacije in sproščanja za rastlino toksičnih molekul občutljive rastline propadejo. Šele takrat se gliva iz prevodnega sistema razširi tudi v druga rastlinska tkiva, kjer za preživetje uporablja organske ostanke odmrle rastline in prične tvoriti trajne organe, ki predstavljajo infekcijski inokulum za nov razvojni krog.

Na sliki 1 je prikazan razvojni krog za vrsto *V. nonalfalfa*e.



Slika 1: Razvojni krog glive *Verticillium nonalfalfa*e. Slike A do D predstavljajo nespolni razvoj glive v aksenični kulturi; **A** - polarna rast hif; **B** - tvorba vretenastih konidioforov s filaidami, na koncu filaid se v sluzastih sferičnih glavicah nahajajo konidiji ali trosi; **C** - kalitev konidijev in nadaljevanje rasti hif; **D** - tvorba trajnega melaniziranega micelija. Slike E do H prikazujejo bolezenski krog; **E** - kalitev hif iz trajnega micelija v prisotnosti rastline; **F** - začetek okužbe preko penetracije korenin; **G** - gliva se širi po prevodnem sistemu rastline; **H** - prehod v saprofitsko fazo in tvorba trajnega melaniziranega micelija v propadlem rastlinskem tkivu (Klimes et al., 2015).

Figure 1: Disease cycle of *Verticillium nonalfalfa*. Figures A – D; asexual development of axenic culture; **A** - polar hyphal growth; **B** - production of verticillate conidiophores with phialides, at the end of the phialides are droplets of mucilage bearing clusters of conidia; **C** – germination of conidia and further hyphae growth; **D** - formation of melanized resting mycelium. Figures E – H; disease cycle of fungus; **E** – germination of resting mycelium in the presence of plant roots; **F** – infection of plant through penetration of plant roots; **G** - fungus colonizes xylem elements; **H** – fungus moves into a saprotrophic growth phase and the production of resting mycelium in dead and dying plant tissues starts (Klimes et al., 2015).

2.4 GENETSKI MEHANIZMI, KI OMOGOČajo VARIABILNOST

Mejoza je proces spolnega cikla, ki ustvarja nove kombinacije alelov iz starševskih linij. Zato velja mejotska rekombinacija za pomembno orodje pri prilagajanju patogenov na njihove gostitelje (McDonald in Linde, 2002). Vseeno pa pri približno 20 % vseh glivnih vrst ni poznan spolni stadij (Seidl in Thomma, 2014). Ker ne prihaja do rekombinacij med mejotično delitvijo, so mutacije edini vir variabilnosti (Heale, 2000). Mutacije se lahko zgodijo na nivoju posameznih nukleotidov ali pa prihaja do kromosomskih preureditev celotnega genoma (translokacije, duplikacije in delecije), kar privede do sprememb v velikosti kromosomov in zastopanosti genov na kromosomih. Posledice genomskega preureditev so lahko negativne in zmanjšajo fitnes organizma, na drugi strani pa so glavni mehanizem evolucije pri organizmih, kjer spolni stadij ni poznan (Stukenbrock, 2013).

Spolni stadij še ni bil odkrit za nobeno vrsto iz rodu *Verticillium* (Usami in sod., 2009; Inderbitzin in sod., 2011a). Za fitopatogene glive pa je nenehno zagotavljanje genetske variabilnosti pomemben proces predvsem zaradi premagovanja rastlinskih obrambnih mehanizmov in širjenja na nove gostitelje (de Jonge in sod., 2013). Pri anamorfnih glivah lahko prihaja do paraseksualnega cikla (Hastie in Heale, 1984). To je proces, ki omogoča nastanek heterozigotnega diploidnega jedra. Do tega pride tako, da se najprej združita dve somatski hifi, ki sta kompatibilni, kar imenujemo anastomoza. Preko anastomoze se vsebini dveh celic združita v t.i. heterokariontsko celico in ko se v tej celici združita še jedri, nastane heterozigotno diploidno jedro. Sledi mitotična delitev. Če med delitvijo ne prihaja do nepravilnosti, nastaneta fai hčerinski celici. Kadar pa se med delitvijo pojavi genetske rekombinacije, imajo jedra hčerinskih celice drugačen genotip od heterozigotnega diploidnega jedra (Schardl in sod., 2003). V procesu haploidizacije, ko med delitvijo diploidna jedra izgubljajo kromosome, se pri *Verticillium* spp. prvotno haploidno stanje celic vzpostavi po štirih tednih (Heale, 1988).

McGeary in Hastie (1982) sta teorijo paraseksualnega cikla preizkusila v laboratorijskih pogojih. Uporabil sta izolate *V. albo-atrum* iz paradižnika, ki niso patogeni na lucerni, in jih združila s patogenimi izolati iz lucerne. Rezultat hibridizacije je bil, da so za paradižnik nepatogeni izolati postali patogeni in na paradižniku povzročali značilne boleznske znake. To je bil dokaz, da se za patogenost specifične genomske regije lahko na nek način prenašajo med izolati in da so geni za patogenost podvrženi rekombinacijam.

V naravi se proces paraseksualnega cikla najverjetneje odvija na površini korenin gostiteljskih rastlin, ko se iz različnih razlogov mešajo različni izolati (Heale, 2000). Vendar pa med izolati obstaja tudi inkompatibilnost, ko med dvema izlatoma kljub fizičnemu stiku ne prihaja do tvorbe anastomoz. Na podlagi testiranja inkompatibilnosti med izolati lahko določimo genetske razlike med izolati ter izolate znotraj vrste razvrstimo v vegetativne kompatibilne skupine (angl. vegetative compatibility groups; VCG) (Leslie, 1993). Znotraj *V. albo-atrum sensu lato* sta določeni dve VCG skupini, sevi *V. dahliae* pa se delijo na šest VCG skupin (Klosterman in sod., 2009).

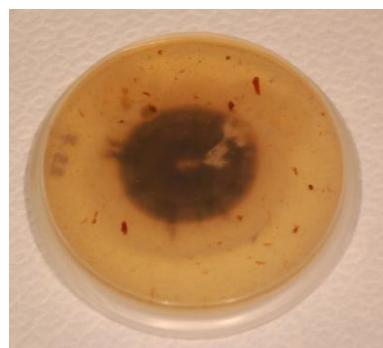
Pri vrsti *V. dahliae* je mehanizem genetske variabilnosti dobro proučen. S sekvenciranjem in pristopom komperativne genomike je bilo ugotovljeno, da prihaja do horizontalnega genskega prenosa (na ta način je gliva pridobila efektor *Ave1*, domnevno iz rastlin) in do

preureditev genoma na enem ali med kromosomi (de Jonge in sod., 2012; Seidl in Thomma, 2014). Zaradi preureditev so nastale linijsko specifične regije (angl. lineage specific; LS), na katerih se nahaja več sto genov, ki so močno izraženi *in planta*. LS regije so odgovorne za prilgoditev patogena na gostitelja in za agresivnost izolata. Proces obširnih kromosomskih preureditev zagotavlja nespolnim glivam genetsko raznolikost in kompenzira pomanjkanje spolnega razmnoževanja. Mehanizem kromosomskih preureditev ni poznan, verjetno pa sodelujejo tudi transponzibilni elementi. Mogoče je, da v manj patogenih vrstah prihaja do manjših genomskeh preureditev, zaradi česar nimajo genetske fleksibilnosti, ki bi jim omogočala uspešno tekmovanje z obrambnimi mehanizmi gostitelja (Seidl in Thomma, 2014).

2.5 *Verticillium nonalfalfa*

2.5.1 Morfološke lastnosti

Za *V. nonalfalfa* so značilne bele ali hialine hife, debeline 1,5 do 3 µm. Konidiofori imajo 1 do 3 vretenca v razdalji 30 do 40 µm. Konidiofori so pogosto sekundarno razvejani, dolžine od 30 do 710 µm in širine 4,5 do 6 µm, ki se proti vrhu zožajo na 2 do 3 µm ter melanizirani pri bazi razvejanja, kar je značilno samo za to vrsto. Konidiofor je sestavljen iz 2 do 6 vretenc, ki se nahajajo na razdaljah 50 do 160 µm. Vsako vretence je lahko sestavljeno iz 2 do 5 filaid. Terminalne filaide so lahko dolge 40 do 60 µm, lateralne pa 30 do 45 µm. Filaide se ošiljeno končujejo in so široke 2 do 3 µm pri osnovi ter 1 do 1,5 µm na koncu. Konidiji so hialini, večinoma enocelični in elipsoidne oblike, dolžine 5 do 7 µm in širine 2,5 do 6,5 µm. *V. nonalfalfa* lahko tvori dvojedrne konidije, ki lahko predstavljajo 1 do 2 % celotnega števila spor. Oblika trajnih organov je temno rjav do črn trajni micelij (slika 2), ki nastane z združevanjem melaniziranih nabreklih hif, širok do 9 µm. Celična stena hif trajnega micelija je debela, ravna ali ukrivljena, kot trajni micelij lahko ostanejo tudi posamezne hife (Inderbitzin in sod., 2011a).



Slika 2: Melaniziran trajni micelij glive *V. nonalfalfa*.
Figure 2: Melanized resting mycelium of *V. nonalfalfa*.

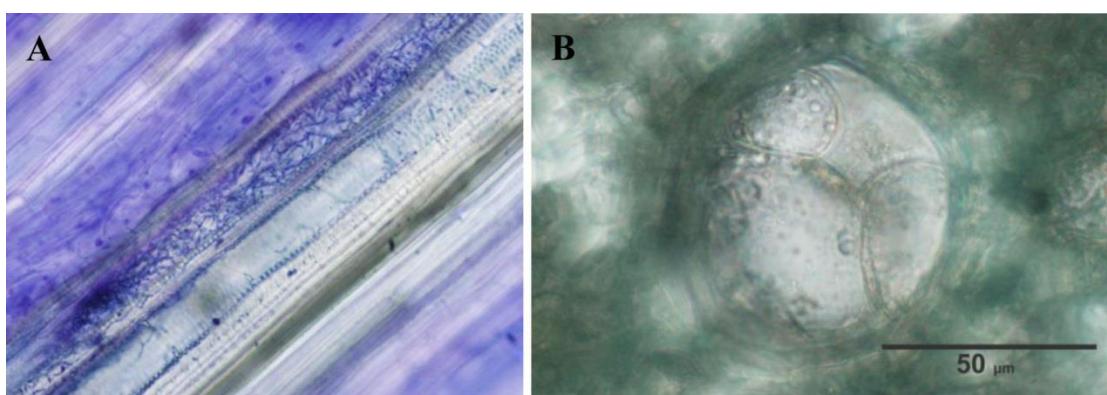
2.5.2 Gostiteljske rastline in pojav bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah

V. nonalfalfa okužuje več različnih rastlinskih vrst. Gostitelji so hmelj (*Humulus lupulus* L.), krompir (*Solanum tuberosum*), špinaca (*Spinacia oleracea*), vrste iz roda *Petunia*,

paradižnik (*Solanum lycopersicum*), navadna zelena (*Apium graveolens*) in lucerna (*Medicago sativa*) (Pegg in Brady, 2002). Leta 2013 je bil v ZDA potrjen nov gostitelj, in sicer veliki pajesen (*Ailanthus altissima*) (Rebbeck in sod., 2013). Področja, kjer se pojavlja *V. nonalfafae*, so ZDA, Združeno kraljestvo, Kuba, Kanada, Slovenija, Nemčija, Nizozemska in Japonska (Inderbitzin in sod., 2011; O’Neal, 2014).

Gostitelji se lahko različno odzovejo na okužbe s patogenom, zato se tudi pojavljajo razlike v simptomih (Fradin in Thomma, 2006). Vseeno pa se nekaj bolezenskih znamenj pojavlja pri vseh okuženih rastlinah. Ker gliva prodre v rastlino skozi korenine, se kolonizacija začne v spodnjih delih rastline. Venenje se zato najprej pojavi v spodnjem delu rastline. Opazno je tudi nazadovanje rasti v primerjavi z zdravimi rastlinami. Na listih se pojavijo kloroze in nekroze, običajno so najprej prizadeti starejši listi, ki tudi odpadajo. V vaskularnem tkivu zaradi rastlinskih oksidativnih obrambnih procesov, ki inhibitorno vplivajo na delovanje različnih encimov predvsem s hidrolitičnim delovanjem, ki jih izločajo patogeni, pride do rjavenja in temnenja prevodnega tkiva. Patogen opisana bolezenska znamenja na rastlini povzroča na dva načina, in sicer z izločanjem hidrolitičnih encimov in drugih s patogenezo povezanih molekul, ki destruktivno delujejo na rastlinske celice, in z rastjo v prevodnem tkivu, kar lahko privede do popolne zamašitve prevodnega tkiva (slika 3A), zaradi česar rastline ovanejo in propadejo (Pegg in Brady, 2002; Fradin in Thomma, 2006; Beckman, 2000).

Rastlinski obrambni mehanizmi povzročajo morfološke spremembe na rastlinskih tkivih. Histološke obrambne reakcije se pojavljajo v več tkivih. Ob okužbi se v koreninah ojačajo celične stene korenin z nalaganjem dodatnega lignina. Ligninski gomoljčki obdajo hifo, kar zavira nadaljnje širjenje ali privede do propada. Ko glivni micelij doseže prevodna tkiva, je opazna tvorba gelov iz pektinskih ter hemiseluloznih snovi, ki zapirajo prostor za širjenje glive. Parenhimske celice, ki obdajajo žile, dodatno zaprejo žile s tvorbo izrastkov, ki jih imenujemo tile ali začepki (slika 3B). Na ta način pride do fizične blokade prevodnega sistema, ki onemogoči ali omeji širjenje glive po prevodnih žilah. V biokemijske reakcije rastlinskega obrambnega odgovora uvrščamo povečanje tvorbe fitoaleksinov (toksini), inhibitorje fitotoksinov ter izločanje hormonov (etilen) in različnih fenolnih komponent (Talboys, 1972; Beckman, 2000).



Slika 3: Zamašitev prevodnih žil; **A** – rast hif *V. nonalfafae*; **B** – tvorba til v prevodnih žilah hmelja (Cregeen in sod., 2015).

Figure 3: Clogging of plant xylem; **A** – growth of hypha of *V. nonalfafae*; **B** - blockage by tylosis in xylem vessel (Cregeen et al., 2015).

2.5.3 Verticilijska uvelost hmelja

Bolezen se je najprej pojavila v Angliji (Harris, 1927), in sicer najprej v blagi obliki, zatem pa tudi letalni obliki. Kasneje so bili identificirani štirje različni virulentni patotipi glive *V. albo-atrum*, ki so povzročali eno ali drugo obliko obolenja; M (angl. mild) izolati so povzročali blago obliko obolenja, bolj agresivni PV1, PV2 in PV3 (angl. progressive virulent) izolati pa letalno obliko bolezni (Sewell in Wilson 1974; Clarkson in Heale 1985).

Z molekulske analizo in patogenimi testi izolatov *V. nonalfalfa* iz slovenskih hmeljišč sta bila določena dva patotipa *V. nonalfalfa*: patotip M (genotip PG1), ki povzročajo blago obliko bolezni, in patotip PV1 (genotip PG2), ki povzročajo letalno obliko bolezni (Radišek in sod., 2003). Primerjava naših izolatov s hmeljnimi izolati *V. nonalfalfa* iz drugih evropskih hmeljišč ter z izolati *V. nonalfalfa* iz drugih gostiteljskih rastlin je pokazala genetske razlike med letalnimi in blagimi izolati kot tudi z izolati iz drugih rastlin ter enak patotip med našimi PG2 izolati in letalnim izolatom PV1 iz Anglije (Radišek in sod., 2006).

Pojavilo se je že več izbruuhov letalne oblike verticilijske uvelosti hmelja. Prvi se je zgodil v Angliji (1932), nato v Sloveniji (1997) in nedavno v Nemčiji (2005) (Letno poročilo ..., 2014). Patotipi s povišano virulenco so se pojavili tudi na zahodu ZDA, a v tem primeru naj ne bi šlo za napredajočo obliko bolezni (Gent, 2012). Letalna oblika naj bi se iz blage oblike razvila večkrat neodvisno, izoliranih pa je bilo mnogo različno virulentnih sevov iz različnih evropskih pridelovalnih regij (Radišek, 2006).

Bolezenska znamenja na hmelju ob napadu bolezni so rumenenje in venenje listov, ki se najprej pojavijo na spodnjem delu hmeljeve rastline, nato pa vedno višje po rastlini. Listi so prizadeti predvsem v medžilnem prostoru in na robovih, kjer je opazno odmrlo tkivo. V prevajальнem tkivu pride do rjavenja prevodnega sistema. Pri blagi obliki bolezen rastlino prizadene nekje do višine 1,5 m, kar je opazno kot nenormalno debeljenje trt, ki ga spremlja hrapavost in pokanje skorje. Rastlina ne propade in naslednje leto ponovno odžene. Letalno obliko povzročajo bolj virulentni izolati *V. nonalfalfa*. Poleg že opisanih simptomov je pri letalni obliki mogoče opaziti še hitro napredovanje bolezni, ki v dveh do treh tednih prizadane tudi stranske poganjke, pride do odpadanja listov in sušenje celotne rastline. Prevajalno tkivo v celoti porjavi. Letalna oblika povzroči dokončen propad rastline. *V. dahliae* tudi okužuje hmelj, toda povzroča le blažjo obliko verticilijske uvelosti hmelja (Neve, 1991).

2.5.4 Virulentni dejavniki v *V. nonalfalfa*

Do sedaj odkriti in potrjeni virulentni dejavniki v glivi *V. nonalfalfa* so encim za pektinazo (Durrands in Cooper, 1988a; 1988b), transkripcionski faktor *Vta2* (Tran in sod., 2014), lignin preoksidaza *VnaPRX1.1277* in mali sekretorni protein *VnaSSP4.2* (Flajšman in sod., 2016). Natančnejši opisi študij sledijo v poglavju 2.8.

2.6 MEHANIZMI ODPORNOSTI RASTLIN NA BOLEZNI

Glive živijo v raznolikih okoljih in pri vzpostavljanju interakcij z rastlino uporabljajo različne strategije. Čeprav se nabor rastlinskih gostiteljev med fitopatogenimi vrstami gliv močno razlikuje, rastline vedno prepozna napade patogenov in se nanje tudi odzovejo. Okužba rastlin s patogenom lahko privede do treh različnih odzivov rastline (Robb in sod., 2007): če patogen uspešno kolonizira gostiteljsko rastlino, rastlina pa zaradi tega kaže bolezenska znamenja ali celo propade, to imenujemo občutljivost. Prilagojeni patogeni so sposobni obiti rastlinske obrambne mehanizme, vzpostaviti kompatibilne interakcije z gostiteljem in imeti koristi od takega odnosa; če patogen zaradi uspešnega obrambnega odziva rastline ne uspe okužiti gostitelja oz. pride do okužbe, vendar ne pride do razvoja bolezni, to imenujemo odpornost, ki je običajno posledica gostiteljeve specifične prepoznavne molekul patogena (Jones in Dangl, 2006); če pride do vmesnega odziva, ko patogen uspešno kolonizira gostiteljsko rastlino, a to ne privede do pojava bolezenskih znamenj in ne vpliva na bujnost rastline, to imenujemo toleranca (Robb in sod., 2007). Toleranca je rastlinski fenomen, saj rastlina kljub veliki razširjenosti patogena v tkivih ne kaže prizadetosti, kar je verjetno posledica aktivne obrambe rastline na glivne toksine. V večini primerov naj bi šlo za t.i. nepopolno odpornost, ki nastane zaradi delovanja podobnih molekulskih mehanizmov značilnih za popolno odpornost (Thomma in sod., 2011; Robb in sod., 2007). Odziv rastline na okužbo s patogenim organizmom lahko razdelimo na splošen in specifičen odziv.

2.6.1 Splošen odziv rastlinske obrambe pred mikroorganizmi

V prvi fazi obrambe gre za splošen odziv, kjer rastlina z receptorji za prepoznavanje molekulskih vzorcev (angl. pattern recognition receptors, PRRs) prepozna ohranjene s patogeni povezane molekulske motive (angl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) ali mikrobne ohranjene molekulske vzorce (angl. microbe-associated molecular patterns, MAMP). PAMP oz. MAMP molekule so za mikroorganizem pomembne in evolucijsko ohranjene strukture, kot sta na primer bakterijski flagelin in glivni hitin (Chisholm in sod., 2006). Mnogi patogeni ob napadu v gostiteljsko rastlino izločajo hidrolitične encime, ki poškodujejo rastlinske celice. Ob tem nastajajo značilni s poškodbo povezani molekulski motivi (angl. damage-associated molecular patterns, DAMP), ki izvirajo iz gostitelja in se sproščajo kot posledica napada patogena (Albert, 2013; Boller in Felix, 2009). Prepoznavna PAMP/MAMP ali DAMP molekul s PRR receptorji vodi v splošni obrambni odziv, imenovan z molekulami PAMP sprožena imunost (angl. PAMP triggered immunity, PTI) (Jones in Dangl, 2006). Aktivacija PTI obrambnega sistema vodi v hiter odziv rastline na okužbo, ki vključuje: kopičenje reaktivnih kisikovih spojin (angl. reactive oxygen species, ROS); aktivacijo ionskih kanalov; aktivacijo specifičnih obrambnih signalnih poti, ki so povezane z mitogenom aktiviranimi proteinskimi kinazami (MAP) in v sintezo protimikrobnih komponent, kot so s patogenezo povezani proteini (PR proteini - proteinaze, hitinaze, glukanaze, itd), ki poškodujejo celično steno patogena; encimski inhibitorji, ki delujejo na molekule, ki jih izloča patogen; in neproteinske protimikrobine molekule, npr. fitoaleksini (Pitzschke in sod., 2009; Macho in Zipfel, 2014; Rodriguez in sod., 2010). Napadene rastline tudi odebelijo celične stene, sintetizirajo lignin, nalagajo suberin ter tvorijo kaloze in papile (Dodds in Rathjen, 2010). Zelo

pomemben del PTI odgovora je rastlinska signalizacija, ki se sproži takoj po zaznavi vdora mikroorganizma. Ključno vlogo pri signalni transdukciji imata rastlinska hormona salicilna in jasmonska kislina (Dong, 1998). PTI odziv obvaruje rastlino pred nadaljnji širjenjem mikroba samo v primeru, če ta ni prilagojen na kolonizacijo oz. če rastlina ni njegov gostitelj (Uma in sod., 2011). To imenujemo ne-gostiteljska odpornost in je najbolj pogosta oblika rastlinske odpornosti, ki rastlinam omogoča trajno zaščito pred neprilagojenimi mikroorganizmi (Heath, 2000).

2.6.2 Specifičen odziv rastlinske obrambe pred mikroorganizmi

Za uspešno invazijo mora patogen obiti PTI. V ta namen izloča efektorje, ki na molekularni ravni ovirajo PTI odziv. Temu pojavu pravimo z efektorji povzročena občutljivost (angl. effector-triggered susceptibility, ETS) (Jones in Dangl, 2006), pri čemer se odporne rastline odzovejo z aktivacijo sekundarne faze obrambe, ki se imenuje z efektorji sprožena imunost (angl. effector triggered immunity, ETI). Efektorje imenujemo katere koli glivne sekretorne molekule, ki vplivajo na rezultat interakcije med glivo in njenim gostiteljem (Stergiopoulos in de Wit, 2009; Ellis in sod., 2009; de Jonge in sod., 2011; Giraldo in Valent, 2013; Hogenhout in sod., 2009). Efektorje, ki sprožijo ETI, rastline prepoznajo z znotrajceličnimi receptorji (R proteini), ki so visoko ohranjeni receptorji iz razreda NB-LRR receptorjev (angl. nucleotide-binding leucine-rich receptor) (Dodds in Rathjen, 2010). Prepoznavna efektorja z NB-LRR receptorjem je visoko specifična in je lahko neposredna (receptor veže glivni efektor) ali posredna (za uspešno vezavo so potrebni dodatni proteini, ki so lahko tarče za patogena ali pa so ti proteini samo podobni takšnim tarčam). V zaznavanje glivnih efektorjev so vpleteni citoplazemski receptorji, saj efektorji navadno delujejo na znotrajcelične tarče (de Young in Innes, 2006). To kaže na to, da se efektorji z aktivnim transportom prenašajo iz celic patogena v celice gostitelja (Stergiopoulos in de Wit, 2009).

Ko receptor zazna efektorski protein, se običajno sproži hipersenzitiven odgovor (angl. hypersensitive response, HR) ali lokalizirana celična smrt tistih celic, katerih receptorji so zaznali efektor. To je obrambni odziv gostitelja, ki poskuša z uničenjem lastnih celic prizadeti ali omejiti nadaljnje razširjanje patogena. Po končanem hipersenzitivnem odgovoru pride do signalizacije, v katero sta udeleženi salicilna in jasmonska kislina (Derksen in sod., 2013), lahko pa tudi drugi signali, npr. dušikov oksid (Leitner in sod., 2009). Ti signali rastlini omogočajo aktivacijo obrambne reakcije, ki jo imenujemo sistemsko pridobljena odpornost (SAR, angl. systemic acquired resistance; Shah, 2009). Ni pa HR edini možen razplet ETI odziva, temveč se sproži imunski odziv rastline s sintezo protimikrobnih molekul (Moore in sod., 2011). V zadnjem času postaja jasno, da so del PTI in ETI odgovora tudi majhne RNK molekule (angl. small RNA; sRNA), ki so odgovorne za regulacijo odgovorov na abiotični in biotični stres. Najbolje opisan razred rastlinskih sRNA so miRNA (microRNA), ki lahko prispevajo k obrambi pred patogenom, in sicer z vplivom na izločanje obrambnih PR1 proteinov (Zhang in sod., 2011; Yang L. in sod., 2013). Na koncu o jakosti in načinu odziva rastlinske obrambe ne odloča samo narava molekule, ki sproži ta obrambni odziv, ampak tudi čas prisotnosti te molekule in tudi njena količina (Doehlemann in Hemetsberger, 2013).

2.6.3 Povezava mehanizmov rastlinskega obrambnega odgovora

Raziskovanje rastlinskega imunskega sistema je privelo do opažanj, da se nekateri vzorci molekulskih interakcij med patogenom in gostiteljem pojavljajo v več različnih primerih in med različnimi udeleženimi biološkimi vrstami. Iz tega razloga so raziskovalci začeli postavljati rastlinske obrambne odzive na napade patogenih mikroorganizmov v različne modele (Io Presti in sod., 2015). Poznanih je več konceptualnih modelov, ki poskušajo razložiti soodvisnost in povezanost različnih mehanizmov rastlinske odpornosti znotraj enega organizma (Flor, 1942, cit. po Cook in sod., 2015; van der Biezen in Jones, 1998; Nürnberg in Brunner, 2002; Chisholm in sod., 2006; Jones in Dangl, 2006; Cook in sod., 2015).

Leta 2006 sta Jones in Dangl za opis rastlinskega sistema za obrambo pred napadi patogenov predlagala t.i. cikcak model (angl. zigzag model; Jones in Dangl, 2006), ki podaja celovit pogled na rastlinsko imunost in predlaga delitev molekulskih interakcij med patogenom in gostiteljem na PTI in ETI odziv, ki je odvisen od ravni prepozname. PTI in ETI imata podobne odzive, torej poskus eliminacije napadajočega mikroorganizma in obvarovanje rastline pred njegovimi škodljivimi vplivi, toda bistvena razlika je v jakosti in specifičnosti povezave receptor - ligand; PTI predstavlja nespecifični odziv, ki ga vzpodbudijo ohranjene strukturne komponente patogena ali gostitelja samega, medtem ko ETI odziv, na podlagi hipoteze gen za gen (Flor, 1971), temelji na visoko specifični interakciji med glivnim efektorjem, ki ga lahko poimenujemo tudi avirulentni protein (Avr), in specializiranim rezistenčnim (R) proteinom. Določenih je že več ko 26 Avr genov iz glivnih patogenov (Rouxel in Balesdent, 2010) in v večini primerov je bil odkrit tudi ujemajoči R protein v rastlini (Ali in sod., 2014; Gururania in sod., 2012; Stergiopoulos in de Wit, 2009). Samo ETI odziv lahko sproži HR in SAR, medtem ko PTI izzove šibkejši in lokalno omejen odziv (izolčanje ROS, tvorba papile, idr.) (Jones in Dangl, 2006; Tsuda in sod., 2009). Vseeno pa jasne meje med PTI in ETI odzivom ni, saj nekateri rastlinski R geni kažejo vmesni odziv med PTI in ETI. Nekatere MAMP molekule lahko izzovejo HR in določeni efektorji lahko privedejo samo do šibkega odziva rastlinskega obrambnega sistema, ki je primerljiv s PTI odzivom (Thomma in sod., 2011). Na podlagi podobnih opažanj so Cook in sod. (2015) predlagali nov koncept razlage molekularnih interakcij med gostiteljem in patogenom, ki se imenuje invazijski model (angl. invasion model). V tem modelu so poenoteni izrazi za molekule, ki izzovejo imunski odziv (IP; angl. invasion pattern(s), izvirajo iz gostitelja ali mikroba in označujejo invazijo) in receptorje, ki te molekule prepozna (IPR; angl. invasion pattern receptors). Avtorji menijo, da naj bi nov model razlagal specifične receptor - ligand interakcije med patogenom in gostiteljem celoviteje, kar lahko uporabimo za bolj natančne napovedi podobnih interakcij v drugih patosistemih ter lahko na ta način pričakujemo izboljšanje žlahtniteljskih programom pri kmetijsko pomembnih rastlinah.

2.7 VIRULENTNI DEJAVNIKI V GLIVNIH FITOPATOGENIH

Rastline napadajo številni potencialno patogeni mikroorganizmi, ki lahko uporabijo različne poti za vstop v rastlino in naselitev v njenih tkivih. Vendar pa mora vsak mikroorganizem, ki želi uspešno kolonizirati gostitelja, zatreći ali omejiti delovanje

njegove obrambe. V ta namen patogeni izločajo različne virulentne dejavnike, kot so efektorji, encimi za razgradnjo celične stene (CWDE, angl. cell wall degrading enzymes) in toksini.

2.7.1 Efektorji

Efektorji so sekretorni proteini, ki jih izloča patogen ob napadu na rastlino in vplivajo na celično strukturo in celične procese gostitelja z namenom vzpostaviti uspešno kolonizacijo (Hogenhout in sod., 2009). V apoplastu je naloga efektorjev, da branijo patogena pred hidrolitičnimi encimi in toksini, ki jih sintetizira gostitelj in da onemogočajo rastlinsko signaliziranje, ki je tudi del začetnega obrambnega odziva rastline. Ko efektorji pridejo v rastlinsko celico, pa napadajo specifične intracelične procese z namenom zavirati obrambni odziv gostitelja (Doehlemann in Hemetsberger, 2013).

Procesi na katere delujejo efektorji znotraj celic so: zaviranje delovanja rastlinskih obrambnih encimov, npr. proteaz, glukanaz in hitinaz (Misas-Villamil in van der Hoorn, 2008); vezava na ubikvitin-proteasom kompleks (Park in sod., 2012); onemogočanje delovanja rastlinskih imunskih PRR receptorjev (Shan in sod., 2008; Xiang in sod., 2008); zaviranje sinteze fitohormonov (Kazan in Lyons, 2014); blokiranje rastlinskih procesov, kot so metabolizem proteinov, RNA homeostaza in fosforilacijske poti, ki vodijo v splošen obrambni odziv (Block in sod., 2008); zaviranje hipersenzitivnega odgovora rastline, ki v ETI odzivu vodi v celično smrt in eliminacijo patogena (Abramovitch in sod., 2003; Jamir in sod., 2004); mimikrija strukture in funkcije rastlinskih hormonov (Kawaide, 2006; Weiler in sod., 1994); vpliv na razvojne faze gostiteljske rastline (Melotto in sod., 2006; Duan in sod., 1999).

Običajno so efektorji sekretorni proteini, ki so majhni in so sestavljeni iz manj kot 300 aminokislin. Vsebujejo več cisteinskih ostankov, njihove terciarne proteinske strukture pa so ojačane z disulfidnimi mostički (Hogenhout in sod., 2009; Stergiopoulos in sod., 2013; Giraldo in Valent, 2013; de Jonge in sod., 2012). Takšni proteini so dobro prilagojeni na neugodne pogoje v rastlinskem apoplastu, kamor se efektorji najprej izločijo. Toda poznani so tudi efektorji, sestavljeni iz večjega števila aminokislin (Djamei in sod., 2011), zato meja 300 aminokislin ni povsem zanesljiva in je zgolj arbitralno določena. Dodaten kriterij za efektorje je, da nimajo znanih proteinskih ortologov izven svojega rodu (O'Connell in sod., 2012). Vseeno obstajajo tudi takšni efektorji, ki so ohranjeni med glivami ali vsebujejo ohranjene proteinske motive (Stergiopoulos in sod., 2014).

Efektorje glive največkrat izločajo po poti preko endoplazmatskega retikulumata in Golgijevega aparata. Da se lahko protein izloči iz celice po tej poti, mora vsebovati signalni peptid za izločanje na N-terminalnem delu proteina. To je lastnost, ki jo je mogoče bioinformacijsko preveriti pri vsakem proteinu, za katerega je znan gen, ki ga kodira, in na ta način določiti kandidatne efektorske proteine. Toda kriterijev za *in silico* določanje efektorskih proteinov je več (Io Presti in sod., 2015). Znani so tudi primeri nekonvencionalne sekrecije glivnih efektorjev (Liu in sod., 2014), kar dodatno razširi nabor možnih kandidatnih efektorskih proteinov. Največkrat pride do ekspresije efektorjev v glivah samo v primeru, ko te zaznajo prisotnost gostiteljske rastline. Zato je ekspresija

efektorskih genov v sorazmerju s fazo okužbe, lahko pa zavisi tudi od celic oz. organov, kjer patogen vstopa v rastlino (Okmen in Doehlemann, 2014). Interakcije in nenehna koevolucija gostitelja in njegovega patogena sooblikujejo genoma obeh. Opaziti je trend, da so efektorski geni združeni v genomskejih regijah, ki so fleksibilne in podvržene številnim spremembam v obliki mutacij, ki spreminja ne samo lastnosti efektorskih molekul, ampak lahko celo privedejo do izgub efektorskih genov ali pridobitve novih, gostiteljem še nepoznanih efektorskih proteinov (Rep in Kistler, 2010).

Nabor proteinov, ki jih glivni patogeni izločajo v okolje in so udeleženi v interakciji gostitelj - patogen, vpliva na raven prilagoditve patogena na okolje in stopnjo gostiteljske specializacije. Določiti proteine z ohranjenimi funkcionalnimi domenami danes ne predstavlja več težave. Izzivi pa se pojavljamaj pri *in silico* določevanju efektorskih proteinov samo na podlagi znanega genomskega zaporedja (Io Presti in sod., 2015). Zaradi obilice sekvenciranih glivnih genomov so se razvila različna bioinformacijska orodja za analizo genomskega zaporedij. Na osnovi eksperimentalno odkritih in potrjenih efektorjev, katerim so bile določene biokemijske lastnosti (npr. prisotnost signalnega peptida za sekrecijo, celokupno število aminokislin v efektorskem proteinu, število cisteinskih ostankov, prisotnost ali odsotnost posameznih tipičnih aminokislinskih zaporedij ali motivov, prisotnost ali odsotnost transmembranske domene, idr.) in transkripcijski profil (višja izraženost efektorskega gena med kolonizacijo gostitelja), so bile razvite bioinformacijske sheme za *in silico* identifikacijo glivnih efektorjev (de Jonge in sod., 2012; Min, 2010; Tsang in sod., 2009; Doehlemann in sod., 2012).

Patogeni izločajo efektorje z namenom, da zaustavijo delovanje rastlinskega PTI odziva (Rafiqi in sod., 2012). Nato rastline aktivirajo sekundarno linijo obrambe ETI in začnejo prepoznavati glivne efektorje preko neposredne povezave ligand - receptor ali posredno preko zaznave njihovega delovanja na gostiteljskih tarčah (van der Hoorn in Kamoun, 2008; Liu in sod., 2013). Efektorji imajo lahko znotraj rastlinske celice več kot samo eno tarčo. Tak primer je AvrRpt2 efektor iz *Pseudomonas syringae* s proteolitično aktivnostjo, ki napada vsaj 5 različnih *Arabidopsis* proteinov (Chisholm in sod., 2005). Ker so efektorji zelo pomembni v interakcijah med gostiteljem in patogenom, se v zadnjem času veliko pozornosti usmerja k detekciji in karakterizaciji različnih glivnih efektorjev (Rafiqi in sod., 2012).

2.7.2 Encimi za razgradnjo celične stene

Encimi za razgradnjo celične stene (CWDE, angl. cell wall degrading enzymes) so sekretorni encimi, ki imajo pomembno vlogo v razvojnem krogu patogena, saj sodelujejo pri povzročanju obolenj na rastlinah na način, da razgrajujejo celično steno gostitelja, predvsem celulozo in pektin (Walton, 1994), in tako patogeni pridejo do hranil v obliki ogljikovih hidratov (Kubicek in sod., 2014). CWDE so najbolje opisane molekule, ki se izločajo v apoplast (Klosterman in sod., 2011). Ker pa veliko različnih encimov opravlja enako ali podobno funkcijo, je vlogo posameznega CWDE encima v patogenezi nekega patogena težko določiti (Tzima in sod., 2011). Čeprav se v glivnih genomih nahaja veliko genov za CWDE encime, ne obstaja veliko raziskav z dokazi o vpletenuosti teh encimov v patogenezo. Hkratno izbitje treh pektinaznih genov v koruzni sneti (*Ustilago maydis*) ni

imelo posledic na virulenco takega mutanta (Doehlemann in sod., 2008). Je pa utišanje genov iz družine celulaz (encim glikozid hidrolaza) v glivi *Magnaporthe oryzae* vplivalo na poslabšanje sposobnosti okuževanja gostiteljske rastline in tako na manjšo prizadetost riževih rastlin zaradi znižane sposobnosti penetracije glivnih struktur v rastlinske celice, ki so s tvorbo papile glivi blokirale vstop (van Vu in sod., 2012). Podoben vpliv na penetracijsko sposobnost glive *M. oryzae* je imelo utišanje gena za ksilanazo (Nguyen in sod., 2011). Tzima in sod. (2011) so pokazali, da je gen *VdSNF1*, ki kodira del kinaznega kompleksa, udeleženega v katabolno uravnavanje CAZy encimov, pomemben v virulenci glive *V. dahliae*.

2.7.3 Fitotoksini

Fitotoksine izločajo predvsem nekrotrofni patogeni, ki najprej ubijejo gostiteljsko rastlino in nato kot vir hranil uporabljajo odmrlo tkivo. Hemibiotrofi na začetku okužbe vzpostavijo biotrofičen odnos z gostiteljem, toda v poznejših fazah okužbe začnejo proizvajati toksine in na ta način ubijejo gostitelja, kar jim omogoča zaključek razvojnega kroga. Fitotoksini so običajno sekundarni metaboliti z nizko molekulsko težo. Njihovo izločanje je močno povezano s fiziološkim in morfološkim stanjem glive in je odvisno od pogojev, v katerih gliva raste. Izločanje fitotoksinov med procesom razširjanja glive po rastlini kaže na stopnjo patogenosti ali virulentnosti nekega mikroorganizma (Horbach in sod., 2011).

Fitotoksini delujejo na različne načine, glavna pa sta dva mehanizma: 1) fitotoksini pripomorejo k virulenci ali patogenosti mikroorganizma na način, da poškodujejo celice in tako povzročijo izlitje hranljive celične vsebine v okolje, kar jim tudi omogoča lažje širjenje po rastlini. Tipična bolezenska znamenja, ki jih na rastlinah povzročajo fitotoksin, so venenje in zavirana rast, kloroze in nekroze tkiva ter pojavljanje lis na povrhnjici (Wolpert in sod., 2002; Berestetskiy, 2008); 2) fitotoksini lahko, podobno kot avirulentni faktorji, v gostiteljskih rastlinah sprožijo programirano celično smrt in hipersenzitiven odgovor, saj je mehanizem enak v obeh primerih (Stergiopoulos in sod., 2013).

Po kemijski sestavi ločimo poliketidne toksine, neribosomalne peptide in proteinske toksine. Vsi spadajo v skupino sekundarnih metabolitov (Collemare in Lebrun, 2011). Glede na vlogo v patogenezi ločimo med patotoksini (pri nekrotrofih so nujno potrebni za vzpostavitev okužbe) in vivotoksini (do sinteze pride po okužbi, simptome povzročajo samo v velikih količinah) (Berestetskiy, 2008). Glede na specifičnost delovanja pa toksine delimo na gostiteljsko specifične in gostiteljsko nespecifične (Wolpert in sod., 2002; Qutob in sod., 2006; Stergiopoulos in sod., 2013).

Gostiteljsko specifični fitotoksini so biološko aktivni samo proti nekaterim rastlinskim vrstam in v osnovi določajo nabor gostiteljev za patogena (Wolpert in sod., 2002). Pogosto se razlike v občutljivosti na nek fitotoksin pojavljajo že med različnimi sortami kmetijskih rastlin, prav tako pa lahko prihaja do razlik med patogeni pri izločanju določenega fitotoksina, ko nekateri izolati izločajo določen toksin, drugi izolati znotraj iste vrste pa ne. Če pride do kompatibilne interakcije med proteinskim toksinom iz patogena in tarčo za ta toksin, to privede do rastlinske občutljivosti. Ta pojav se imenuje »inverzni gen za gen

model«, ko prisotnost nekega gena oz. njegovega produkta v rastlini vodi v občutljivost in ne v odpornost, kot je to v primeru R genov (Oliver in sod., 2012). Skoraj vse znane gostiteljsko specifične fitotoksine proizvajajo nekrotopni patogeni iz reda *Pleosporales*, ki se nahaja znotraj razreda *Dothideomycetes*. Zanimivo je, da lahko vnos določenega gostiteljsko specifičnega fitotoksina v rastlino izzove enake bolezenske simptome kot v primeru okužbe s patogenom (Wolpert in sod., 2002). Na drugi strani pa patogen, ki zaradi povzročene mutacije ne proizvaja fitotoksina, deloma ali v celoti izgubi patogenost (Sökk in Hoppe, 1999).

Gostiteljsko nespecifični fitotoksini so biološko aktivni proti širokemu spektru rastlinskih vrst, vendar ne določajo stopnje patogenosti nekega mikroorganizma niti njegove gostiteljske specifičnosti, ampak lahko samo doprinesejo k virulenci. S svojim delovanjem vplivajo na različne fiziološke procese v rastlinah, npr. na pridobivanje energije (npr. »tentoxin« iz *Alternaria* spp.), na biosintezo lipidov (npr. »cyperin« iz *Ascochyta cypericola*), na polimerizacijo aktina (npr. »cytochalasins« iz številnih glivnih vrst) na sintezo ROS (npr. »cercosporin« iz *Cercospora* spp.) in na številne druge (Berestetskiy, 2008).

2.8 VIRULENTNI DEJAVNIKI V *Verticillium* spp., DOLOČENI Z MUTACIJSKO ANALIZO

Določanje nukleotidnega zaporedja celih genomov različnih fitopatogenih gliv je omogočilo ne samo vpogled v razporeditev, zgradbo in plastičnost genomov, ampak tudi v evolucijo in njihove prilagoditve (Raffaele in Kamoun, 2012). *Magnaporthe oryzae* je bil prvi rastlinski patogen, ki mu je bilo določeno genomsко nukleotidno zaporedje (Dean in sod., 2005). Danes so poznani genomi že številnih rastlinskih endofitov (kolonizirajo rastlino brez povzročanja bolezenskih znamenj) ter ektomikoriznih in arbuskularnih mikoriznih glivnih vrst, ki vzpostavijo vzajemen odnos s svojimi gostitelji (Rovenich in sod., 2014), kar predstavlja enega izmed ekološko in kmetijsko najpomembnejših simbiontskih odnosov v talnem ekosistemu. Poleg tega se sekvincirajo tudi genomi drugih pomembnih mikroorganizmov, ki napadajo rastline. Mednje spadajo bakterije, oomicete in nematode. Vse to omogoča primerjavo, določanje ohranjenih vzorcev genomskeh struktur ter spremljanje evolucijske poti teh patogenov, ki pomembno vplivajo na razvoj gostiteljskih rastlin in sooblikujejo njihovo živiljenjsko okolje (lo Presti in sod., 2015).

Dostopnost genomskeh podatkov večjega števila vrst iz rodu *Verticillium* je omogočilo raziskovanje osnovnih mehanizmov, ki so povezani z razvojnim krogom in patogenostjo *Verticillium* spp. (Klimes in sod., 2015). Primerjalne študije genomov so razkrile evolucijske mehanizme (npr. medkromosomske prerazporeditve), ki so preoblikovali te genome (de Jonge in sod., 2013). Raziskovanje odzivov patogena, ki nastanejo kot posledica razmer v ksilemu in identifikacija virulentnih dejavnikov omogočata vpogled v adaptacijo *Verticillium* spp. na živiljenje teh ksilemskih patogenov (Klimes in sod., 2015).

Poleg nekaj sekvinciranih genomov vrst in njihovih patotipov iz rodu *Verticillium* je danes poznanih že veliko genov z vplivom na virulenco (povzetek vseh genov je zbran v preglednici 1 na koncu poglavja). Funkcijske analize kandidatnih virulentnih genov so

pokazale, da vsi geni niso neposredno udeleženi v virulenco, vendar brez njih gliva ne more vzpostaviti običajne stopnje okužbe. Primer so encimi ali transkripcijski faktorji, ki so pomembni za sintezo aminokislin ali drugih hranil, ko se gliva nahaja v pogojih pomanjkanja hranil v ksilemu; če geni ne opravlja svoje naloge, ki sicer ni neposredno povezana z napadom glive na rastlino, patogen ne more uspešno kolonizirati gostitelja (Singh in sod., 2010; Timpner in sod., 2013, He in sod., 2015). Na drugi strani pa so geni, ki imajo direkten vpliv na virulenco, npr. geni za CWDE encime in efektorski geni (Tzima in sod., 2011, de Jonge in sod., 2012). Ne glede na to, kakšno nalogo opravlja nek gen v fitopatogeni glivi, ga s funkcijskimi študijami dokazanem vplivu na virulenco patogena imenujemo virulentni dejavnik.

2.8.1 Sekvencirani genomi vrst *Verticillium* spp.

Broad inštitut (Broad Institute; <http://www.broadinstitute.org/>) je prve podatke o nukleotidnih zaporedjih genoma iz *Verticillium* spp. objavil v letu 2008, in sicer za vrsti *V. dahliae* in *V. alfalfae* (prejšnje poimenovanje *V. albo-atrum*). Sekvencirali so genoma dveh reprezentativnih izolatov iz solate (*V. dahliae* VdLs.17) in lucerne (*V. alfalfae* VaMs.102). Genoma obeh vrst sta si precej podobna, toda genom *V. dahliae* naj bi bil večji in vsebuje štiri LS (angl. lineage specific; LS) regije, ki jih v genomu *V. alfalfae* ni (Klosterman in sod., 2011). Ti prvi genomske podatki, skupaj s sekvencami iz druge generacije sekvenciranja (de Jonge in sod., 2013; Seidl in Thomma, 2014; Faino in sod., 2015), so omogočili uporabo funkcijske genomike pri raziskovanju virulence in razvoja patogenov *Verticillium* spp. in na ta način hiter napredek pri razumevanju evolucijskih vzgibov pri adaptaciji teh pomembnih fitopatogenih vrst. Do danes je bilo sekvenciranih že več izolatov različnih vrst iz rodu *Verticillium* spp.: 10 izolatov glive *V. dahliae* iz različnih gostiteljev (Jonge in sod., 2012); širje izolati *V. dahliae* iz jagod (Cockerton in sod., neobjavljeno), izolati iz bombaževca (An in sod., 2010), šest izolatov glive *V. nonalfalfae* (trije letalni izolati patotipa PV1 - genotip PG2 in trije blage izolate patotipa M - genotip PG1) (Javornik in sod., neobjavljeno).

2.8.2 Geni, ki so povezani z vdorom patogena v rastlino in prilagoditvijo na okolje

Ko patogen vstopi v rastlino, začne intenzivno izražati gene za vegetativno rast in povečanje patogenosti, da se lahko širi tudi horizontalno po rastlini v sosednje celice in tkiva. Takšna razširjena rast in sekrecija različnih virulentnih dejavnikov vodi v smrt rastline in prehod patogena v nekrotrofično fazo razvojnega cikla.

Fitopatogeni se morajo za uspešen začetek okužbe rastline pritrdirti na površino rastlinskih celic in nato prodreti skozi povrhnjico v notranjost rastline. Glive, kot so *Magnaporthe grisea*, *Blumeria graminis*, *Colletotrichum graminicola*, *Puccinia graminis*, *Ustilago maydis* in *Cladosporium fulvum* tvorijo na površini rastline apresorij. Apresorij je visoko specializirana in melanizirana konica hife ali klične hife, ki olajša pritrdiritev in vdor glive v gostitelja. *Verticillium* spp. ne tvorijo apresorija, zato so za pritrdiritev struktur na površino odgovorne molekule, kot so adhezini. Tran in sod. (2014) so določili *Vta2* gen, ki je transkripcijski aktivator in kontrolira okužbo korenin gostitelja. Protein spada v skupino

cinkovih prstov in ima ortolog Con7 v glivi *Magnaporthe grisea*, kjer je protein odgovoren za tvorbo apresorija (Odenbach in sod., 2007). Vta2 protein je ključen za adhezijo pri kvasovkah. Tran in sod. (2014) so pomen gena *Vta2* raziskovali v *V. dahliae*, *V. albo-atrum sensu lato* in *V. longisporum*, za vse tri vrste so pridobili mutante z izbitim *Vta2* genom. *Vta2* preko nadzora izražanja genov, ki kodirajo hipotetične adhezinom podobne proteine in druge hipotetične sekretorne proteine, usmerja kolonizacijo korenin paradižnika v začetni fazni okužbe glive *V. dahliae*. V primerjavi z divjim tipom *V. dahliae* so imeli *Vta2* mutanti veliko slabšo sposobnost kolonizirati korenine in vzpostaviti obolenje na gostiteljski rastlini. Poleg tega ima gen pomembno vlogo v rasti glive, saj v odvisnosti od razpoložljivih hranil v okolju inducira konidiacijo, hkrati pa zavira tvorbo trajnih struktur (mikrosklerocijev). *Vta2* se tako odziva na obrambne mehanizme gostitelja, saj z zaviranjem ali zaustavitvijo tvorbe trajnih struktur vso energijo preusmeri v konidiacijo, s katero poskuša premagati obrambne odzive gostitelja in kolonizirati vaskularni sistem. Izbitje gena pa ne vlica na patogenost mutantov, ki vseeno kolonizirajo rastlino, toda v manjšem obsegu v primerjavi z divjim tipom. *Vta2* vpliva na izražanje vsaj 275 genov, med katerimi so številni virulentni dejavniki, npr. domnevni adhezinski geni in medvrstno ohranjeni efektorji (npr. NLP2 in LysM), prav tako pa geni pod nadzorom *Vta2* vplivajo na druge procese, kot so celična rast, aktivacija obrambnih mehanizmov, način molekularnega transporta in aktivnost celičnega metabolizma. Delecijski mutanti brez gena *Vta2* so na gojišču z dodanim vodikovim peroksidom rastli slabše v primerjavi z divjim tipom. To pomeni, da *Vta2* regulira izražanje gena za encim katalazo-peroksidazo (gen *CPX2*), ki varuje glivo pred rastlinskim vodikovim peroksidom. Mutanti *V. longisporum* z utišanim genom *Vta2* niso bili patogeni na oljni ogrščici, prav tako jih je vodikov peroksid v gojišču zavrl v rasti bolj od divjega tipa. *Vta2* mutanti glive *V. albo-atrum sensu lato* niso bili uporabljeni za okuževanje rastlin, ampak so v raziskavi samo preverjali rast mutanta na gojišču z vodikovim peroksidom. Izbitje gena *Vta2* tudi v tej vrsti je imelo enak učinek, in sicer so mutantni kazali zmanjšano rast v primerjavi z divjim tipom (Tran in sod., 2014).

Encimi, ki jih fitopatogene glive izločajo med kolonizacijo, so virulentni faktorji in prispevajo k virulenci, saj so lahko njihove tarče fizične (npr. celična stena) in kemične ovire (npr. saponini), ki jih rastline postavljajo ob napadu. Encimi delujejo tudi na druge inducirane rastlinske obrambne odzive (de Sain in sod., 2015). Z analizo genomov *Verticillium* spp. je bilo ugotovljeno, da se v teh patogenih v primerjavi z ostalimi glivami nahaja več CWDE encimov, še posebej veliko je genov za pektinolitične encime (Klosterman in sod., 2009; Ma in sod., 2010). Pektin je glavni gradnik rastlinskih celičnih sten in predstavlja do 35 % vseh polisaharidov v dvokaličnicah (Mohnen, 2008). Kot obrambni odgovor lahko rastlina del svojega prevajalnega tkiva zamaši s tvorbo pektinskih gelov in tiloz (Clérivet in sod., 2000; Cregeen in sod., 2015), zato se predvideva, da povečana vsebnost genov za razgradnjo pektina v genomu vaskularnih patogenov pripomore k kolonizaciji prevodnih tkiv gostiteljske rastline (Klosterman in sod., 2009; Yadeta in Thomma, 2013). Tudi v genomih drugih patogenih gliv je bilo odkrito povečano število encimov za razgradnjo pektina, npr. v *Colletotrichum* spp. (Gan in sod., 2013) in *Rhizoctonia solani* AG8 (Hane in sod., 2014).

Dokaz za vpleteneost CWDE v virulentnost so Tzima in sod. (2011) ponazorili s primerom, ko so iz genoma *V. dahliae* izbili gen *VdSNF1* (angl. sucrose non-fermenting 1 gene), ki kodira del kinaznega kompleksa, ki je udeležen v katabolnem uravnavanju vsaj 6 različnih

pektat liaz in skupine CAZy encimov (angl. Carbohydrate-Active enZYmes), to so encimi s katalitično domeno in domeno za vezavo na ogljikove hidrate. Mutacija gena *VdSNF1* je onemogočala rast mutantu *V. dahliae* na gojišču, kjer je bil pektin edini vir ogljika. Zaradi tega je mutant tvoril manj mikrosklerocijev. Čeprav je mutant tvoril za 50 % več konidijev kot divji tip, je vseeno slabše okuževal testno rastlino *Nicotiana benthamiana*. Test okuževanja je pokazal, da mutant zaradi manjše sinteze CWDE encimov ne more rasti znotraj rastlinskih lamel, kjer se nahaja pektin. Prav tako ne more preiti gostiteljskih odebelitev celičnih struktur, ki vsebujejo pektin in naprej kolonizirati gostitelja, zato mutant ni mogel okuževati zgornjih poganjkov rastlin. Izkazalo se je, da so CWDE encimi pomembni v procesu kolonizacije gostitelja in pri premagovanju s pektinom povezanih obrambnih mehanizmov (Tzima in sod., 2011). Podobni učinki mutacije *SNF1* homologa so bili opaženi tudi v fitopatogenih glivah *Cochliobolus carbonum* (Tonukari in sod., 2000), *Fusarium oxysporum* (Ospina-Giraldo in sod., 2003) in *Magnaporthe oryzae* (Yi in sod., 2008). Gen *VdSSP1* iz *V. dahliae* izolata VDG1, ki je visoko virulenten na bombaževcu, je bil določen s pristopom komperativne genomike v primerjavi genomov visoko virulentnih in manj virulentnih sevov (An in sod., 2010). Funkcija proteina *VdSSP1* je verjetno povezana z metabolizmom ogljikovih hidratov oz. z razgradnjo rastlinske celične stene, saj je gen nujno potreben za normalno rast glive, če sta ji na voljo pektin in škrob kot edina vira ogljika. To kaže na to, da je gen udeležen v procesu vdora patogena v korenine bombaževca. Zato ni presenetljivo, da ima mutant z izbitim *VdSSP1* genom močno zmanjšano virulenco. Protein je visoko vrstno specifičen, saj obstaja samo en znan homolog, in sicer v sevu *VdLs.17* (Liu in sod., 2013). Določen je bil še en gen iz skupine CAZy encimov v glivi *V. dahliae*, ki je pomemben za virulenco seva *VdLs.17*. S pregledom večjega števila z naključno mutagenezo pridobljenih mutantov, ki so izkazovali nepravilnosti v rasti in tvorbi trajnih struktur mikrosklerocijev, so določil protein endoglukanazo *VdEG-1*, ki je v drugih glivah pomemben predvsem za razgradnjo glukoze. Mutant z okvarjenim *VdEG-1* genom se je od divjega tipa razlikoval v slabšem prodiranju v rastlino in slabši kolonizaciji ksilema solate v začetni fazni okužbe. Mutant ni več proizvajal mikrosklerocijev na PDA gojišču (Maruthachalam in sod., 2011). Visoka aktivnost enicima endo- β -1,4-glukanaze, ki razgrajuje celulozo, je tudi povezana z večjo agresivnostjo v *V. dahliae* (Novo in sod., 2006). Širok nabor hidrolitičnih encimov iz različnih skupin pa sta Mandelc in Javornik (2015) odkrila v *in vitro* sekretomske študiji vrste *V. nonalfafae*. Največ je bilo pektinolitičnih encimov, karboksisteraz in oksidoreduktaz. Vsi ti encimi spadajo v CWDE skupino.

Tudi prva funkcionalna analiza glivne vrste *V. albo-atrum sensu lato* je bila narejena za CWDE encim, in sicer za encim pektinazo. Durrands in Cooper (1988a, b) sta uporabila pristop napredne genetike in s kemijsko mutagenezo pridobila mutant z okvarjenim genom za encim pektinazo. Rezultat mutacije je bil, da so mutantni povzročali milejše simptome na paradižniku v primerjavi z divjim tipom, čeprav so v istem obsegu kolonizirali rastlino kot divji tip. Ugotovila sta, da mutanti izločajo manj encima, kar je vplivalo tudi na zmanjšano virulenco, saj je stopnja virulentnosti posameznih sevov povezana s stopnjo tvorjenja pektinolitičnih encimov. Pektinaze vplivajo na virulentnost ne pa tudi na patogenost vrste *V. albo-atrum sensu lato* (Durrands in Cooper, 1988a, b).

Odkrit je bil še en encim, ki sicer ne spada med CWDE, vendar je vseeno potreben za vzpostavitev normalne virulence na gostiteljski rastlini. Maruthachalam in sod. (2011) so s

patogenimi testi potrdili vlogo v patogenezi za encim HMG-CoA (hydroxymethylglutaryl-CoA) sintazo (VdLs.17 genski model *VDAG_1009.1*). Gre za encim, ki je ključnega pomena v sintezi sterolov različnih organizmov. Steroli so v glivah pomembni za normalno rast in viabilnost spor. Nahajajo se v celičnih membranah in vzdržujejo strukturno celovitost membrane in fluidnost (de Souza in Rodrigues, 2009). Zanimivo je, da encim HMG-CoA sintaza sodeluje tudi pri sintezi trihotecenskega mikotoksina T-2 v *Fusarium* spp. (Peplow in sod., 2003). Zmanjšana virulenta mutantna na solati kaže, da okvara encima HMG-CoA sintaze onemogoča glivi normalno okužbo in kolonizacijo testne rastline (Maruthachalam in sod., 2011).

CWDE encimi glivi ne omogočajo samo prehajanje fizičnih preprek rastlinske obrambe, ampak tudi pripomorejo k pridobivanju ogljikovih hidratov iz okolja, v katerem se gliva nahaja med okužbo. Ker *Verticillium* spp. kolonizirajo ksilem, ki je s hranili osiromašeno okolje (Lopez-Millan in sod., 2000), si morajo nekatere živiljenjsko pomembne komponente sintetizirati sami, npr. aromatične aminokisline, saj je koncentracija teh in drugih organskih hranil v prevodnem sistemu rastline premajhna, da bi lahko gliva preživelna zgolj na račun gostitelja. Da je gliva odvisna od lastne sinteze aromatičnih aminokislín v *in planta* pogojih, je bilo jasno pokazano s pomočjo RNA utišanja gena *VlarO2* v *V. longisporum*. *VlarO2* je gen za encim korizmat sintazo, ki je prvi encim v šikimatni poti sinteze aromatičnih aminokislín. Mutant z utišanim genom je sicer uspešno okužil rastlini *Brassica napus* in *Arabidopsis thaliana*, vendar so bili simptomi na rastlinah mnogo šibkejši v primerjavi z divjim tipom, prav tako pa je mutant rastline koloniziral v manjšem obsegu in se ni razširil v zgornje poganjke, na kar je nakazovala nižja vsebnost glivne biomase v okuženih rastlinah (Singh in sod., 2010). Podoben učinek se je zgodil ob utišanju gena *ViCPC1*, ki je transkripcijski regulator in nadzoruje izražanje genov za sintezo aminokislín lizina, leucina, arginina in triptofana v okolju, kjer primanjkuje hranil. Ekspresija gena *ViCPC1* naraste v času okužbe. Gen je nujno potreben za normalno napredovanje bolezni. Utišanje gena v *V. longisporum* in izbitje gena v *V. dahliae* je botrovalo k nezmožnosti rasti mutantov na gojišču brez dodatka aminokislín, poleg tega pa se je virulenta mutantov občutno zmanjšala, saj niso mogli kolonizirati višjih predelov rastlin (Timpner in sod., 2013).

Ko se patogen nahaja v ksilemu, je podvržen pomanjkanju hranil. V takih razmerah lahko mikroorganizmi aktivirajo z avtofagijo povezano pot pridobivanja za preživetje nujno potrebnih hranil. Avtofagija je proces razgradnje citoplazemskih organelov in makromolekul v pogojih pomanjkanja hranil v okolju. Na ta način celice preživijo neugodne razmere. Avtofagija se dogaja v avtofagosomih, ki so dvomembranski citoplazemski organeli (Reggiori in Klionsky, 2002). Nekaj nedavnih raziskav je pokazalo, da avtofagija vpliva za celično diferenciacijo in patogenost v številnih rastlinskih patogenih (Zhou in sod., 2013). Poskusi na *Magnaporthe oryzae* na 16 genih, ki so povezani z avtofagijo, so pokazali, da mutanti, ki so bili že samo brez enega izmed teh za neselektivno avtofagijo pomembnih genov, ne morejo povzročiti obolenja, saj ne morejo tvoriti apresorija (Kershaw in Talbot, 2009). Vendar pa se je pri *V. dahliae* izkazalo, da gena *VdATG8* in *VdATG12*, ki sta povezana z avtofagijo, nista udeležena v virulenco, saj so mutantni na repnjakovcu povzročali enake simptome kot divji tip. Prav tako mutacija posameznega gena ni bistveno vplivala na rast mutantov na gojišču in na tvorbo mikrosklerocijev. Sta pa imela mutantna zmanjšano konidiacijo, tudi rast zračnih hif je bila

okrnjena. Očitno imata gena *VdATG8* in *VdATG12* za avtofagijo pri *V. dahliae* vlogo samo v konidiaciji in pri tvorjenju zračnih hif, proces avtofagije pa pri *V. dahliae* nima neposrednega vpliva na virulenco (Zhou in sod., 2013).

Glive pred okoljskim stresom varujejo tudi hidrofobini, ki so majhni sekretorni proteini, veliki do 100 aminokislin in vsebujejo osem cisteinskih ostankov. Med seboj se lahko povežejo v amfifilne membrane. Hidrofobini so vpleteni v številne procese v glivah, npr. v površinsko pritrjevanje glivnih struktur (konidiji, hife, večcelične strukture), v razvoj sporangijev in zračnih hif ter v zaščito glivnih spor pred vplivi okolja, povezanimi z vlagom ali izsuševanjem (Wösten, 2001; Whiteford in Spanu, 2002). Izbitje *VDH1* gena, ki kodira gen za hidrofobin iz razreda II iz seva Dvd-T5 v *V. dahliae* je vplivalo na signifikantno zmanjšanje tvorbe mikrosklerocijev in povečalo občutljivost konidijev na izsuševanje. Zanimivo je, da mutant ni imel znižane virulence pri okuževanju paradižnika, ampak se je virulanca celo povečala (Klimes in Dobinson, 2006). Templeton in sod. (1994) so predlagali, da so lahko nekateri hidrofobini elicitorji, Pazzagli in sod. (1999) pa so za hidrofobinski protein (angl. cerato-platanin) iz fitopatogene glive *Ceratocystis fimbriata* to tudi dokazali. Zato sta Klimes in Dobinson (2006) zaključili, da je mogoče, da je *VDH1* tudi elicitor, ki sproži obrambni odziv rastline. Pri mutantih, ki *VDH1* gena ne vsebujejo, rastline ne prepoznajo napada patogena tako hitro, zato lahko gliva v večjem obsegu kolonizira gostitelja. S pristopom naključne mutageneze je bil odkrit še en gen, ki je vpletен v odgovore na različne okoljske strese. Gen *VdGRPI* za protein VdGARP1 iz *V. dahliae* je bil visoko izražen *in planta* v pogojih, kot so pomanjkanje hranil, vode in neuravnoteženost soli v okolju. Gen kodira z glutamatom bogat protein in še ni anotiran v nobeni podatkovni bazi, tako da gre za edinstven protein, katerega vpletjenost v patogenezi je bila potrjena na bombaževih testnih rastlinah. Mutant je imel zmanjšano virulenco, poleg tega pa je prišlo do tvorbe mikrosklerocijev bolj pozno in v manjšem obsegu kot pri divjem tipu. Protein je vpletен v zaznavo pomanjkanja hranil v okolju, ki nastane po odmrtvu rastline in inducira zaključek nekrotrofne faze razvojnega kroga patogena z začetkom tvorbe trajnih struktur - mikrosklerocijev (Gao in sod., 2010).

Klosterman in sod. (2011) so s pristopom primerjalne genomike analizirali genome vrst *V. dahliae*, *V. alfalfae* in *F. oxysporum*, ki so vaskularni fitopatogeni. Na ta način so določili gen za glukoziltransferazo, ki ga vsebujejo vse tri vrste, ne nahaja se pa v nobenih drugih glivnih vrstah (razne v vrsti *Metarrhizium anisopliae*, ki je patogena za insekte), niti v ostalih vrstah iz rodu *Fusarium* (*F. solani*, *F. graminearum* in *F. verticilloides*). Encim je zelo podoben bakterijskim encimom, ki so vpleteni v osmoregulacijo v periplazemske prostoru s sintezo glukanov, ki se izolčajo v pogojih osmotskega stresa z namenom preprečiti puščanje membrane. Mutanti *V. dahliae* seva VdLs.17 z izbitim genom se morfološko niso razlikovali od divjega tipa. Pri umetnem okuževaju solate so bili mutantni enako patogeni kot divji tip. Toda pri okuževanju tobaka *N. benthamiana* pa so se pokazale zelo jasne razlike v virulenci. Iz tega so sklepali, da je gen za glukoziltransferazo virulentni dejavnik, ki vpliva na patogenost glive na tobaku. Gen so vse tri proučevane glivne vrste verjetno pridobile preko horizontalnega medvrstnega genskega prenosa iz bakterij in verjetno v glivah opravlja isto funkcijo kot v bakterijah, torej prilaganje na osmotski stres (Klosterman in sod., 2011).

Vaskularni patogeni po vstopu v gostitelja živijo v njegovem ksilemu, kjer je prisotnost hranil zelo nizka, saj po ksilemu rastline poteka transport vode in mineralov, med katerimi je tudi dušik. Toda količine ogljika so v ksilemskem soku zelo majhne. *V. dahliae* za tvorbo mikrosklerocijev potrebuje oba elementa v zadostnih količinah, saj je v nasprotnem primeru tvorba mikroskleorocijev zmanjšana (Klimes in sod., 2008). V kvasovkah je proteinaza B (cerevisin) glavni proteolitični encim, ki se aktivira v pogojih pomanjkanja hranil, predvsem ogljika in dušika, in razgrajuje proteine z namenom zagotoviti celicam ustreznega hranila (Yike, 2011). He in sod. (2015) so ugotovili, da imajo mutanti *V. dahliae* z okvarjenim genom za proteinazo cerevisin zmanjšano virulenco na bombaževcu. Uporabili so ATMT (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) metodo transformacije in naključno insercijsko mutagenezo za pridobivanje velikega števila mutantov seva Vd991 glive *V. dahliae*. Na podlagi signifikantno zmanjšane tvorbe mikrosklerocijev so izbrali mutant, za katerega so ugotovili, da ima mutiran gen *cerevisin*. Poleg očitno zmanjšanih bolezenskih znamenj pri okuževanju bombaževca je imel mutant tudi zmanjšano tvorbo konidijev in zmanjšano micelijsko rast na gojišču. Pri analizi sekretornih proteinov so ugotovili, da mutant z nedelujočim genom izloča bistveno manj proteinov nižjih molekulskih mas (14 - 25 kDa), med katerimi so bili CWDE encimi, strukturni proteini celične stene, drugi s celično steno povezani encimi in nekaj neznanih proteinov. Aplikacija proteinskega ekstrakta iz divjega tipa na kotiledone bombaževca je povzročila tipične simptome uvelosti, medtem ko so bili simptomi na kotiledonih po nanosu ekstrakta iz mutantnega milejši. To potrjuje že znano domnevo, da so CWDE pri *V. dahliae* pomemben faktor patogeneze. Očitno je, da so nekateri CWDE pod nadzorom gena za cerevisin, ki vpliva na virulenco v *V. dahliae*, vendar ni ključnega pomena. Rezultati poskusa so pokazali, da je cerevisin vpletен v nadzor številnih procesov, ki vključujejo razvoj organizma, izločanje nekaterih CWDE, vegetativno rast, tvorbo trajnih organov in konidijev ter ima vpliv na virulenco. Cerevisin je verjetno v času okužbe, ko se patogen nahaja v okolju pomanjkanja ogljika, nujno potreben za razgradnjo proteinov, s čimer gliva pride do potrebnih hranil, kar ji omogoča preživetje. Poleg tega nadzoruje določene CWDE. Vse vloge cerevisina v *V. dahliae* verjetno sinergistično vplivajo na virulenco (He in sod., 2015).

2.8.3 Geni, ki so pomembni za obrambo patogena pred prvim nivojem rastlinske obrambe

Ksilem je stresno okolje ne samo zaradi pomanjkanja hranil, ampak tudi zaradi strižnih sil in osmolarnosti ksilemskega soka (Andersen in sod., 1995). Poleg tega se v tem okolju dogajajo številni rastlinski obrambni odzivi, na katere mora gliva ustrezno reagirati, če želi nadaljevati kolonizacijo. Glive pri razširjanju v rastlini izločajo številne molekule in se na ta način borijo ne samo proti zahtevnim živiljenjskim pogojem, ampak tudi proti rastlinskim obrambnim odzivom (Yadeta in Thomma, 2013). Eden izmed najhitrejših odzivov rastline na napad patogena je množično proizvajanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS), npr. vodikovega peroksida (H_2O_2), superoksidnih radikalov ali hidroksi ionov. Temu odzivu pravimo tudi oksidativni izbruh (Lamb in Dixon, 1997; Mayer in sod., 2001). Najpomembnejši ROS v tem odzivu je H_2O_2 (Wojtasze, 1997), ki napada patogena in oksidira njegove proteine, lipide ter nukleinske kisline, kar vodi v večje poškodbe v celični strukturi (Medentsev in sod., 2001). V glivni odgovor na prvi nivo rastlinske obrambe so

udeleženi številni geni. Ksilemsko okolje predstavlja za patogena oksidativni stres, na katerega se odzove z izločanjem obrambnih proteinov. *V. longisporum* se na ksilemski sok oljne ogrščice, ki je naravni gostitelj za to glivo, odzove z izločanjem številnih s stresom povezanih proteinov, kot so katalaze, peroksidaze in HS proteini (angl. heat shock, HS). *V. longisporum* izloča katalazo peroksidazo, katere naloga je ščititi glivo pred napadi H₂O₂. Mutant z utišanima izogenoma *VlcpeA* za encim katalazo-peroksidazo, katerega sinteza in sekrecija sta se zmanjšali za 80 %, je postal občutljiv na ROS. Prav tako se je vpliv zmanjšane produkcije encima videl pri okuževanju oljne ogrščice; mutantni sev je na začetku rastline okužil normalno, vendar pa do poznih faz okužbe v višjih predelih rastline ni prišlo, najverjetneje zaradi propada glive kot posledice izpostavljenosti vplivu ROS delcev (Singh in sod., 2012).

Na podoben način na oksidativni stres odgovori tudi *V. dahliae*. Protein VdTHI4 iz *V. dahliae* katalizira sintezo tiazola, ki je prekurzor za tiamin (vitamin B1). Tiamin je udeležen v odgovor glive na oksidativni stres. Mutanti z izbitim *VdThi4* genom kažejo slabšo rast, kadar so na gojišču brez dodanega tiamina. Prav tako pa so bolj občutljivi na oksidativni in UV stres. Mutanti lahko okužijo testno rastlino paradižnik, vendar pa ne zmorejo kolonizirati višjih delov rastline. Mogoče je, da je vloga tiamina v virulenci specifična samo za *Verticillium* spp., saj homolog *stri35* iz *Fusarium oxysporum* nima vloge v virulenci te glive (Hoppenau in sod., 2014).

Nekatere rastlinske vrste začnejo ob zaznavi patogena v večjem obsegu izločati antimikrobine sekundarne metabolite, kot so rutin, kvercetin, kaempferol, naringenin (Rozema in sod., 2002), saponini (Sandrock in Vanetten, 1998.), seskviterpeni in fenoli (flavoni, flavonoidi in kumarini) (Daayf in sod., 1997). Krompir ob napadu *V. dahliae* v povečanem obsegu sintetizira in v različnih tkivih akumulira rutin, ki je antioksidant in preprečuje oksidativne poškodbe rastlinskega tkiva. Rutin (kvercetin -3-rutinozid), ki zavira rast in razvoj glivnega micelija, je toksičen za patogena ob neposrednem stiku ali pa po oksidaciji v kinone (el Hadrami in sod., 2011). Rutin lahko *V. dahliae* z encimom kvercetinazo razgraje in se na ta način zaščiti pred njegovimi toksičnimi vplivi, kar je bilo potrjeno v funkcionalni študiji, kjer je mutant z izbitim genom *VdQase* za encim kvercetinazo izkazoval manjšo virulenco na krompirju v primerjavi z divjim tipom. To je potrdilo udeleženost tega encima v patogenezi *V. dahliae* na krompirju. Encim ima vpliv tudi na celično signalizacijo v rastlini, povezano s salicilno in jasmonsko kislino (el Hadrami in sod., 2015).

Gliva se mora med kolonizacijo zaščititi pred napadi rastlinske obrambe. Maruthachalam in sod. (2011) so v *V. dahliae* (izolat VdLs.17) odkrili gen *VdMFS* (genski model *VDAG_09647.1*), ki lahko zaščiti glivo pred toksičnimi vplivi rastlinskega obrambnega sistema. Gre za gen iz MFS skupine prenašalcev (angl. major facilitator superfamily), ki omogoča odpornost na fungicidno delovanje rastlinskih molekul, vendar vse vrste gliv ne vsebujejo teh genov (Kapoor in sod., 2009). Mutanti *V. dahliae* z okvarjenim *VdMFS* genom so na gojišču tvorili manj mikrosklerocijev, prav tako pa so v manjšem obsegu kolonizirali korenine solate. *VdMFS* gen je vpletten v obrambo glive pred rastlinskimi obrambnimi odzivi (Maruthachalam in sod., 2011).

2.8.4 Geni, ki so pomembni za preprečevanje rastlinske signalizacije

Ob vstopu v ksilem mora gliva čim bolj omejiti tudi delovanje rastlinskih hormonov, ki so povezani predvsem s signalizacijo. Patogeni se proti rastlinskim hormonom borijo na različne načine. Lahko izločajo efektorje, ki napadajo rastlinske encime, ki so udeleženi v izgradnjo hormonov. Lahko sami proizvajajo fitohormone, ki posnemajo rastlinske ali pa izločajo proteine z encimatsko aktivnostjo, ki razgradijo prekurzorje rastlinskih hormonov. Na ta način patogeni zmanjšajo odziv gostitelja na invazijo ter ustavijo ali upočasnijo obrambni odgovor rastline (Soanes in sod., 2008). Ob invaziji patogena v rastlino se začnejo sproščati velike količine salicilne kisline (SA), ki opozorijo na prisotnosti tujega organizma. SA je centralna signalna molekula PTI odziva (Fu in Dong, 2013; Dempsey in sod., 2011), katere prekurzor je izokorizmat (Strawn in sod., 2007).

Liu in sod. (2014) so zaviranje s salicilno kislino povezanega obrambnega odgovora raziskovali v *V. dahliae*. Gliva ob okužbi izloča encim izokorizmatazo, ki razgrajuje izokorizmat v 2,3-dihydroxybenzoat (DDHB) in na ta način onemogoča nastanek hormona SA. Gen *VdIsc1* za encim izokorizmatazo so določili z bioinformacijskim pristopom (BLAST primerjava 40 znanih genov iz drugih patogenov na *V. dahliae* genom). Mutant z izbitim izokorizmataznim genom je imel močno zmanjšano virulenco na bombaževcu in repnjakovcu. Encim izokorizmataza je sekretorni protein, saj je bil z western metodo določen v supernatantu kulture. Zanimivo je predvsem to, da gen *VdIsc1* ne vsebuje signale domene za izločanje iz celice, zato poteka sekrecija po nekonvencionalni poti (Nickel, 2010), vendar mehanizem izločanja encima ni še poznan. Netipičen način sekrecije efektorskih proteinov razkriva širino pristopov, ki jih patogeni uporabljajo pri boju z gostiteljem. Zaradi številnih oblik in nalog, ki jih opravljajo efektorski proteini, je nabor potencialnih efektorjev pri bioinformacijski analizi zelo širok (Liu in sod., 2014). Na ta način, ko patogen zavira nastanek hormona in signalne molekule SA, vpliva na povečano neobčutljivost rastline na invazijo patogena.

2.8.5 Efektorski geni

Glivni patogeni izločajo efektorje z namenom podrediti si gostiteljsko rastlino za lastno preživetje (Rovenich in sod., 2014). Efektorji lahko delujejo celo proti drugim mikroorganizmom, ki naseljujejo isti prostor (Kombrink in Thomma, 2013; Rovenich in sod., 2014). Glivne efektorje lahko razdelimo v dve skupini (Klimes in sod., 2015). V prvi skupini so efektorji, ki so medvrstno ohranjeni pri številnih rastlinskih patogenih, npr. LysM in NLP proteini (Thomma in sod., 2011), v drugi skupini pa so majhni, s cisteinom bogati proteini brez znane funkcije (Hann in Boller, 2012).

2.8.5.1 NLP proteini

NLP proteini (angl. necrosis- and ethylene-inducing-like proteins) spadajo v skupino efektorjev, ki so široko razširjeni in ohranjeni med vrstami, saj se nahajajo v patogenih bakterijah, glivah in oomicetah (Gijzen in Nürnberg, 2006). NLP proteini povzročajo permeabilnost membran v rastlinskih celicah in citolizo, ki se kaže v nekrozi listov. Zaradi

fitotoksičnega delovanja na rastlinske celice sprožijo imunski odgovor rastline (Ottmann in sod., 2009). Genom *V. dahliae* vsebuje osem predvidenih genskih modelov za NLP proteine (Klosterman in sod., 2011). S testom agroinfiltzacije je bilo ugotovljeno, da samo dva (NLP1 in NLP2) kažeta citotoksično aktivnost za rastlinske celice (Zhou in sod., 2012; Santhanam in sod., 2013). Za NLP1 se je izkazalo, da ima v sevu JR2 iz paradižnika vlogo pri nastajanju spor in pri vegetativni rasti (Santhanam in sod., 2013). Za protein VdNEP, ki je homolog proteinu NLP1 in izvira iz seva Vd-8 iz bombaževca, so že Wang in sod. (2004) prav tako ugotovili vpletene ne samo v glivni metabolizem, ampak tudi v nastajanje nekrotičnih lezij v rastlinskem tkivu. Ugotovili so, da očiščen protein v rastlinskih vrstah *N. benthamiana* in *A. thaliana* sproži značilne obrambne odgovore, kot je programirana celična smrt in izločanje reaktivnih kisikovih radikalov. VdNEP je induciral povišano ekspresijo obrambnih (PR) genov v rastlini, povečana je bila tudi ekspresija genov za sintezo etilena, salicilne in jasmonske kisline (Wang in sod., 2004). Citotoksičnost proteina VdNEP so testirali tudi Yao in sod. (2011), ki so *in vitro* pridobljen VdNEP protein infiltrirali v kotiledone in liste sončnice ter tudi opazili tipične simptome, kot so kloroze, nekroze in vaskularne potemnitve, obenem pa prav tako rastlinsko obrambno reakcijo v obliki hipersenzitivnega odgovora (Yao in sod., 2011). Mogoče je, da imajo tudi preostali NLP proteini podobno funkcijo, ki ni nujno povezana z indukcijo nekroz v rastlinskem tkivu (Santhanam in sod., 2013). Vendar pa zaenkrat še noben NLP brez citotoksične aktivnosti ni bil testiran za vpletene v patogenezo (de Sain in sod., 2015), razen *NLP4*, za katerega Luo in sod. (2014) navajajo neobjavljene podatke, da so testirali delecijskega mutanta za gen *NLP4*, ki pa prav tako ni kazal sprememb virulence na bombaževcu. Oba citotoksična proteina (NLP1 in NLP2) sta bila funkcionalno karakterizirana glede vloge v virulenci. Gena sta v sevu JR2 nujno potrebna za vzpostavitev polne virulence na paradižniku in repnjakovcu, medtem ko nobeden izmed njiju ne sodeluje v virulenci seva *V. dahliae* V592, ki okužuje bombaževce. To je dokaz za funkcionalno raznovrstnost, ko imajo isti proteini ali homologi različne vloge v različnih gostiteljih. Dodatna potrditev funkcionalne raznovrstnosti je bilo odkritje, da je za vzpostavitev polne virulence seva JR2 na tobaku *Nicotiana benthamiana* potreben samo NLP1, NLP2 pa nima vloge v virulenci. Še več, gen za NLP2 med okužbo tobaka *N. benthamiana* sploh ni izražen. Mutant z izbitim genom *NLP1* je imel spremenjeno morfologijo. Mutacija je imela vpliv na vegetativno rast, saj je mutant tvoril več zračnih hif in manj konidioforov. Izbitje gen *NLP2* iz seva JR2 ni vplivalo na njegovo morfologijo (Santhanam in sod., 2013). V glivnih genomih se navadno nahajajo dva do trije geni za NLP proteine. Genom *V. dahliae* vsebuje kar osem predvidenih genov za NLP proteine. Razširitev družine NLP proteinov v *V. dahliae* je verjetno posledica funkcionalne raznovrstnosti, saj ima *V. dahliae* zelo širok nabor gostiteljev (Klosterman in sod., 2011).

2.8.5.2 LysM proteini

Analize *Verticillium* spp. genomov so razkrile proteine, ki so homologni efektorjem z lizinskim motivom (angl. lysin motif; LysM) iz *Cladosporium fulvum* (Klosterman in sod., 2011; de Jonge in Thomma, 2009). Naloga LysM efektorjev je, da vežejo prost hitin, ki nastane pri razgradnji glivnih celičnih sten zaradi delovanja rastlinskih hitinaz in na ta način onemogočajo rastlini prepoznavo patogena preko prostega hitina, ki bi sprožil PTI odziv. Hitinske molekule namreč uvrščamo med PAMP molekulske vzorce (Kombrink in

Thomma, 2013). *Verticillium* genomi vsebujejo šest osnovnih (angl. core) LysM efektor kodirajočih genov (Klimes in sod., 2015). Zanimivo v zvezi z LysM proteini v *Verticillium* spp. je to, da osnovni LysM efektorski geni ne prispevajo k patogenosti *Verticillium* spp. Izkazalo se je, da med okužbo paradižnika in tobakovca *N. benthamiana* geni ne kažejo povečane ekspresije, prav tako pa izbitje posameznega LysM efektorskega gena ni imelo vpliva na virulenco *V. dahliae* pri okuževanju paradižnika (Kombrink, 2014). Toda de Jonge in sod. (2013) so v sevu VdLs.17 odkrili še sedmi LysM gen (genski model *VDAG_05180*), ki se nahaja na linijsko specifični regiji tega seva in je nujno potreben za razvoj bolezni in kolonizacijo gostitelja. Mutanti za gen *VDAG_05180* so imeli zmanjšano virulenco na paradižniku v primerjavi z divjim tipom.

2.8.5.3 Ave1 je prvi avirulentni efektor, odkrit v *Verticillium* spp.

Na podlagi RNA-seq podatkov in analize diferencialno izraženih genov *V. dahliae* ras 1 in 2 so de Jonge in sod. (2012) odkrili prvi efektorski protein z avirulentno funkcijo v *Verticillium* spp. Protein so poimenovali Ave1 (avirulanca na paradižnik z Ve1 receptorjem). Ve1 je receptor v paradižniku, ki ga kodira *Ve1* rezistenten (R) gen. Prepoznav glivnega efektorja z Ve1 receptorjem vodi v hipersenzitiven obrambni odgovor rastline in omejitve/uničenje patogena v rastlini. Sevi vrste *V. dahliae* se delijo na dve rasi. Ve1 receptor prepozna seve iz rase 1, medtem ko seve iz rase 2 ne. S komperativno genomiko so de Jonge in sod. (2012) ugotovili, da je gen *Ave1* prisoten v vseh sevih rase 1, ni ga pa v sevih rase 2. Interakcija Ave1 proteina z Ve1 receptorjem je bila eksperimentalno dokazana s prehodno koekspresijo Ve1 in Ave1 v tobaku. Efektor Ave1 je majhen natriuretični peptid (angl. plant natriuretic peptide; PNP), ki ima več sto homologov v različnih rastlinskih vrstah, toda le nakaj v drugih mikroorganizmih. Natriuretični peptidi v rastlinah predstavljajo mobilne signalne molekule, ki se izločajo v apoplast, posebno v pogojih biotičnega in abiotičnega stresa. Imajo pomembno vlogo pri uravnavanju vodnega potenciala in homeostaze mineralov. Na ta način lahko vplivajo na številne rastlinske fiziološke procese, vključno s fotosintezo (Gehring in Irvin, 2003; Ruzvidzo in sod., 2011). Ave1 je bil najverjetnejše pridobljen s horizontalnim prenosom genov iz genoma gostiteljske rastline in imitira neznano fiziološko funkcijo (de Jonge in sod., 2012). Da rastlinski Ve1 receptor prepozna Ave1 protein, zadostuje že 9 C-terminalnih aminokislinskih ostankov na Ave1 proteinu (Zhang, 2013). Ave1 predstavlja tudi PAMP molekulo, saj je aminokislinsko zaporedje dobro ohranjeno pri različnih glivnih patogenih (Thomma in sod., 2011). Poleg avirulentne funkcije je Ave1 udeležen tudi v patogenezi, saj mutant brez *Ave1* gena povzroča na paradižniku, ki ne vsebuje Ve1 receptorja, manj izrazite simptome obolenja v primerjavi z divjim tipom. Med okužbo je ekspresija *Ave1* gena *in planta* povečana. Ni znano, na kakšen način Ave1 efektor sodeluje pri vzpostavitvi virulence. Toda glede na visoko homologijo z rastlinskimi PNP molekulami predvidevajo, da Ave1 vpliva na nivo vode in homeostazo mineralov v rastlini (de Jonge in sod., 2012).

Ave1 je majhen, s cisteinom bogat (vsebuje štiri cisteinske ostanke) sekretorni protein brez značilnih proteinskih domen in z neznano funkcijo. Čeprav so Klosterman in sod. (2011) v genomu *V. dahliae* določili okoli 120 kandidatnih efektorskih genov na podlagi kriterija, da so efektorji sekretorni proteini, manjši od 400 aminokislin in z več kot štirimi cisteini, je

Ave1 zaenkrat edini majhen sekretorni protein, ki ima potrjeno efektorsko in avirulentno funkcijo, določen v *Verticillium* spp. Vezava Ave1 efektorja ne poteka samo na Ve1 receptor iz paradižnika, ampak so bili nedavno kot ujemajoči homologni Ve receptorji potrjeni še receptorji iz divjega tobaka (*Nicotiana glutinosa*), krompirja (*Solanum tuberosum*), divjega jajčevca (*Solanum torvum*) in hmelja (*Humulus lupulus*) (Song in sod., 2016). Ve je zaenkrat edini poznani lokus, ki v določenih rastlinskih vrstah zagotavlja odpornost na nekatere vrste iz *Verticillium* spp. (de Jonge in sod., 2012). Na drugi strani pa lahko tudi Ve1 receptor prepozna Ave1 homologe iz drugih glivnih patogenov (Klimes in sod., 2015). To so lastnosti Ave1 proteina, zaradi katerih se pojavlja dvom v uvrščanje Ave1 med rasno specifične efektorje in postavlja vprašanje v ustreznost in pravilnost koncepta cikcak modela (Fradin in sod., 2011; Thomma in sod., 2011).

Ohranjeni vzdrževalni geni se nahajajo na predelih genoma, ki se zelo redko in počasi spreminja. Efektorski geni pa se nahajajo na regijah, ki se hitro spreminja in so pogosto tudi linijsko specifične (angl. lineage specific, LS). To pomeni, da je lahko neka DNA regija v glivnem genomu ne samo vrstno specifična, ampak je celo specifična samo za določen sev in drugi sevi iste vrste te regije oz. posameznih genov na tej regiji ne vsebujejo. LS regije vsebujejo veliko transponzibilnih in drugih ponovljivih elementov, ki vodijo v hitrejše preurejanje DNA segmentov (de Jonge in sod., 2013; Raffaele in Kamoun, 2012; Seidl in Thomma, 2014). Glivni patogeni so razvili mnogo načinov, s katerimi poskrbjijo za preurejanje genoma, ko jih k temu silijo živiljenjske razmere. Primer je patogen na paradižniku *Fusarium oxysporum*, ki vsebuje poseben majhen kromosom, na katerem so za patogenost pomembni geni (Ma in sod., 2010). Posebnost tega kromosoma je, da lahko pride do horizontalnega prenosa kromosoma med sevi in na ta način se širijo geni za patogenost. V *Verticillium* spp. podoben kromosom ni bil odkrit (de Jonge in sod., 2013; Klosterman in sod., 2011). LS regije pomembno vplivajo na virulenco patogena, saj se na njih običajno nahajajo efektorski geni, za katere je bilo ugotovljeno, da so zelo visoko izraženi *in planta* in kodirajo proteine, ki patogenu omogočajo naselitev v gostiteljski rastlini.

Ave1 in LysM efektor (*VDAG_05180*) se oba nahajata na linijsko specifični regiji v genomu vrste *V. dahliae*, kjer je bilo določenih še nekaj drugih genskih modelov. Ker imata tako Ave1 kot tudi LysM efektor *VDAG_05180* pomembno vlogo v virulenci, so de Jonge in sod. (2013) predvidevali, da bodo imeli tudi drugi geni iz te regije podoben vpliv. Na podlagi visoke *in planta* ekspresije sta bila za funkcionalno analizo izbrana še dva gena, in sicer *XLOC_009059* in *XLOC_008951*, ki kodirata neznana sekrecijska proteine. Izkazalo se je, da sta oba gena vpletena v virulenco, saj sta imela mutanta z izbitima genoma zmanjšano virulenco na paradižniku.

2.8.6 Transkripcijski faktorji

Transkripcijski faktorji sodelujejo v glivni patogenezi na način, da nadzorujejo ekspresijo drugih genov, ki so virulentni dejavniki, npr. hidrolitičnih encimov za razgradnjo rastlinskega tkiva. Zato tanskripcijske faktorje uvrščamo med pomembne virulentne dejavnike (Cui in sod., 2015).

S patogenostjo povezani transkripcijski faktorji, ki so bili do sedaj odkriti, veliko doprinesajo k razumevanju molekularnega ozadja patogenosti *Verticillium* spp. Odkritje transkripcijskih faktorjev *Vta2*, *VdSNF1* in *Vlcpc1*, ki uravnava odzive na okolje, v katerem primanjkuje hranil, je pokazalo, da so signalne poti vpletene v regulacijo virulence (Klimes in sod., 2015).

Tudi transkripcijski faktorji, ki nadzorujejo gene za vegetativno rast glive, so sodeleženi v glivni virulenci. Primer takega gena je *Sge1* iz *V. dahliae*, ki je bil določen na osnovi homologije z znanimi regulatorji patogeneze. *Sge1* je bil najprej določen kot transkripcijski faktor v *Fusarium oxysporum* (Michielse in sod., 2009), kjer je lokaliziran v jedru ter udeležen v patogenost in uravnavanje *in planta* ekspresije drugih efektorjev. Santhanam in Thomma (2013) sta poročala, da je homolog v glivi *V. dahliae* (*VdSge1*) tesno povezan z glivno patogenostjo, stopnjo rasti in sporulacijo. Izbitje gena je povzročilo, da mutant ni bil več patogen za paradižnik, konidiacija je bila okrnjena in hife so slabše rasle, mutant ni mogel kolonizirati ksilema paradižnika, verjetno ravno zaradi obeh opisanih razlogov. Micelij mutanta je bil rjavoobarvan, medtem ko je divji tip bele barve – ta primer je dober pokazatelj vpletosti *VdSge1* transkripcijskega faktorja v patogenozo in tudi vegetativno rast ter konidiacijo. *VdSge1* nadzira izražanje vsaj osem drugih domnevnih efektorskih genov, od tega se v mutantu brez *VdSge1* gena šestim genom ekspresija zmanjša, dvema pa se ekspresija poveča. Ugotovljeno je tudi bilo, da efektor *Ave1* ni pod nadzorom *VdSge1* transkripcijskega faktorja (Santhanam in Thomma, 2013).

2.8.7 Geni, ki so udeleženi v virulenco preko prenosa signala

Proteini, kot so protein kinaza A, G protein, MAP kinaza, transmembranski mucini in adenilat ciklaza, sodelujejo v celični signalni transdukciji. Za te proteine je bilo ugotovljeno, da so udeleženi v virulenco različnih glivnih patogenov (*R. solani*, *B. cinerea*, *C. neoformans*, *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, *M. grisea*, *C. neoformans* in *G. zae*) (Tzima in sod., 2012). Ko patogene glive pridejo v gostitelja, morajo zaznati signale iz okolja in jih v ustrezni molekularni obliki prenesti do jedra, kjer se aktivirajo geni, ki so preko virulentnih dejavnikov udeleženi v virulenco. V večih primerih se je pokazalo, da je ravno ta prenos signala v različnih transduksijskih poteh ključen za pojav virulence, saj so imeli mutanti z izbitimi geni za proteine, ki so udeleženi v prenos signala, zmanjšano virulenco na gostiteljskih rastlinah.

Prilagoditev patogena na pomanjkanje hranil v okolju in druge okoljske strese regulirajo cAMP signalne poti, ki pa vplivajo tudi na razvoj, spolno razmnoževanje in virulenco (Kronstad in sod., 1998). V cAMP signalno pot je udeležen protein PKA (protein kinaza A). PKA je sestavljen iz dveh regulatornih podenot (R) in dveh katalitičnih enot (C), ki lahko fosforilirata tarčne proteine. Homologi gena *PKA* so bili že proučevani v glivah *Ustilago maydis* (Durrenberger in sod., 1998), *Magnaporthe grisea* (Mitchell in Dean, 1995) in *Colletotrichum trifolii* (Yang in Dickman, 1999). Ugotovljeno je bilo, da je gen udeležen v nadzor patogeneze in vegetativne rasti. Gen *VdPKAC1* iz *V. dahliae* kodira C podenoto PKA proteina in je udeležen v številnih procesih. Tzima in sod. (2010) so ugotovili, da imajo mutanti z izbitim *VdPKAC1* genom zmanjšano virulenco, konidiacijo in izločanje etilena. Etilen je osnovna molekula pri vzpostavitvi simptomov na gostitelju

pri mnogih vaskularnih patogenih. Toda tvorba mikrosklerocijev se je v mutantih povečala, konidiacija se je pa signifikantno zmanjšala. *VdPKAC1* gen verjetno vpliva na vegetativno rast in na stopnjo virulence preko fosforilacije ali defosforilacije genov, ki se nahajajo v cMAP signalni poti.

Številne raziskave funkcije G proteinov v glivah so potrdile njihovo udeleženost v rasti, sporulaciji, razmnoževanju in virulenci. G proteini so sestavljeni iz treh podenot (α , β in γ) in prenašajo signal čez membrano v notranjost celice. V glivah *M. oryzae*, *U. maydis* in *F. oxysporum* je bilo potrjeno, da so posamezne podenote G proteina ključne za pojav virulence. V glivah β podenoto G proteina kodira en sam gen. Tzima in sod. (2012) so vlogo β podenote G proteina testirali v *V. dahliae*. Ugotovili so, da je imel mutant močno znižano virulenco na paradižniku in jajčevcu, povečano tvorbo mikrosklerocijev in tudi povečano konidiacijo, toda zmanjšano izločanje etilena. Pojavila se je tudi spremenjena vegetativna rast (na gojišču ni rasel v radialni, ampak v longitudinalni smeri). Do zmanjšanja virulence je verjetno prišlo zaradi tega, ker mutant ni mogel prevesti okoljsko pomembnih signalov v ustrezен odgovor, da bi lahko vzpostavil obširnejšo kolonizacijo. Ker je bila v mutantu prekinjena signalna pot, je mogoče, da mutant ni mogel izločati CWDE encimov, fitotoskinov in drugih pomembnih virulentnih dejavnikov, kot je bilo prikazano v drugih študijah, kjer so proučevali odzive z G proteini sproženih signalnih poti v patogenih (Tzima in sod., 2012). V mutanta za gen *VGB* so vstavili gen *VdPKAC1*, ki kodira katalitično podenoto v cAMP signalno pot udeleženega proteina PKA (*VdPKAC1*), za katerega so Tzima in sod. (2010) ugotovil, da imajo mutanti z izbitim *VdPKAC1* genom zmanjšano virulenco, konidiacijo in izločanje etilena, a povečano tvorbo mikrosklerocijev. Rezultat te komplementacije je bil, da je bil komplement po rasti in konidiaciji podoben divjemu tipu, toda ni mogel tvoriti mikrosklerocijev, izločal je velike količine etilena, stopnja virulence pa je bila, glede na simptome na okuženih rastlinah, med mutantom brez *VGB* gena ter divjim tipom. Rezultati raziskave so razkrili, da sta signalni poti genov *VGB* in *VdPKAC1*, ki regulirata virulenco, produkcijo hormonov in razvoj glive, povezani (Tzima in sod., 2012).

Mitogen-aktivacijske protein kinaze (MAPK) so ohranjeni virulentni dejavniki, saj so aminokislinska zaporedja MAP kinaz visoko ohranjena med glivni vrstami. Signalne poti, v katerih sodelujejo MAP kinaze, pa so udeležene v nadzor pomembnih celičnih procesov, kot je razvoj organizma in odgovori na vplive iz okolja. Funkcije MAP kinaz v glivah so tudi povezane s patogenezo, npr. ortolog MAP kinaze *PMK1* v *M. grisea* je odgovoren za tvorbo apresorijev in invazivno rast v gostiteljski rastlini (Xu in Hamer, 1996). Ortolog *MPS1* je nujno potreben za vdor glive v rastlino ter za konidiacijo (Xu in sod., 1998). Rauyaree in sod. (2005) so proučevali vlogo ortologa *VMK1* pri virulenci *V. dahliae* seva VdLs.17 iz solate in seva Dvd-T5 iz paradižnika. Ugotovili so, da je *VMK1* vpletén v tvorbo mikrosklerocijev, saj mutanti z izbitim genom proizvajajo signifikantno manj mikrosklerocijev in tudi konidijev kot divji tip. Na gojišču sta mutanta izkazovala slabšo rast. Za test patogenosti mutantov so uporabili 12 različnih rastlinskih vrst. Izkazalo se je, da sta mutanta na vsakem gostitelju povzročala milejše simptome v primerjavi z divjim tipom. Dejstvo, da sta imela mutanta za isti ortolog *VMK1* iz dveh različnih sevov (iz seva VdLs.17 in seva Dvd-T5) signifikantno znižano virulenco, kaže na to, da ima *VMK1* gen ohranjenou vlogo v virulenci, saj je imela mutacija enak učinek pri dveh različnih izolatih, ki izvirata iz različnega gostitelja. Ker se je virulanca posameznega mutanta zmanjšala na

vseh 12 različnih gostiteljih, to kaže na evolucijsko ohranjeni vlogi VMK1 MAP kinaze v patogenosti *V. dahliae*.

V patogenih glivah je MAPK signalna pot visoko ohranjen način signalizacije, ki uravnava patogenost vrst (Xu, 2000). *Msb* je gen za glikoziliran transmembranski mucin, ki je visoko ohranjen v MAPK signalni poti in prenaša signal na MAP kinaze. Študije mutantov z izbitim *Msb* genom v glivnih vrstah *U. maydis*, *M. oryzae* in *F. oxysporum* so pokazale, da je gen udeležen v prenosu signala in nujno potreben za vzpostavitev virulence na gostiteljskih rastlinah. Tian in sod. (2014) so na podlagi homologije z genom *Msb2* iz *F. oxysporum* določili *VdMsb* gen iz seva Vd8 iz *V. dahliae*, ki okužuje bombaževec in naredili funkcionalno analizo. Izbitje gena je imelo vpliv že na morfologijo, saj mutant ni tvoril mikrosklerocijev, prav tako pa je bila radialna rast kolonije mutantna manjša v primerjavi z divjim tipom. Prav tako je mutant tvoril signifikantno manj konidijev v primerjavi z divjim tipom. Simptomi okužbe mutantna na repnjakovcu in bombaževcu so bili statistično značilno manjši v primerjavi z divjim tipom. Test okuževanja je potrdil, da je *VdMsb* ključen za vzpostavitev virulence v sevu Vd8 iz bombaževca. Na prerezu okuženih korenin bombaževca tri dni po okuževanju se je videlo, da mutant ni povzročal rjavega obarvanja prevodnega tkiva, kot se je zgodilo v primeru divjega tipa. To pomeni, da je *VdMsb* potreben za invazivno rast glive v vaskularnem sistemu. *VdMsb* je pomemben tudi za pritrjevanje konidijev in hif na površino korenin gostiteljske rastline. Pri pregledu korenin okuženega repnjakovca 36 ur po okužbi z elektronskim mikroskopom se je videlo, da je bila pri mutantu kolonizacija površine korenin veliko manjša kot pri divjem tipu. Očitno je *VdMsb* potreben tudi za fizični stik med glivo in koreninami gostitelja. Skupni rezultati kažejo, da je v sevu Vd8 *V. dahliae* gen *VdMsb* udeležen v procesu vdiranja in kolonizacije gostiteljske rastline. To pa so ključni koraki, ki vodijo do vzpostavitve okužbe.

Preglednica 1: Virulentni dejavniki v glivah iz rodu *Verticillium*.
 Table 1: Virulence factors of *Verticillium* spp.

Gen	Opis	Vrsta/sev	Funkcija	Vir
Geni, ki so povezani z vstopom patogena v rastlino in s prilagoditvijo na okolje				
<i>Vta2</i>	transkripcijski aktivator	<i>V. longisporum</i> /V143 <i>V. dahliae</i> /VdJR2 <i>V. albo-atrum</i> /Va4	nadzor izražanja virulentnih genov	Tran in sod., 2014
<i>VdSNF1</i>	protein, ki je del kinaznega kompleksa	<i>V. dahliae</i> /70wt-r1	uravnava izražanje CWDE encimov	Tzima in sod., 2011
<i>VdSSP1</i>	sekrecijski protein	<i>V. dahliae</i> /VDG1	predviden metabolizem ogljikovih hidratov	Liu in sod., 2013
<i>VdEG-1</i>	endoglukanaza	<i>V. dahliae</i> /VdLs.17	metabolizmom ogljikovih hidratov	Maruthachalam in sod., 2011
pektinaza	pektinolitični encim	<i>V. albo-atrum</i>	napad rastlinske celične stene	Durrands in Cooper, 1988a; 1988b
<i>VDAG_1009.1</i>	HMG-CoA sintaza	<i>V. dahliae</i> /VdLs.17	neznana	Maruthachalam in sod., 2011
<i>Vlar02</i>	korizmat sintaza	<i>V. longisporum</i> /V143	sinteza aromatskih aminokislín	Singh in sod., 2010
<i>VICPC1</i>	transkripcijski regulator	<i>V. longisporum</i> /V143 <i>V. dahliae</i> /JR2	nadzor izražanja genov za sintezo aminokislín	Timpner in sod., 2013
<i>VDH1</i>	hidrofobin iz razreda II	<i>V. dahliae</i> /Vd-T5	neznana, mogoče Avr protein	Klimes in Dobinson, 2006
<i>VdGRPI</i>	z glutamatom bogat protein	<i>V. dahliae</i> /V529	indukcija tvorbe mikrosklerocijev	Gao in sod., 2010
<i>VDAG_02071</i>	encim glukoziltransferaza	<i>V. dahliae</i> /VdLs.17	prilagoditev na osmotski stres	Klosterman in sod., 2011
<i>Cerevisin</i>	serinska proteinaza B	<i>V. dahliae</i> / Vd991	razgradnja proteinov za zagotavljanje hrani; nadzor izražanja CWDE encimov	He in sod., 2015
Geni, ki so pomembni za obrambo patogena pred prvim nivojem rastlinske obrambe				
<i>VlcpeA</i>	encim katalaza-peroksidaza	<i>V. longisporum</i> /V143	obramba patogena pred H_2O_2	Singh in sod., 2012
<i>VdThi4</i>	encim za biosintezo tiamina	<i>V. dahliae</i> /JR2	obramba patogena pred ROS	Hoppenau in sod., 2014
<i>VdQase</i>	encim kvercetinaza	<i>V. dahliae</i> /Vd9, Vd21	razgradnja rutina	el Hadrami in sod., 2015
<i>VdMFS</i>	gen iz MFS skupine prenašalcev	<i>V. dahliae</i> /VdLs.17	fungicidna rezistenca	Maruthachalam in sod., 2011
<i>VnaPRXI.1277</i>	encim lignin-peroksidaza	<i>V. nonalfafae</i> /T2	razgranja lignina, obramba pred ROS	Flajsman in sod., 2016
Geni, ki so pomembni za preprečevanje rastlinske signalizacije				
<i>VdIsc1</i>	encim izokorizmataza	<i>V. dahliae</i> /V991	inhibicija sinteze salicilne kisline	Liu in sod., 2014

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1:

Gen	Opis	Vrsta/sev	Funkcija	Vir
Efektorski geni				
<i>NLP1</i>	necrosis- and ethylene-inducing-like protein	<i>V. dahliae</i> /V592	citotoksičnost za rastlinske celice	Zhou in sod., 2012
<i>NLP2</i>	necrosis- and ethylene-inducing-like protein	<i>V. dahliae</i> /V592	citotoksičnost za rastlinske celice	Zhou in sod., 2012
<i>NLP1</i>	necrosis- and ethylene-inducing-like protein	<i>V. dahliae</i> /JR2	citotoksičnost za rastlinske celice	Santhanam in sod., 2013
<i>NLP2</i>	necrosis- and ethylene-inducing-like protein	<i>V. dahliae</i> /JR2	citotoksičnost za rastlinske celice	Santhanam in sod., 2013
<i>LysM</i>	proteini z lizinskim motivom	<i>V. dahliae</i> /VdLs.17	obramba pred hitinazami gostitelja, vezava prostega hitina	de Jonge in sod., 2013
<i>Ave1</i>	efektorski protein	<i>V. dahliae</i> /JR2	avirulenza, okrepitev virulence	de Jonge in sod., 2012
<i>VnaSSP4.2</i>	domevni efektorski protein	<i>V. nonalfafae</i> /T2	neznana	Flajsman in sod., 2016
<i>XLOC_009059</i>	neznan sekrecijski protein	<i>V. dahliae</i> /JR2	neznana	de Jonge in sod., 2013
<i>XLOC_008951</i>	neznan sekrecijski protein	<i>V. dahliae</i> /JR2	neznana	de Jonge in sod., 2013
Transkripcijski faktorji				
<i>VdSge1</i>	transkripcijski faktor	<i>V. dahliae</i> /VdLs.17	nadzor ekspresije vsaj osmih drugih genov	Santhanam in Thomma, 2013
<i>Vta2*</i>				
<i>VdSNF1*</i>				
<i>VICPC1*</i>				
Geni, ki so udeleženi v virulenco preko prenosa signala				
<i>VdPKAC1</i>	v cAMP signalno pot udeležen protein kinaza A	<i>V. dahliae</i> /70wt-r1	fosforilacija in de-fosforilacija genov, ki se nahajajo v cMAP signalni poti	Tzima in sod., 2010
<i>VGB</i>	β podenota G proteina	<i>V. dahliae</i> /70wt-r1	prenos signala čez membrano v notranjost celice	Tzima in sod., 2010
<i>VdMsb</i>	transmembranski mucin	<i>V. dahliae</i> /Vd8	prenos signala na MAP kinazo	Tian in sod., 2014
<i>VMK1</i>	ortolog MAP kinaze	<i>V. dahliae</i> /VdLs.17	nadzor pomembnih celičnih procesov	Rauyaree in sod., 2005

*opisano v odseku »Geni in encimi, ki so povezani z vstopom patogena v rastlino in prilagoditvijo na okolje«.

2.9 METODE GENSKE TRANSFORMACIJE GLIV

Genska transformacija je proces, kjer se v genetski material posamezne celice vgradi organizmu nelastno (eksogeno) DNA zaporedje, zaradi česar se genom celice spremeni (Michielse in Hooykaas, 2005). Leta 1973 je bila izvedena prva transformacija glivne vrste, in sicer sta Mishra in Tatum (1973) z mutagenezo pridobila sev glive *Neurospora crassa*, ki brez dodatka inozitola ni mogel rasti na trdem gojišču. Nato je bila v ta sev vnešena celokupno DNA divjega tipa, kar je povrnilo osnovni fenotip. Naslednja glivna vrsta uporabljena v genski transformaciji je bila kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* leta 1978. Za uspešno transformacijo je bila potrebna encimska odstranitev celične stene, v protoplaste so transformirali plazmid iz *E. coli* z avksotrofnimi geni, ki so omogočali selekcijo. Leta 1981 je prvič uspela transformacija intaktnih celic *S. cerevisiae*. V 80. letih 20. stoletja se je nadaljevala transformacija nitastih gliv. Trenutno je mogoče transformirati vrste iz skupin prostotrosnic, zaprtotrosnic in zigomicet (Rivera in sod., 2014).

Z gensko transformacijo dosežemo spremembe v glivnem genomu. Vgradnja eksogene DNA v genom se lahko zgodi na naključnih delih genoma, lahko pa poteka tarčno s procesom homologne rekombinacije (metode za doseganje teh ciljev bodo opisane v naslednjem poglavju). Transformacija gliv se uporablja za namene proučevanja njihovih lastnosti, kot so fiziologija rasti, molekularni mehanizmi različnih bioloških procesov in določevanje funkcije posameznih genov. Vzpostavitev transformacije glivne vrste omogoča različne eksperimente z glivnim genomom. Trenutno se veliko raziskav filamentoznih gliv osredotoča na določanje molekularnih mehanizmov patogenosti. Vsaka manipulacija glivnega genoma pa se začne z gensko transformacijo (Jiang in sod., 2013).

Za gensko transformacijo gliv se uporablajo različne metode. Delimo jih na fizikalne in biološke. Fizikalne metode (elektroporacija, biolistika, stresanje s steklenimi kroglicami, vakumska infiltracija, transformacija z laserjem, transformacija ob prisotnosti litijevega acetata) temeljijo na uporabi fizikalne sile, ki omogoča vnos eksogene DNA v gostiteljsko celico. Biološke metode pa temeljivo na uporabi protoplastov kot začetnega glivnega materiala, ki jih pridobimo z uporabo različnih encimov za razgradnjo celične stene, ter na uporabi bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Metode genske transformacije gliv z opisi postopkov ter prednosti in slabosti njihove uporabe so predstavljene v preglednici 2.

Preglednica 2: Metode genske transformacije filamentoznih gliv (Rivera in sod., 2014; Gómez-Lim in sod., 2015; Jiang in sod., 2013; Ruiz-Diez, 2002; Jackson, 1995).

Table 2: Methods for genetic transformation of filamentous fungi (Rivera et al., 2014; Gómez-Lim et al., 2015; Jiang et al., 2013; Ruiz-Diez, 2002; Jackson, 1995).

Metoda	Opis metode	Prednosti	Slabosti
Fizikalne metode			
Elektroporacija	električni sunki (0,5 – 2 V) povzročijo kratkotrajno povečano prepustnost celične membrane, kar omogoča prehod makromolekulam v cel. gostitelja	metoda je enostavna, hitra in relativno učinkovita ter uporabna za vse glivne vrste	težavna regeneracija celic po transformaciji, visoka toksičnost za celice (preživi samo 50 % celic), nizka učinkovitost

Se nadaljuje

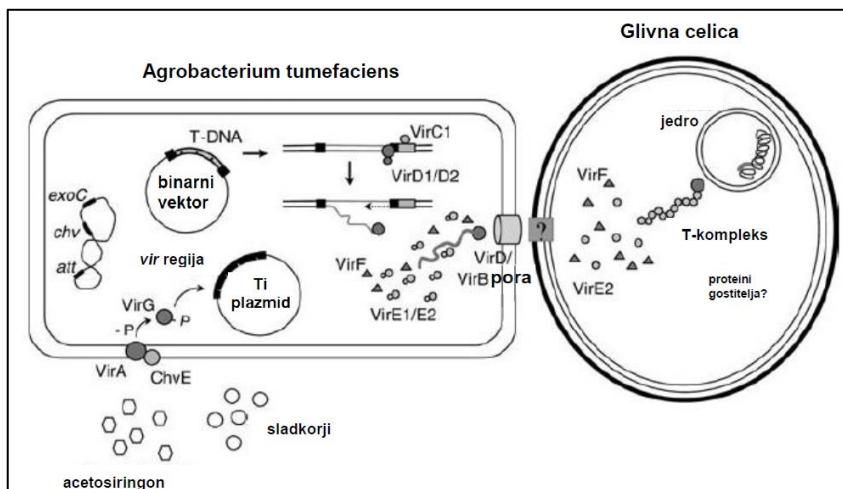
Nadaljevanje preglednice 2:

Metoda	Opis metode	Prednosti	Slabosti
Fizikalne metode			
Biolistika	uporaba gen. pištole za apliciranje zelo majhnih kovinskih delcev (zlato, volfram, platina), prekritih z eksogeno DNA	ni potrebno predhodno encimsko razgraditi celičnih sten glivnega materiala, enostavna regeneracija transformantov	v genom gostitelja se lahko vgradi več kopij DNA inserta, nizka učinkovitost, poškodbe na DNA insertu
Stresanje s steklenimi kroglicami	začetni material so glivne spore, ki se jih zmeša s steklenimi kroglicami (premer 0,45 – 0,52 mm) in plazmidno DNA, nato se jih izpostavi intenzivnemu mešanju	enostaven in poceni postopek, uporabno za glive z debelo celično steno	med procesom mešanja se DNA močno poškoduje, viabilnost celic se zmanjša, nizka stopnja učinkovitosti
Vakuumska infiltracija	vakuum ustvari negativni tlak, ki omogoča vstop bakterij (npr. <i>Agrobacterium</i>) v glivno tkivo, sledi prenos DNA iz bakterije v glivno celico	enostavna za uporabo, srednje učinkovita, uporabna pri vrstah, ki imajo nizko stopnjo sporulacije ali pa sporulacija ni poznana	vse vrste gliv niso dozvetne za bakterijsko transformacijo, lahko pride do neželenih posledic zaradi uporabe bakterij
Transformacija z laserjem (shock-wave-mediated transformation)	z laserskim valovanjem se povzroči prehodno permeabilnost celične membrane, ki lahko absorbira DNA iz okolja	metoda je visoko učinkovita in enostavna, za transformacijo se lahko uporabijo spore ali micelij, visoka učinkovitost	draga aparatura za vzbujanje laserskih valov, potrebne so izkušnje iz laserske fizike
Transformacija ob prisotnosti litijevega acetata	kalečim sporam se v prisotnosti 0,1 mol/l litijevega acetata doda DNA, ki jo želimo transformirati	metoda je enostavna, hitra, ni potrebno pridobiti protoplastov	podrobni mehanizem prehoda DNA v gostiteljske spore ni poznani, malo število vrst dozvetnih za to metodo
Mikroinjiciranje	s stekleno mikropipeto se na mikroskopskem nivoju vstavi DNA konstrukt v tarčno tkivo	neposredna in natančna dostava DNA vektorja v tarčno tkivo	zahteven in časovno potraten postopek, visoka cena, nizka uspešnost vnosa
Biološke metode			
Transformacija ob prisotnosti CaCl_2 /polietilen glikola (PEG)	suspenciji protoplastov in DNA se doda PEG v visoki koncentraciji ter Ca^{++} ione (v obliki CaCl_2)	metoda deluje na različnih glivnih vrstah, enostavnost izvedbe, visoka učinkovitost postopka	težavno pridobivanje viabilnih protoplastov, težavna regeneracija protoplastov po transformaciji
Fuzija protoplastov in liposomov	liposomi so vektorji za prenos eksogene DNA, zgrajeni so iz dvojne plasti lipidov, ki se zlige s celično membrano in na ta način liposomi sprostijo DNA v celico	metoda je enostavna za uporabo, visoka učinkovitost postoka	težave s protoplasti, neobstojnost liposomalnih veziklov
ATMT (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation)	bakterija <i>A. tumefaciens</i> prenese del svoje DNA v gostiteljsko celico, kjer se vgradi v genom gostitelja	visoka učinkovitost transformacije, široka izbira glivnih tkiv, nizko število kopij transformacijskega vključka	vsi sevi <i>Agrobacterium</i> ne morejo okuževati vseh vrst gliv, potrebna optimizacija protokolov za posamezno glivno vrsto

2.9.1 Metoda ATMT (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) za transformacijo gliv

Bakterija *A. tumefaciens* je talna, po Gramu negativna fitopatogena bakterija, ki v naravi okužuje rastline. Na mestu okužbe izzove nastanek tumorju podobne rakaste tvorbe. *A. tumefaciens* prenese 10 do 30 kbp velik del svoje DNA, imenovan T-DNA (transferred DNA) iz 200 kbp velikega Ti (angl. tumor inducing) plazmida v gostiteljsko celico. Na T-DNA regiji se nahajajo geni, ki kodirajo encime za nadzor rasti rastlinskih celic. To so *onc* geni (kodirajo encime za sintezo rastlinskih hormonov avksinov in citokininov, ki povečujejo intenzivnosti celičnih delitev in nekontrolirane rasti poškodovanega in okuženega rastlinskega tkiva) in geni za sintezo opinov (derivatov aminokislin in sladkorja, ki jih bakterija uporablja kot vir dušika, ogljika in energije). Na Ti plazmidu, toda zunaj regije T-DNA, se nahajajo še geni za virulenco (*vir* geni - so udeleženi v sestavljanje, prenos in vgradnjo T-DNA v genom gostitelja) (Tzfira in Citovsky, 2006). Po vgradnji T-DNA v gostiteljski genom se ti geni izrazijo in posledica je nekontrolirana rast rastlinskih celic. Prenos in vključitev T-DNA v gostiteljsko celico uravnava *vir* geni, ki se nahajajo na *vir* regiji na Ti-plazmidu ter virulentni geni na bakterijskem kromosomu (*chv* geni). Okoli 35 različnih *vir* genov je organiziranih v 7 operonov – *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* in *virG*. Pri prenosu in vključitvi T-DNA v genom gostiteljske celice imajo pomembno vlogo mehanizmi iz gostitelja, kot so prenos DNA in proteinov, DNA popravljalni mehanizmi in tarčna proteoliza, ki jih bakterija izrablja za uspešno vgraditev T-DNA v genom gostitelja (slika 4) (Hellens, 2000). T-DNA regijo na Ti plazmidu na vsaki strani obdajata 24 bp dolgi mejni zaporedji, ki predstavlja cis-regulatorni element za mehanizem prenosa v rastlinsko celico in samo ti dve zaporedji sta pomembni za prenos DNA iz enega organizma v drugega. DNA regijo med mejnima zaporedjem lahko nadomestimo s katerim koli drugim nukleotidnim zaporedjem. To izkoriščamo pri načrtti transformacije rastlin in gliv, in sicer je v uporabi t.i. binarni sistem, kjer se T-DNA in regija z *vir* geni nahajata na dveh ločenih plazmidih, kar omogoča genetsko manipulacijo in spremenjanje plazmida s T-DNA regijo (Michielse in sod., 2005).

Prvič je bila metoda ATMT za transformacijo glivne vrste uporabljena leta 1995, ko so Bundock in sod. uporabili ATMT za tarčno izbijanje genov *TRP1* in *SKP1* iz genoma *Saccharomyces cerevisiae* (Bundock in sod., 1995). De Groot in sod. so leta 1998 z ATMT transformirali prvo vrsto iz skupine filamentoznih gliv, in sicer zaprtotrošnico *Aspergillus awamori* (de Groot in sod., 1998). ATMT metodo je mogoče uporabiti za transformacijo gliv iz skupin zaprtotrošnic, prostotrošnic, zigomicet in oomicet (Michielse in Hooykaas, 2005). ATMT se uspešno uporablja tudi za transformacijo gliv iz rodu *Verticillium*. Prva ATMT transformacija je bila izvedena z vrsto *V. dahliae*, in sicer leta 2004 (Dobinson in sod., 2004), leta 2007 je sledila transformacija vrste *V. longisporum* (Eynck in sod., 2007) in leta 2009 še vrste *V. albo-atrum sensu lato* (Knight in sod., 2009). ATMT metoda velja za učinkovito eksperimentalno orodje reverzne genetike na področju raziskav funkcijsko genomike nitastih gliv, saj se metoda uporablja za doseganje ciljev, kot so naključna vgradnja eksogenih genov (npr. reporterski geni), tarčno prekinjanje, izbijanje in prekomerno izražanje genov ter komplementacija izbitih genov. Do leta 2011 je bilo poznanih več kot 180 binarnih vektorjev, konstruiranih za namene transformacije z *A. tumefaciens* (Frandsen, 2011).



Slika 4: Mehanizem prenosa T-DNA iz *A. tumefaciens* v glivno celico: Fenolne komponente (acetosirington) inducirajo *vir* gene. Protein ChvE iz bakterijskega kromosoma reagira z VirA, ki se avtofosforilira, nato pa prenese fosforilno skupino na VirG in ga aktivira. VirG je transkripcijski faktor za preostale *vir* gene na virulentni regiji. Vezava proteina VirC1 je signal za prepisovanje T-DNA v enojno T-DNA verigo, ki je mobilna kopija plazmidne T-DNA. Kompleks VirD1/D2 sproži prepisovanje s tem, da razpre DNA verigo Ti plazmida na mestu robnih sekvenč. VirD2, ki vsebuje na C-terminalnem delu lokalizacijsko domeno za jedro gostiteljske celice, ostane vezan na enoverižni T-DNA, kar imenujemo T-kompleks. T-kompleks se preko pore in bakterijskega T-pilusa, ki ga tvorijo VirB proteini, prenese v glivno celico. VirE2 in VirF proteini obdajo T-kompleks in ga ščitijo pred nukleazami pri prehodu skozi citoplazmo, hkrati pa mu zagotavljajo pravilno (nezvito) obliko. Zaradi lokalizacijske domene za jedro gostiteljske celice na C-terminalnem delu VirD2 proteina sčasoma T-kompleks preide v jedro, kjer se T-DNA molekula z uporabo mehanizmov gostitelja stabilno vgradi v genom (Michielse in sod., 2005).

Figure 4: Mechanism of T-DNA transfer from *A. tumefaciens* into the fungal cell: phenolic compounds such as acetosyringone are used to induce the *vir* genes. The chromosomally encoded protein, ChvE, interacts with the VirA protein, which responds by autophosphorylation. Phosphorylated VirA transfers its phosphoryl group to VirG, which is a transcriptional activator for other *vir* genes located in the virulence region. Binding of VirC1 is the signal of generation of a single-stranded DNA copy of the T-DNA. VirD1/D2 complex starts DNA synthesis at border repeats by opening a double helix of Ti plasmid. VirD2, which contains the nuclear localization signal in the C-terminal half of the protein stays covalently attached to the T-strand. This T-complex is transferred to the fungal cell through a transport pore and a structure on the surface called the T-pilus, which are made by VirB proteins. VirE2 and VirF proteins coat the T-complex in the host to protect it against nucleases and to keep the T-strand in an unfolded state. VirD2 protein directs T-complex to the nucleus where the T-DNA stably integrates into the genome (Michielse et al., 2005).

2.10 METODE MUTACIJSKE ANALIZE GLIV

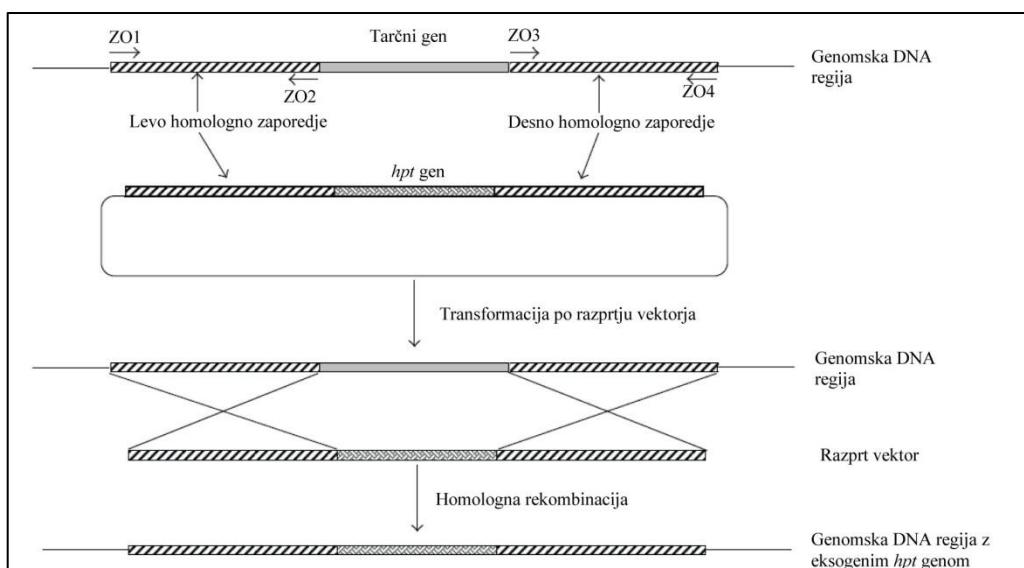
Metode druge in tretje generacije določanja nukleotidih zaporedij so omogočile masovno sekvenciranje glivnih genomov. Z uporabo bioinformacijskih orodij lahko predvidimo funkcije hipotetičnih in tudi poznanih genov. Transkripcijski profil je dodatna informacija za napoved ali izboljšanje predikcije genskih modelov (Cairns in sod., 2016). Korak, ki sledi *in silico* analizi genomskega podatkov, je običajno eksperimentalna funkcionalna analiza, kjer se uporablja različne laboratorijske metode. V okviru funkcionalne genomike se uporablja pristop reverzne genetike, kjer poskušamo z manipulacijo genov patogenega organizma vplivati na njegov fenotip in tako preučiti vlogo gena v patogenosti. Za dosego tega cilja se uporabljajo različne metode mutacijske analize, kot so tarčna prekinitev in izbijanje genov, utišanje ali povečana ekspresija genov in naključna insercijska

mutageneza (Bhadauria in sod., 2009; Kück in Hoff, 2010; Jiang in sod., 2013; Cairns in sod., 2016). Vsem metodam je skupno to, da želimo z njimi proučiti vlogo posameznega gena v nekem procesu. V primeru fitopatogenih gliv z metodami mutacijske analize največkrat ugotavljamo udeleženost kandidatnih virulentnih genov v patogenost in/ali virulenci.

2.10.1 Tarčna modifikacija genov

2.10.1.1 Homologna rekombinacija

Ključen proces pri tarčni modifikaciji genov je homologna rekombinacija (angl. homologous recombination; HR) (slika 5). Homologna rekombinacija je proces, ki se v naravi v diploidih ali večploidih zgodi med sestrskima kromatidama, kjer se nahajata enaka genska lokusa. V kvasovkah, kot sta *Saccharomyces cerevisiae* in *Candida albicans*, je homologna rekombinacija glavni mehanizem popravljanja prelomov DNA, zato je tudi pojav zelo pogost. V filamentoznih glivah pa je pojav homologne rekombinacije zelo redek, frekvenca je samo do 5 odstotkov, kar otežuje tarčno mutacijsko analizo glivnih genomov (Weld in sod., 2006). Pristop tarčne mutacije genov je bil prvič uporabljen na kvasovki *S. cerevisiae* (Scherer in Davis, 1979).



Slika 5: Prikaz homologne rekombinacije. 5' in 3' obdajajoči regiji (levo in desno homologno zaporedje) tarčnega gena sta s PCR metodo pomnoženi iz genomske DNA in vstavljeni v vektor (plazmid), ki vsebuje gen za odpornost na antibiotik higromicin B (gen *hpt*). V procesu transformacije se vektor prenese v jedro glivne celice. Vektor mora biti razprt oz. linealiziran, da lahko pride do prepoznavne homolognih zaporedij in izmenjave tarčnega gena s *hpt* genom. Po izmenjavi se tarčni gen ne nahaja več v genomu (Bhadauria in sod., 2009).

Figure 5: Schematic presentation of a gene replacement strategy. The 5' and 3' flanking regions of the target gene are PCR amplified from genomic DNA of the wild-type strain and ligated into the vector containing the hygromycin phosphotransferase (*hpt*) gene. The vector is transferred to the nucleus of the fungal cell through genetic transformation. Homologous recombination between linearized vector and genomic DNA replaces the gene of interest with the *hpt* gene (Bhadauria et al., 2009).

Eno izmed najbolj uporabnih orodij za določanje funkcije gena v fitopatogenih organizmih je analiza fenotipa mutantov, v katerih je bil proučevan lokus spremenjen s tarčno modifikacijo nekega gena. Poznamo tri nivoje tarčne modifikacije: če se heterologna DNA vgradi na neko mesto znotraj gena, gre za prekinitve gena (angl. knock-in); če pride do izmenjave med heterolognim DNA zaporedjem in tarčnim genom, govorimo o izbijanju gena (angl. knock-out) (Timberlake in Marshall, 1989); če pa se pred endogeni gen organizma vstavi specifičen konstitutivni ali inducibilni promotor, govorimo o nadzoru/spremembi genske ekspresije (Frandsen, 2011).

Prednost metod tarčnega vgrajevanja eksogene DNA v glivni genom je predvsem v tem, da mutacije niso naključne, saj se cilja specifično regijo v genomu glive in je v primeru spremenjenega fenotipa mutantna znano, katera kodogena regija na genomu je bila spremenjena in je odgovorna za pojav drugačnega fenotipa. Glavna težava tarčnih mutacij, ki temeljijo na procesu HR, je predvsem slaba učinkovitost zaradi nizke pojavnosti homologne rekombinacije v filamentoznih glivah. Vendar pa obstaja način, kako je mogoče povečati frekvenco homologne rekombinacije v glivah. Homologno in nehomologno združevanja prelomov DNA (angl. nonhomologous end joining; NHEJ) sta popravljalna mehanizma dvojno vijačnih prelomov DNA molekule v vseh ekvariontskih organizmih, ki sta ključnega pomena za ohranjanje integritete genoma. Delujeta neodvisno, a vseeno tekmujeta pri opravljanju iste funkcije (van Dyck in sod., 1999). NHEJ mehanizem združevanja prelomov DNA je pod nadzorom multiproteinskega kompleksa, ki je sestavljen iz od DNA odvisne protein kinaze, DNA ligaze IV, eksonukleaze in proteinskega Ku70/Ku80 heterodimera, ki se veže na DNA zaporedje in usmerja protein kinazo na mesto preloma (Ninomiya in sod., 2004). V filamentozni glivi *Neurospora crassa* je mutacija v genih *ku70* in *ku80*, ki sta ključna gena v procesu popravljalnega mehanizma nehomolognega združevanja prelomov DNA, vodila v povečano stopnjo homologne rekombinacije (Ninomiya in sod., 2004). Bistveno povečana homologna rekombinacija na račun izbitja omenjenih genov se je zgodila tudi v vrstah *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. sojae* in *A. oryzae* (Jinag in sod., 2013). Uspešnost homologne rekombinacije je mogoče povečati tudi z vključitvijo daljših homolognih zaporedij v transformacijski vektor, ki obdajata selekcijski marker (Bhaduria in sod., 2009).

2.10.1.2 Metode kloniranja vektorjev za tarčno modifikacijo genov

Vektorji za tarčno modifikacijo genoma v procesu homologne rekombinacije so običajno sestavljeni iz selekcijskega markerja (npr. gen *hpt* za odpornost na antibiotik higromicin B), ki ga obdajata zaporedji, ki sta homologni tarčni regiji v glivnem genomu. Ko pride vektor v glivno jedro in v stik z glivno DNA, se homologni zaporedji prepoznata in pride do prekrižanja. V glivno virulenco je lahko udeleženih več genov, ki delujejo sinergistično, zato lahko funkcionalna analiza zajema več genov naenkrat. Težava pri izbijanju več genov v enem organizmu predstavlja predvsem omejeno število selekcijskih markerjev. Zato je bilo razvitih več ciljno specifičnih rekombinantnih sistemov za patogene glive, ki omogočajo uporabo samo enega selekcijskega markerja pri izbijanju več genov iz istega organizma. V teh pristopih se selekcijski marker izreže iz v genom vgrajene transformacijske kasete z encimoma tirozin rekombinazo (Cre in FLP) ali serin rekombinazo (β -rec), ki delujeta na selekcijski gen obdajajoči regiji (Cairns in sod., 2016). V *Ustilago maydis* je z opisano

metodo uspelo izbiti različne kombinacije efektorskih genov, v katerih je bilo tudi 11 različnih genov naenkrat. Markerski gen za odpornost na antibiotik higromicin B sta obdajali dve specifični FLP zaporedji, kamor se je vezal encim flipaza in izrezal markerski gen iz kasete. Izbitje različnih kombinacij efektorskih genov je vedno imelo negativen vpliv na virulenco patogena pri okuževanju koruze (Khrunyk in sod., 2010).

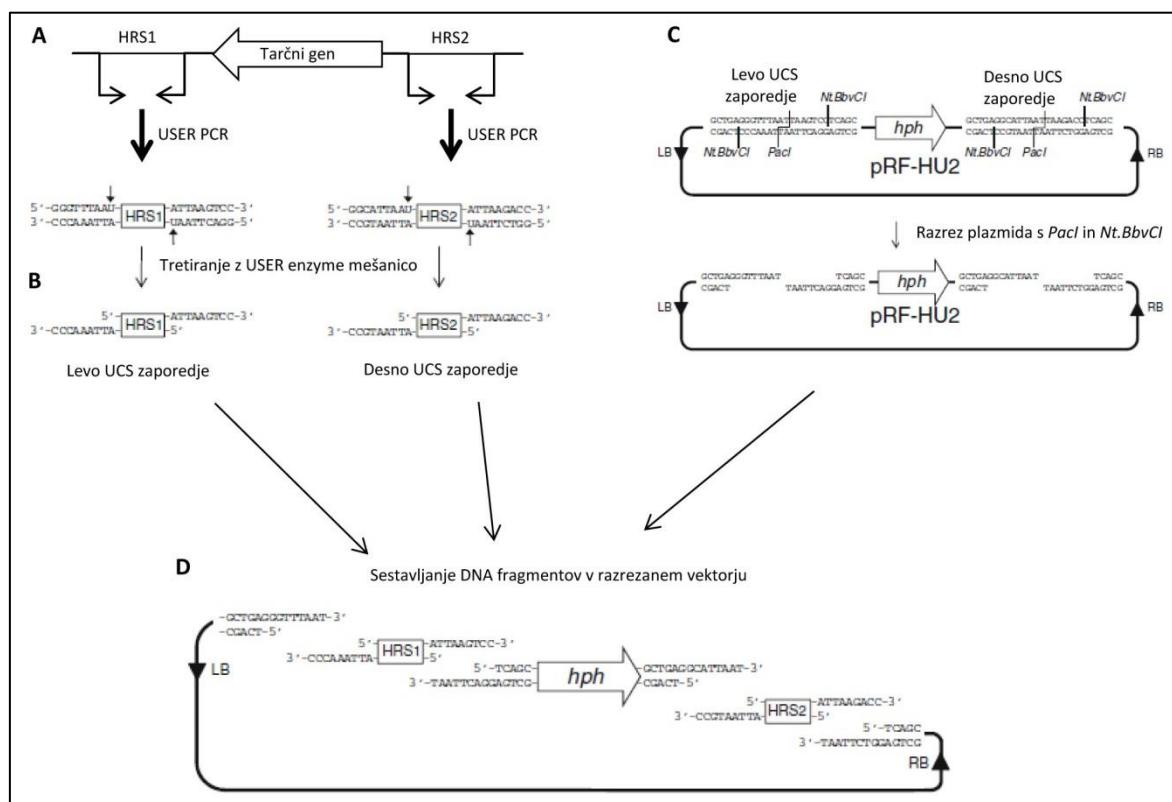
Vektorji za tarčne mutacije glivnega genoma so rekombinantne kasete, sestavljeni iz funkcionalnih DNA segmentov. To so promotor, terminator, markerski gen in dve homologno rekombinacijski zaporedji za tarčno vstavljanje v genom, ki obdajata markerski gen. Kloniranje vseh teh segmentov v en vektor je zapleten postopek, ki zahteva zmogljive in učinkovite metode za doseganje končnega cilja. Danes je na voljo veliko število metod kloniranja vektorjev za tarčne mutacije glivnega genoma, ki so se razvile predvsem zaradi potreb po uporabi v različnih gostiteljih (Ellis in sod., 2011). Še vedno se za sestavljanje enostavnnejših rekombinacijskih kaset (dva do trije fragmenti) uporablja tradicionalno kloniranje z restriktijskimi encimi in ligacijo. Kloniranje več fragmentov v različnih orientacijah v kompleksne vektorje pa temelji na uporabi številnih PCR tehnik v več korakih, ki sestojijo iz uporabe različnih specifičnih začetnih oligonukleotidov pri različnih pogojih pomnoževanja. Pri tem je pomembna metoda OE-PCR (angl. overlap extension PCR), znotraj katere je v uporabi več tehnik, kot so SLIC (angl. sequence and ligation-independent cloning), PIPE (angl. polymerase incomplete primer extension), CPEC (angl. circular polymerase extension cloning), SHA (angl. successive hybridization assembling) in druge. V uporabi je tudi Gibsonovo kloniranje, ki omogoča sestavljanje velike števila fragmentov v eno rekombinantno molekulo (Jiang in sod., 2013).

Vodilna metoda genske transformacije gliv je postala ATMT metoda (Frandsen, 2011). Strategije kloniranja transformacijskih vektorjev, ki se uporabljajo pri sestavljanju binarnih plazmidov za tarčno ali naključno mutagenezo glivnih genomov, so: klasično od restriktijskih encimov in ligaze odvisno kloniranje; Xi kloniranje; *in vitro* transpozonska mutageneza; priprava knock-out vektorja s fuzijskim PCR postopkom; In-Fusion kloniranje; Gatway kloniranje; Split-marker sistem ter USER Friendly kloniranje (Frandsen, 2011).

2.10.1.2.1 USER Friendly kloniranje

Frandsen in sod. (2008) so izpopolnili tehniko USER (uracil-specific excision reagent) Friendly kloniranja, ki omogoča kloniranje homolognih zaporedij v vektor z negativno selekcijo in s tem pripravo knock-out vektorja v enem koraku (slika 6). Metoda temelji na uporabi PCR reakcije s posebnimi začetnimi oligonukleotidi, ki omogočajo usmerjeno kloniranje PCR amplikonov v prirejen plazmid, imenovan pRF-HU2. Plazmid vsebuje selektijski marker (gen *hph*) higromicin B, ki ga obdaja dve UCS (angl. USER cloning sites) zaporedji. V UCS regiji se nahajajo prepoznavno mesto za restriktijski encim *PacI*, dve mesti za vezavo endonukleaze *Nt.BbvCI* in 4 variabilne nukleotidne pozicije. Za restriktijo plazmida se uporablja že omenjena restriktijska encima *PacI* in *Nt.BbvCI*, ki ustvarita štiri specifične 9 bp dolge konce, ki jih uporabimo za direktno kloniranje. V UCS regiji vstavimo HRS (angl. homologous recombination sequences) sekvenci. Ti omogočata homologno rekombinacijo tarčnega gena iz genoma glive s selektijskim markerjem iz

plazmida. HRS zaporedja pomnožimo v PCR reakciji s posebnimi začetnimi oligonukleotidi, ki vsebujejo na svojem 5' koncu specifične preveske, dolge 9 bp. Prevesek sestavlja poseben nukleotid 2-deoksiuridin (uracil) in zaporedje, komplementarno UCS regiji na sprejemnem vektorju pRF-HU2. Po PCR pomnoževanju HRS iz glivnega genoma pridobimo dvojno-verižne amplikone, ki jih tretiramo z encimsko mešanicó USER restriktijskih encimov (uracil DNA glikozilaza in DNA glikozilaza-liaza endo VIII), ki izreže 2-deoksiuridin in tako naredi enojno verigo s specifičnimi 9 bp dolgimi 3' konci, ki se ujemajo z razrezano UCS regijo na plazmidu. Naleganje razrezanega vektorja in dveh USER-tretiranih PCR amplikonov omogoča formacijo stabilne rekombinantne molekule, ki jo lahko uporabimo direktno pri transformaciji v *E. coli* brez predhodne ligacije.



Slika 6: USER Friendly kloniranje za pripravo knock-out vektorja v enem koraku; **A** – PCR pomnoževanje dveh HRS zaporedij s posebnimi začetnimi oligonukleotidi, ki vsebujejo uracil; **B** – tretiranje PCR amplikonov z USER restriktijsko mešanicó, ki naredi specifične 9 bp dolge preveske na 3' strani; **C** – razrez UCS mest, ki obdajata gen za higromicin, z encimoma *PacI* in *Nt.BbvCI*, ki ustvarita dva DNA vektorska fragmenta (*hph* kaseto in ogrodje plazmida) in štiri specifične 9 bp dolge konce; **D** – združevanje dveh vektorských fragmentov in dveh HRS insertov. Štiri specifični 9 bp dolgi preveski zagotavljajo pravilno spajanje vseh štirih DNA fragmentov med sabo v rekombinantno molekulo (Frandsen et al., 2008).

Figure 6: USER Friendly cloning strategy for construction of knock-out vector in a single step; **A** – PCR amplification of the two homologous recombination sequences (HRS) with special primers that contain uracil extensions; **B** - treatment of the PCR amplicons with USER enzyme mix, resulting in the generation of unique 9bp long 3' single stranded overhangs; **C** - digestion of the two USER cloning sites (UCSs) surrounding the *hph* selection marker gene with *PacI* and *Nt.BbvCI*, which results in the generation of two DNA fragments with four unique 9 bp long 3' overhangs; **D** – annealing of the two vector DNA fragments and the two inserts. The four unique 9 bp long overhangs ensure correct annealing between the four DNA fragments in one recombinant molecule (Frandsen et al., 2008).

2.10.2 Naključna insercijska mutageneza

Z naključno insercijsko mutagenezo lahko določimo molekularne mehanizme genetsko pogojenih procesov, vključno z mehanizmi patogeneze. Gre za metode, ki omogočajo naključno vgradnjo DNA inserta v genom proučevane glive in pridobitev velikega števila mutantov, ki se med seboj razlikujejo v mestih vgradnje DNA vključka v svojem genomu. Glavna prednost je, da za izvedbo teh metod ne potrebujemo podatkov o genskem zaporedju (Bhadauria in sod., 2009).

Rezultat klasičnih genetskih postopkov povzročanja naključnih mutacij, kjer se uporablja različni mutageni, kot so kemikalije in UV svetloba, je običajno izguba ali zamenjava posameznih baznih parov, kar vodi v okvare ali v spremenjeno delovanje posameznega gena. Na ta način izzvane mutacije niso specifične, so pa številne in razporejene po celotnem genomu. Slaba stran naključno povzročenih mutacij z mutagenimi snovmi je težavna analiza mutantov, ki je časovno potratna (Brown in Holden, 1998).

Naključno insercijsko mutagenezo lahko dosežemo tudi z ATMT metodo in nehomologno vgradnjo (NHEJ) vključka. Preko NHEJ mehanizma pride do netarčne vključitve DNA iz vektorja v genom gostitelja, kjer se eksogeno DNA zaporedje naključno vgradi v genom in lahko pri tem prekine neko kodogeno zaporedje (Mullins in sod., 2001). Prednost uporabe ATMT metode za transformacijo gliv za namene naključne insercijske mutageneze pred ostalimi metodami genske transformacije je predvsem v tem, da se pri ATMT transformaciji v genom vgradi v večini primerov samo ena kopija DNA vključka, kar olajša identifikacijo in izolacijo regij vključitve eksogene DNA v glivni genom. Poleg tega ima ATMT visoko učinkovitost transformacije, prav tako pa ni potrebno pripravljati protoplastov, saj se lahko za transformacijo uporabi intaktne celice različnih glivnih tkiv (Michielse in sod., 2005). Gostiteljski popravljalni mehanizmi za odpravljanje dvojno vijačnih DNA prelomov skrbijo za ohranjanje celovitosti genomskega zaporedja. NHEJ je najbolj pogost popravljalni mehanizem prelomov DNA v večceličnih evkariontih, vključno s sesalci, medtem ko je homologna rekombinacija, ki za svoje delovanje potrebuje prisotnost homolognih zaporedij, bolj pogost popravljalni mehanizem pri enoceličnih evkariontih, kot je npr. *Saccharomyces cerevisiae* (Tachibana, 2004).

Druga tehnika naključne insercijske mutageneze je REMI (angl. restriction enzyme mediated integration). V glivne protoplaste se prenese DNA plazmid, ki se ob prisotnosti restrikcijskih encimov razpre (linealizira). Restrikcijski encimi povzročijo dvojne prelome DNA zaporedja v genomu gostitelja in v ujemajoča mesta se lahko vgradi razprt plazmid. REMI metoda je bila razvita za insercijsko mutagenezo v *S. cerevisiae* (Riggle in Kumamoto, 1998). Metoda se je izkazala za zelo uspešno pri pridobivanju velikega števila naključnih mutantov v fitopatogenih vrstah *Cochliobolus heterostrophus*, *Alternaria alternata*, *F. graminearum* in *F. oxysporum* (Jiang in sod., 2013). Prednost metode je, da dobimo veliko število različnih mutantov, ki imajo v genom vstavljenno samo eno kopijo eksogenega DNA zaporedja (Kuspa, 2006). Kljub učinkovitosti metode pri določanju in kloniranju genov za patogenezo iz rastlinskih patogenov je njena glavna pomanjkljivost velika stopnja mutantov, ki ne vsebujejo eksogenega DNA vključka, a so se mutacije pojavile kot posledica delovanja restrikcijskih encimov. Nepredvidene mutacije so lahko vgradnja fragmenta brez obdajajočih mest za restrikcijske encime (v primeru delecij robnih

sekvenc); od restriktivnih encimov neodvisna vgradnja zaradi odsotnosti prepoznavnih mest za restriktivne encime v gostiteljskem genomu; tandemne ponovitve fragmenta in velike genomske preuređenosti zaradi delovanja restriktivnih encimov (delecije in inverzije). Za namene transformacije moramo pridobiti protoplaste, kjer se pojavljajo težave predvsem pri regeneraciji (Rogers in sod., 2004).

2.10.3 Utišanje genov preko RNAi mehanizma

RNAi (angl. RNA interference) je primerno orodje za določanje funkcije genov v genomu v primeru, ko manipulacija kodogenih regij na ravni genoma (knock-in in knock-out) ni uspešna npr. zaradi večjega števila kopij tarčnega gena (homologov), ki se pojavljajo v genomu (Jiang in sod., 2013). Mehanizem utišanja je posttranskripcijski in deluje na podlagi utišanja sekvenčno specifičnega gena (Leung in Whittaker, 2015).

Pri tej tehniki dvojno vijačna RNA molekula sproži razgradnjo homologne informacijske RNA molekule (angl. messenger RNA, mRNA) in na ta način zmanjša ali povsem zaustavi izražanje gena. RNAi mehanizem začne delovati, ko encim Dicer (endoribonukleaza) prepozna dvojno vijačnico RNA ali RNA v obliki lasnice. To se zgodi v citoplazmi. Dicer RNA molekulo razreže na 21 do 23 bp dolge manjše fragmente imenovane siRNA (angl. small interfering RNA). Te se povežejo z ribonukleoproteinom imenovanim RISC (angl. RNA induced silencing complex), ki inducira utišanje gena (Hannon, 2002). Z RNAi postopkom lahko ne samo razkrijemo funkcije številnih neznanih genov, ampak tudi določimo gene, ki so ključnega pomena za rast in patogenost fitopatogenih gliv (de Backer in sod., 2002).

Za uporabo metode utišanja (angl. knock-down) ni potrebno poznati regij na genomu, ki obdajajo tarčni gen, kar je uporabno pri vrstah, kjer je na voljo malo informacij o genomskemu zaporedju. Ker RNAi deluje na ravni mRNA, se eksogena DNA molekula ne vgrajuje v genom gostitelja. Zato učinkovitost RNAi metode ni odvisna od procesa homologne rekombinacije in števila vgradenj kopij ekosogene DNA v genom, kar so glavni omejujoči dejavniki tarčne modifikacije genoma. Metoda je široko uporabna v vrstah z večjedrnimi neseptiranimi celicami ali pa v primeru, če se nek tarčni gen nahaja v več kopijah v genomu (Weld in sod., 2006). Glavna slabost RNAi metode je, da zagotavlja le delno utišanje genov, ki niso nikoli utišani v celoti. Izboljšave je mogoče doseči s povečanjem izražanja RNAi konstrukta na način, da se uporabi plazmid z večjim številom kopij ali pa uporabi močan promotor. Poleg tega lahko zaradi uporabe kratkih dvojno vijačnih RNA molekul pride do utišanja netarčnih genov, kar lahko vodi do t. i. netarčnega efekta in v nepričakovane spremembe splošnega vzorca izražanja genov (Weld in sod., 2006). Prav tako metoda ni uporabna v vrstah, ki nimajo proteinov za procesiranje RNAi molekul, zato do utišanja genov ne more priti (npr. *Ustilago maydis*, *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae*) (Nakayashiki in sod., 2006).

2.10.4 Novejše metode genske manipulacije glivnih genomov

Še učinkovitejše spremenjanje glivnih genomov omogočajo novejše metode mutacijske analize. Med te spadajo TALEN in CRISPR/Cas9 sistema, ki s svojima mehanizmoma

delovanja zvišujeta pojav homologne rekombinacije, kar omogoča bolj učinkovito tarčno mutacijsko analizo. Oba načina tarčne modifikacije genoma bosta lahko pripomogla tudi k večji učinkovitosti uporabe inducibilnih promotorjev, katerih tarčna vgradnja v glivni genom zaenkrat temelji na homologni rekombinaciji.

TALE (ang. transcription activator-like effectors) so efektorji, ki so po svoji modularni strukturi in ortogonalnosti precej podobni cinkovim prstom. TAL efektorji so bili spojeni s *FokI* nukleazo in kompleks se imenuje TALEN (angl. TALE-nuclease). TALEN kompleks se lahko veže na katero koli DNA zaporedje, za katero vsebuje posebno aminokislinsko kodo, ki mu omogoča prepoznavo tarčnega DNA zaporedja in povzroči tarčni dvojni vijačni prelom DNA zaporedja (Christian in sod., 2010). Uporaba TALEN metode pri tarčnih mutacijah genoma lahko učinkovitost izbijanja genov poveča tudi na 100 %, kot je bilo ugotovljeno pri študiji na fitopatogeni filamentozni glivi *Pyricularia oryzae*, ki okužuje riž (Arazoe in sod., 2015). Čeprav je omenjena študija zaenkrat edini primer uporabe TALEN metode na filamentoznih glivah, ima metoda velik potencial za uporabo v funkcijskih analizah genov v filamentoznih glivah (Jiang in sod., 2013).

Pri CRISPR/Cas9 metodi DNA endonukleaza Cas9 omogoča premik, vgradnjo in zamenjavo katerega koli DNA zaporedja v tarčnem genomu, ki temelji na CRISPR vodeči RNA verigi (angl. guide RNA; gRNA) (Marraffini in Sontheimer, 2010). Lastnost opisanega procesa izkoriščamo v genomskem inženirstvu in funkcijskih analizah za ciljanje tarčne regije v genomu (Qi in sod., 2013). Metoda CRISPR/Cas9 je že bila uspešno uporabljena v glivah, in sicer za tarčno izbijanje genov v vrstah *C. albicans*, *M. oryzae* in *A. fumigatus* (Cairns in sod., 2016). V povezavi s CRISPR/Cas9 sistemom ne govorimo več samo o tarčnih mutacijah genoma, ampak govorimo o globalnem urejanju genoma, kjer v poštev ne pridejo samo tarčne mutacije, ampak tudi druge modifikacije, npr. nadzor izražanja genov, zamenjava promotorjev, tarčna zamenjava posameznih nukleotidnih parov, kar vodi v spremembo na nivoju ene aminokisline, ipd. CRISPR/Cas9 sistem za modifikacijo glivnih genomov še ni v široki uporabi med laboratoriji, toda glede na dosedanja poročila o uspešnosti uporabe pri funkcijskih študijah gliv je pričakovati, da bo urejanje celotnih genomov naslednje poglavje v funkcijskih analizah gliv (Cairns in sod., 2016).

Vstavljanje konstitutivnih promotorjev za namen povečane ekspresije genov je danes v rutinski uporabi pri funkcijskih analizah (Frandsen in sod., 2008). Druga skupina so inducibilni promotorji, ki se aktivirajo ob prisotnosti določenih molekul, imenovanih aktivatorji, ki sprožijo začetek transkripcije genov. Predvsem inducibilni promotorji so izredno zanimivo orodje, saj je z njimi teoretično mogoče nadzorovati ekspresijo določenega gena v prostoru in času. Uporaba inducibilnih promotorjev je koristna v primeru, če je konstitutivno izražen transgen letalen za transformanta ali pa če je namen izmeriti učinek ekspresije nekega gena. Obstaja več različnih inducibilnih promotorskih sistemov, ki pa so za širšo uporabo zaenkrat še premalo preizkušeni in optimizirani. Posamezni uspešni primeri uporabe kažejo uporabnost in prednosti metode (Cairns in sod., 2016). Prva uspešna *in planta* uporaba inducibilnega promotorskega sistema se je zgodila nedavno v oomiceti *Phytophthora infestans* (Gamboa-Melendez in Judelson, 2015).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 IZOLATA GLIVE *Verticillium nonalfalfa*

Za mutacijsko analizo smo izbrali letalni patotip PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa*, izolat T2. Izolat smo pridobili iz zbirke škodljivih organizmov Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu. Izolat smo vzdrževali v petrijevkah na trdem gojišču $\frac{1}{2}$ CD [8,4 g/l Czapek Dox (Sigma-Aldrich), 1 g/l kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich), 1 g/l peptona (Sigma-Aldrich), 1 g/l sladnega ekstrakta (Sigma-Aldrich) in 15 g/l agarja (Sigma)] ali PDA gojišču (potato dextrose agar), na sobni temperaturi in v temi. Pri testih umetnega okuževanja rastlin smo poleg izolata T2 uporabljali še patotip M (genotip PG1) glive *V. nonalfalfa*, izolat Rec, ki smo ga vzdrževali v enakih pogojih kot izolat T2.

3.2 IZOLACIJA VISOKOMOLEKULARNE GLIVNE DNA IZ IZOLATA T2

Glivno DNA smo izolirali po protokolu od Kump in sod. (1992) z določenimi spremembami. Najprej smo na gojišče v 90 mm petrijevke, ki je bilo preraslo z 10 dni starim micelijem izolata T2, dodali 5 ml 50 mM EDTA (Alkaloid) (pH 7,5) ter podrgnili micelij z Drigalsky spatulo. Požete spore smo prenesli v 50 ml centrifugirko (Eppendorf) in centrifugirali 10 min na 4 °C pri 4000 obr/min (centrifuga Eppendorf). Pelet glivnih spor smo resuspendirali z raztopino lizirajočega encima iz glive *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) (0,030 g encima smo raztopili v 1 ml CPES pufra [40 mM citronska kislina, 120 mM Na₂HPO₄, 1,2 M sorbitol, 20 mM EDTA, 5 mM DTT (pH 6,0)], suspenzijo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko in inkubirali čez noč na 30 °C. Po čeznočni inkubaciji smo centrifugirali 10 min pri relativni centrifugalni sili 14 000 g, nato odpipetirali vmesno vodno plast iz mikrocentrifugirke in ponovno centrifugirali 2 min pri relativni centrifugalni sili 14 000 g ter nato odstranili še zadnje ostanke vode iz vmesne plasti. Potem smo dodali 500 µl TES pufra [100 mM TRIS-HCl (pH 7,5)], 10 mM EDTA, 2 % SDS] in 100 µg encima proteinze K (Sigma-Aldrich). Po močnem mešanju smo vzorec inkubirali 30 min na 60 °C z občasnim mešanjem. Nato smo uravnali koncentracijo soli na 1,4 M s 5 M NaCl, dodali 1/5 volumna 5 % CTAB (Sigma) in inkubirali 10 min na 65 °C. Po inkubaciji smo v vzorec dodali 750 µl zmesi kloroform in izoamilalkohola v razmerju 24:1 in ga premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Sledila je inkubacija 30 min na ledu ter nato centrifugiranje 10 min pri 4 °C in relativni centrifugalni sili 14 000 g. Supernatant smo z 1 ml pipeto prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in dodali 225 µl 5 M amonijevega acetata. Zopet je sledila inkubacija 30 min na ledu in centrifugiranje 10 min pri 4 °C in relativni centrifugalni sili 14 000 g. Supernatant smo prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in dodali 0,55 volumna ledeno hladnega izopropanola (Merck). Sledila je inkubacija 1 h na -20 °C in nato centrifugiranje 5 minut pri 4 °C in 14.000 g. Supernatant smo previdno odstranili, preostali pelet pa dvakrat sprali v 70% etanolu (Merck) pri sobni temperaturi. Po odstranitvi supernatanta smo pelet DNA osušili na sobni temperaturi in ga raztopili v 50 µl raztopine TdE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, Integrated DNA Technologies). Vzorec glivne DNA smo shranili pri -20 °C.

3.3 IZBOR KANDIDATNIH GENOV ZA IZBIJANJE IZ GENOMA

3.3.1 Kandidatni virulentni geni, določeni *in planta*

Kandidatne virulentne gene oz. proteine, določene *in planta*, smo poimenovali tako, da ime zajema ime glive, ime proteina, mesto v genomu in številko genskega modela. Primer - protein VnaSSP4.2:

- Vna – ime glive (*V. nonalfalfa*e),
- SSP – ime proteina (angl. Small Secreted Protein),
- 4 – številka kromosoma,
- 2 – številka genskega modela v genomu *V. nonalfalfa*e, kot je navedeno v genomskem brskalniku JBrowser (vert.fri.uni-lj.si) (Javornik in sod., neobjavljen).

3.3.1.1 Proteomska analiza ksilemskih tekočin okuženih in neokuženih rastlin neodpornega kultivarja hmelja

S proteomsko primerjavo proteinov izoliranih iz ksilemskega soka neodpornega kultivarja hmelja 'Celeia', okuženega z letalnim patotipom PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa*e (izolat T2), z nekuženo kontrolo, je bilo določenih osem proteinskih lis, ki so se pojavile v ksilemskem soku okuženih rastlin. Lise so bile analizirane z masno spektrometrijo (LC-MS) in obdelane z bioinformacijskimi orodji za identifikacijo proteinov. Identificirani so bili trije proteini (Mandelc, 2010):

- a) alfa-arabinofuranozidaza (VnaAbf4.216),
- b) peroksidaza (VnaPRX1.1277),
- c) hipotetični protein (VnaSSP4.2).

V genomu izolata T2 glive *V. nonalfalfa*e se nahajajo štiri kopije gena *VnaAbf4.216*, (Javornik in sod., neobjavljen), zato gena *VnaAbf4.216* nismo izbrali kot kandidata za funkcijsko analizo, v katero pa smo vključili gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*.

3.3.1.2 cDNA-AFLP analiza transkriptomov odpornega in neodpornega kultivarja hmelja

S cDNA-AFLP analizo transkriptoma neodpornega kultivarja hmelja 'Celeia' in odpornega kultivarja 'Wye Target', ki sta bila okužena z letalnim patotipom PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa*e (izolat T2), so bile poleg rastlinskih (hmeljnih) DNA fragmentov odkrite tudi glivne sekvene, ki so imele visoko homologijo z genomskimi sekvencami izolata T2 glive *V. nonalfalfa*e (Javornik Cregeen, 2010). Izmed teh zadetkov smo kot kandidata za izbijanje izbrali gen za gen za lektin, ki vsebuje domeno za vezavo hitina (chitin binding protein, VnaCBD8.213) in protein neznane funkcije (conserved hypothetical protein, VnaHYPO7.546).

3.3.2 Kandidatni virulentni geni, določeni *in silico*

V raziskovalni skupini so bili sekvencirani trije genomi letalnega patotipa PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa*e ter trije genomi blagega patotipa M (genotip PG1) glive *V. nonalfalfa*e. S primerjalno genomiko so bile določene genomske regije, ki so jih vsebovali samo letalni patotipi PV1. Na to regijo so bile mapirane sekvene iz RNA-seq analize letalnega patotipa PV1 glive *V. nonalfalfa*e. Te sekvene so bile pridobljene iz glive, ki je rasla na gojišču, ki je simuliral ksilemski sok rastline. Na podlagi razlik v izražanju RNA in z uporabo programa za predikcijo genov je bilo določenih 105 kandidatnih zaporedij v genomu letalnega patotipa PV1 *V. nonalfalfa*e, ki se v genomu blagega patotipa M ne nahajajo in bi lahko bili potencialni virulentni geni. S kriteriji, kot so nivo izražanja RNA v izolatu T2 *V. nonalfalfa*e, ki je rasel na ksilem posnemajočem gojišču, dolžina kandidatne regije, peptidni signal in število vsebovanih cistein aminokislinskih ostankov, so bili kandidatni geni razvrščeni od najboljšega kandidata do najslabšega. Tarče za izbijanje genov so si sledile od najboljšega kandidata proti najslabšemu, za funkcionalno analizo pa smo izbrali 12 kandidatnih genov. Kandidatni virulentni geni imajo naslednji način poimenovanja, primer Vna3g4.790:

- Vna – ime glive (*V. nonalfalfa*e),
- 3g – zaporedna številka gena glede na izbiro oz. vrstni red (1-12) in črka »g« za poimenovanje regije z izrazom »gen«,
- 4 – številka kromosoma,
- 790 – številka genskega modela v genomu *V. nonalfalfa*e, kot je navedeno v genomskejem brskalniku JBrower (vert.fri.uni-lj.si) (Javornik in sod., neobjavljen).

Če se kandidatna virulentna regija nahaja na nesestavljenem genomskem odseku, je dobil gen namesto številke kromosoma ime »UN« (angl. unplaced). Če na kandidatni virulentni regiji ni previden noben genski model, zapis imena na koncu ne vsebuje številke modela.

3.4 USER KLONIRANJE KNOCK-OUT PLAZMIDA

3.4.1 Začetni oligonukleotidi za PCR reakcije pri USER kloniranju

Vse pare začetnih oligonukleotidov (ZO) smo določili s spletnim orodjem Primer3 (Rozen in Skaletsky, 2000) z uporabo prednastavljenih vrednosti posameznih parametrov. V procesu USER kloniranja se PCR reakcija uporablja za pomnoževanje homolognih rekombinantnih sekven (HRS) iz glivnega genoma ter za preverjanje skloniranih plazmidov v *E. coli*. Vse ZO, uporabljeni v tej raziskavi, smo naročili pri podjetju Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgija).

3.4.2 PCR pomnoževanje homolognih rekombinantnih sekvenc (HRS) iz glivnega genoma

Pare ZO za pomnoževanje HRS smo zasnovali tako, da smo v predviden amplikon vključili nukleotidno zaporedje dolžine 1000 – 1200 bp. Vsak ZO je vseboval na 5' koncu specifične preveske, dolge 9 bp (Frandsen in sod., 2008), ki so omogočali usmerjeno kloniranje v pRF-HU2 plazmid (preglednica 3). Seznam celotnih zaporedij ZO je podan v prilogi A.

Preglednica 3: Zaporedja 9 bp dolgih preveskov na 5' koncu specifičnih ZO za pomnoževanje HRS iz glivnega genoma.

Table 3: Sequences of 9 bp long overhangs at the 5' end of the specific primers for amplification of HRS from fungal genome.

Oznaka ZO	Zaporedje preveska na 5' koncu ZO	Območje pomnoževanja
O1for	GGTCTTAAU_	HRS 1
O2rev	GGCATTAAU_	HRS 1
A3for	GGACTTAAU_	HRS 2
A4rev	GGGTTTAAU_	HRS 2

PCR pomnoževanje HRS zaporedij smo izvajali v aparaturi proizvajalca Applied Biosystems v reakcijskem volumnu 15 µl. Za pomnoževanje smo uporabljali DNA polimerazo Pfu Turbo C_X Hotstart (Agilent Technologies) skladno z navodili proizvajalca. Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 1X Pfu Turbo C_X pufer (iz 10X založne raztopine; Agilent Technologies), 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 0,5 µM vsakega od obeh začetnih oligonukleotidov in 1,0 U encima Pfu Turbo C_X Hotstart.

Pomnoževanje v PCR smo izvedli z naslednjim programom:

- začetna denaturacija: 2 min pri 95 °C,
- 30 ciklov:
 - 30 s pri 95 °C,
 - 30 s pri 55 °C,
 - 1 min pri 72 °C,
- končno podaljševanje – ekstenzija: 10 minut pri 72 °C,
- ohlajanje do 4 °C.

3.4.2.1 Analiza uspešnosti PCR reakcije

Ali smo pri PCR reakciji dobili predvidene produkte, smo preverili z ločevanjem PCR produktov s horizontalno gelsko elektroforezo (aparatura BioRad Sub-Cell, model 192) v 0,5X TBE pufru [44,5 mM Tris, 44,5 mM borna kislina in 1 mM EDTA, pH 8,0; pripravljen iz 5X založne raztopine]. PCR amplikone smo ločevali na 1,2 % agaroznem gelu. Gel smo pripravili sami, in sicer iz 1,2 % (w/v) agaroze (SeaKem LE, Lonza) in 0,5X TBE pufra. Mešanico agaroze in TBE pufra smo trikrat pogreli do zavretja v mikrovalovni

pečici. Nato smo gel ohladili pod 50 °C in dodali etidijev bromid (založna raztopina 10 mg/ml) do koncentracije 0,5 µg/ml. Iz PCR reakcije smo vzeli alikvot 5 µl ter mu dodali 5 µl nanašalnega barvila [12,5% (w/v) Ficoll 400, 6,7% (v/v) 10X TBE, 0,2% (w/v) bromfenol modro] in nanesli na agarozni gel. Za velikostni standard smo uporabili GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas). Elektroforezo smo izvajali pri napetosti do 130 V do zadostne ločitve vzorcev, kar smo preverili s transiluminatorjem TMF-30 (UVP Inc., Združeno kraljestvo). Gele smo fotografirali s fotoaparatom Nikon Coolpix 8400 (Nikon Corporation, Tokyo, Japonska), pritrjenim na ohišje reflektorne luči.

3.4.3 Priprava plazmida pRF-HU2 za kloniranje

Plazmid pRF-HU2 smo pridobili iz centra »Fungal Genetics Stock Center« (Kansas State University, Manhattan, ZDA). Plazmid se je nahajal na posušenem papirnatem disku, v količini 150 ng. Disk smo namočili v 50 µl TdE pufru in pustili, da se je plazmid raztoplil. Nato smo disk odstranili in v TdE pufru je ostal raztopljen plazmid.

3.4.3.1 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5- α

Za transformacijo smo uporabili 100 µl suspenzije kompetentnih celic *E. coli* DH5- α . V suspenzijo, ki se je nahajala v na ledu ohlajeni 1,5 ml mikrocentrifugirki, smo dodali 2 µl raztopljenega plazmida pRF-HU2, rahlo pretresli in inkubirali 30 min na ledu. Nato smo mikrocentrifugirko prenesli v vodno kopel, ki je bila ogreta na 42 °C in inkubirali natančno 45 s. Nato smo mikrocentrifugirko prenesli na led za 5 min in nato dodali 900 µl sterilnega tekočega LB (Luria-Bertani) gojišča [10 g/l triptona (Sigma-Aldrich), 5 g/l kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich), 10 g/l NaCl]. Po enourni inkubaciji na 37 °C z rahlim stresanjem smo vseh 100 µl transformirane suspenzije *E. coli* prenesli na trdo LB selekcijsko gojišče [10 g/l triptona (Sigma-Aldrich), 5 g/l kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich), 10 g/l NaCl, 10 g/l agarja (Sigma), pH= 7,3; po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 55 °C in dodali 50 mg/l kanamicina]. Za razmas smo uporabili ukrivljeno stekleno pasteurjevo pipeto. Sledila je čeznočna inkubacija pri 37 °C.

3.4.3.2 Izolacija plazmida pRF-HU2 iz transformiranih celic *E. coli* DH5- α

Po inkubaciji čez noč so se na plošči s selekcijskim gojiščem pojavile posamezne kolonije, ki so vsebovale plazmid pRF-HU2. S sterilnim zobotrebcem smo se v aseptičnih pogojih dotaknili ene kolonije in zobotrebec odvrgli v epruveto s 5 ml gojišča LB z dodatkom 120 µg/ml kanamicina. Lastnost plazmida pRF-HU2 je, da se v *E. coli* nahaja v nizkem številu kopij. Zato smo za eno izolacijo inokulirali 6 epruvet. Epruvete smo preko noči inkubirali pri 37 °C s stresanjem pri 120 obratih na minuto.

Plazmid smo izolirali s komercialnim kompletom »GenCatch™ Plasmid Miniprep Kit« (Epoch Life Science Inc., Sugar Land, TX, ZDA). V 2 ml mikrocentrifugirke smo do njihovih zgornjih oznak prelili prekonočne kulture transformiranih celic *E. coli* DH5- α . Nato smo centrifugirali 1 min pri 14.000 obratih na minuto (centrifuga Eppendorf) in

supernatant (gojišče) odlili. Postopek prelivanja, centrifugiranja in odlivanja smo ponovili še dvakrat ter tako zbrali vse celice *E. coli* prekonočne kulture v eni mikrocentrifugirki. Na pelet celic smo dodali v 200 µl raztopine MX1 z dodano RNAAzo, ki se je nahajal na 4 °C in podrgnili po stojalu, da se je pelet resuspendiral. Nato smo dodali 250 µl raztopine MX2 in premešali s počasnim obračanje epic ter inkubirali 2 min na sobni temperaturi. Sledilo je dodajanje 300 µl raztopine MX3 in takojšnje mešanje z obračanjem mikrocentrifugirk. Po 10 min centrifugiranja pri 14.000 obr/min smo supernatant prenesli v GenCatch™ plus kolono in centrifugirali 1 min pri 5.000 obratih na minuto. Kolono smo sprali s 500 µl raztopine WN pri 9.000 obr/min za 1 min, zatem pa še s 700 µl raztopine WS pri 9.000 obr/min za 30 s. Kolono smo zračno osušili s končnim centrifugiranjem pri 13.000 obr/min za 2 min. Kolono smo prestavili v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko ter na sredino kolone dodali 50 µl elucijske raztopine EB. Po 2 min inkubaciji na sobni temperaturi je sledilo spiranje plazmida s kolone pri 13.000 obr/min v času 30 s. Koncentracijo plazmidne DNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija).

3.4.3.3 Restrikcija plazmida pRF-HU2 za namene USER kloniranja

Popolna restrikcija (linearizacija) plazmida pRF-HU2 je potekala z restrikcijskima encimoma *PacI* in *Nt.BbvCI* v končnem volumnu 300 µl. Za restrikcijsko mešanico smo uporabili 10 µg plazmida, 1X pufer NEB4 (iz 10X založne koncentracije; New England Biolabs), 70 U encima *PacI* (založna raztopina 10 000 U/ml; New England Biolabs) in 1X BSA (iz 100X založne koncentracije; New England Biolabs). Restrikcijsko reakcijo smo inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo dodali še 20 U encima *PacI* in 40 U encima *Nt.BbvCI* (založna raztopina 10 000 U/ml; New England Biolabs). Sledila je inkubacija 1 h na 37 °C. Za namene pregleda uspešnosti restrikcije smo iz restrikcijske mešanice vzeli alikvot 3 µl, dodali 5 µl nanašalnega barvila ter vzorec nanesli na 1 % agarozni gel in ločevali pri napetosti 100 V.

3.4.3.4 Čiščenje restrikcijske mešanice pRF-HU2 plazmida

Restrikcijsko mešanico smo očistili s komercialnim kompletom »Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit« (GE Healthcare). Restrikcijsko mešanico smo razporedili v dve 1,5 ml mikrocentrifugirki. Nato smo v vsako dodali 500 µl raztopine Capture buffer type 3, močno premešali na vorteksu ter nato na kratko centrifugirali, da se je vsa mešanica zbrala na dnu. Nato smo mešanico prenesli v dve koloni GFX MicroSpin column, ki smo ju že vstavili v posebni zbirni mikrocentrifugirki. Nato smo centrifugirali 30 s pri 14 000 obr/min. Sledilo je spiranje kolon s 500 µl raztopine Wash buffer type 1 in centrifugiranje 30 s pri 14 000 obr/min. Koloni smo nato prestavili v sveži 1,5 ml mikrocentrifugirki ter dodali 50 µl Elution buffer type 4. Po inkubaciji 1 min na sobni temperaturi smo z 1 min centrifugiranjem pri 14 000 obr/min sprali DNA iz kolon. Koncentracijo očiščene restrikcijske mešanice smo izmerili s spektrofotometrom NanoVue, razdelili v alikvote po 25 µl ter shranili na -20 °C.

3.4.4 Reakcija USER Friendly kloniranja

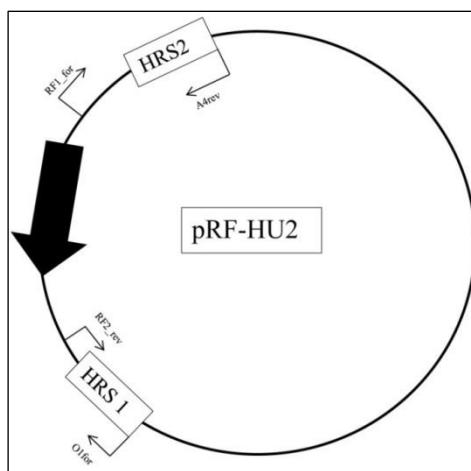
Reakcija USER Friendly kloniranja poteka v volumnu 25 µl in sestoji iz:

- 10 µl PCR produkta 1 (zaporedje HRS 1),
- 10 µl PCR produkta 2 (zaporedje HRS 2),
- 4 µl linealiziranega plazmida pRF-HU2,
- 1 µl USER mešanice encimov (založna raztopina 1000 U/ml; New England Biolabs).

Mešanico smo inkubirali 20 min pri 37 °C in nato 20 min pri 25 °C. Po inkubaciji smo celotno mešanico uporabili za transformacijo kompetentnih celic *E. coli* DH5-α. Transformacijo smo izvedli po postopku opisanem v poglavju 3.4.3.1.

3.4.5 Preverjanje kloniranega knock-out plazmida s PCR na osnovi kolonije

Posamezne kolonije *E. coli*, ki so se pojavile na selekcijskem gojišču, smo s PCR reakcijo na osnovi kolonije testirali, ali vsebujejo pravilno sestavljen knock-out plazmid. Med procesom kloniranja se namreč lahko zgodi, da se katera HRS ne vstavi v plazmid, lahko pride tudi do napačne orientiranosti HRS v plazmidu ali drugih napak. Za namene preverjanja kloniranega knock-out plazmida se uporablajo specifični pari ZO, s katerimi se preverja ne samo prisotnost HRS v plazmidu, ampak tudi orientiranost HRS. V ta namen se v kombinaciji z ZO, ki se uporablajo pri PCR pomnoževanju HRS, uporablja še dva specifična ZO (imenovana RF1_for in RF2_rev), ki sta narejena za namene pomnoževanja zaporedij, vstavljenih v pRF-HU2 plazmid (Frandsen in sod., 2008). S paroma ZO, s katerima pomnožujemo HRS iz glivnega genoma (O1for/O1rev in A3for/A3rev), preverimo prisotnost HRS v plazmidu. Pravilno orientiranost pa preverimo s paroma ZO O1for/RF2_rev in RF1_for/A4rev (slika 7).



Slika 7: Shema preverjanja sestavljenega knock-out plazmida. Za preverjanje se uporablja dva para ZO, in sicer O1for/RF2_rev in RF1_for/A4rev.

Figure 7: Scheme of verification of cloned knock-out plasmid with primers O1for/RF2_rev and RF1_for/A4rev.

Na selekcijskem gojišču smo izbrali od 5 do 10 kolonij. V aseptičnih pogojih smo se s konico sterilnega zobotrebca dotaknili posamezne kolonije in konico pomočili v 80 µl TdE pufru. Sledila je toplotna obdelava suspenzije 8 min na 96 °C, pri čemer se je DNA sprostila iz celic bakterij. Po mešanju je sledilo kratko centrifugiranje. Za PCR reakcijo v volumnu 10 µl smo uporabili 2,5 µl toplotno obdelane suspenzije. Reakcijske mešanice so vsebovale 1X Taq pufer (iz 10X založne raztopine; Fermentas), 1,5 mM MgCL₂, 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 500 nM začetnih nukleotidov in 0,25 U encima *Taq* Fermentas.

Pomnoževanje v PCR smo izvedli z naslednjim programom:

- začetna denaturacija: 3 min pri 94 °C,
- 35 ciklov:
 - 30 s pri 94 °C,
 - 30 s pri 55 °C,
 - 1 min pri 72 °C,
- končna ekstenzija: 8 minut pri 72 °C,
- ohlajanje do 4 °C.

Po končani PCR reakciji smo uspešnost reakcije preverili z nanašanjem vzorcev na agarozni gel po postopku opisanem v poglavju 3.4.2.1. Izmed kolonij, ki so vsebovale pravilno sestavljen knock-out plazmid, smo naključno izbrali eno ter po postopku opisanem v poglavju 3.4.3.2, izolirali plazmid. Izoliran plazmid smo shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.5 ELEKTROPORACIJA KNOCK-OUT PLAZMIDA V *Agrobacterium tumefaciens*

Za elektroporacijo smo uporabili komercialni sev LBA4404 (Invitrogen, Carlsbad, ZDA), ki ima na kromosomu TiAch5 *rif* gen za odpornost na rifampicin in vsebuje razoroženi Ti plazmid pAL4404 za katabolizem opinov in z bakterijsko odpornostjo na spektinomicin in streptomycin (Hellens in sod., 2000).

3.5.1 Priprava kompetentnih celic bakterij *A. tumefaciens* za elektroporacijo

Bakterije LBA4404 brez tarčnega plazmida, ki so bile shranjene v zamrzovalniku na -80 °C, smo odtalili na ledu. 40 µl bakterijske suspenzije smo inokulirali v 10 mL YEB gojišča [5,0 g/l saharoze, 5 g/l peptona (Sigma-Aldrich), 5 g/l govejega ekstrakta (Sigma-Aldrich), 1 g/l kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich) in 1 g/l MgSO₄ x 7H₂O (Merck, Darmstadt, Nemčija); pH 7,0] in inkubirali 7 h na 28 °C in stresanju 130 rpm. Potem smo inokulirali 1 ml kulture v 100 ml svežega YEB gojišča ter pri istih pogojih (28 °C in stresanju 130 rpm) inkubirali čez noč v stresalniku WB30-STE (Kambič, Semič, Slovenija), dokler kultura ni dosegla optične gostote (merjene pri 600 nm s spektrofotometrom Eppendorf BioPhotometer RS232C) 0,6. Potem smo kulturo ohladili na ledu in jo pol prelili v 50 ml centrifugirko (Sterilin®) ter centrifugirali 5 min pri 3.000 obr/ min in pri 4 °C. Supernatant

smo zavrgli ter ponovili centrifugiranje še z drugo polovico kulture in tako združili ves pelet bakterijskih celic. Pelet smo 3x spirali z dodajanjem 25 ml ledeno hladne sterilne ddH₂O. Po zadnjem spiranju smo pelet raztopili v 400 µl ledeno hladne sterilne ddH₂O. Glede na končni volumen smo dodali 50 % glicerol do končne koncentracije 10 % in razdelili suspenzijo v 40 µl alikvote v sterilne 1,5 ml mikrocentrifugirke. Po hitrem centrifugiranju smo celice shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.5.2 Elektroporacija celic bakterij *A. tumefaciens* LBA4404

Za elektroporacijo knock-out plazmida v kompetentne celice smo uporabili napravo Easyject Prima (Equibio Ltd., Cambridge, VB) in sledili navodilom proizvajalca (Equibio Ltd. in Invitrogen). Iz zamrzovalnika, kjer so bile bakterije *A. tumefaciens* shranjene na -80 °C, smo vzeli epico s 40 µl kulture in jo odtalili na ledu. Nato smo dodali 200 ng plazmida, nežno premešali in inkubirali 1 min na ledu. Nato smo mešanico previdno prestavili v elektroporacijsko kiveto, ki smo jo pred tem vsaj 10 min inkubirali na ledu, in pri tem pazili, da med prestavljanjem v mešanico nismo vnesli zračnih mehurčkov. Nato smo obe kovinski elektrodi elektroporacijske kivete s papirnato brisačo obrisali do suhega in kiveto vstavili v odprtino v elektroporatorju. Suspenzijo smo elektroporirali pri 2.500 V za 5 ms in takoj dodali 1 ml YM gojišča [0,4 g/l kvasnega ekstrakta (Sigma-Aldrich), 10 g/l manitola (Duchefa), 0,1 g/l NaCl (Duchefa), 0,2 g/l MgSO₄ x 7H₂O (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 0,38 g/l K₂HPO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška)]; pH 7,0], ogretega na sobno temperaturo. Suspenzijo smo rahlo premešali s počasnim pipetiranjem ter jo prenesli v 15 ml centrifugirko (Sterilin®). Sledile so 3 h inkubacije pri 30 °C in 230 rpm ter nato razmas 10 µl, 50 µl in 100 µl z ukrivljeno stekleno pasteurjevo pipeto na trdo YM selekcijsko gojišče, kateremu sta bila dodana selekcijska antibiotika 50 mg/l kanamicina (selekcija glede na binarni knock-out plazmid) in 100 mg/l streptomicina (bakterijska selekcija). Petrijevke smo inkubirali pri 30 °C od 2 do 3 dni.

3.5.3 Preverjanje plazmida v bakterijah *A. tumefaciens* LBA4404 s PCR na osnovi kolonije

Ko so se na gojišču pojavile kolonije, smo izbrali od 5 do 10 kolonij in s PCR reakcijo na osnovi kolonije testirali, ali vsebujejo nepoškodovan knock-out plazmid. Za testiranje kolonij smo uporabili enak postopek, kot je opisan v poglavju 3.4.5.

3.5.4 Shranjevanje bakterij *A. tumefaciens* z zamrzovanjem

Naključno smo izbrali eno kolonijo, za katero smo s PCR reakcijo na osnovi kolonije ugotovili, da vsebuje nepoškodovan plazmid. Kolonijo smo aseptično precepili v tekoče gojišče YEB ter dodali selekcijska antibiotika kanamicin (50 mg/l) in streptomycin (100 mg/l). Kulturo smo inkubirali čez noč v stresalniku pri 28 °C in 130 rpm in pri OD₆₀₀ = 0,6 ustavili rast bakterij z inkubacijo na ledu. V deset 1,5 ml mikrocentrifugirk smo pripravili alikvote 700 µl kulture in 300 µl sterilnega 50 % glicerola ter jih shranili v zamrzovalniku pri -80 °C.

3.6 GENSKA TRANSFORMACIJA GLIVE *V. nonalfalfa*

3.6.1 Priprava kulture *A. tumefaciens* s knock-out plazmidom

Kulturo *A. tumefaciens* s knock-out plazmidom smo vzeli iz zamrzovalnika, kjer je bila shranjena na -80°C ter jo odtalili na ledu. 500 μl kulture smo inokulirali v 20 ml tekočega gojišča IMAS [1X raztopina soli (iz 2,5X založne raztopine; 2,5X založna raztopina soli – 3,625 g/l KH_2PO_4 , 5,125 g/l K_2HPO_4 , 0,375 g/l NaCl , 1,250 g/l MgSO_4 , 7 H_2O , 0,165 g/l CaCl_2 , 2 H_2O , 0,0062 g/l FeSO_4 , 7 H_2O in 1,250 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 10 % (w/v) glukoze in 20 % (v/v) glicerola; po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 55°C in dodali 40 ml 1 M MES ter 1 ml 200 mM acetosiringona], kateremu smo dodali selekcijski antibiotik kanamicin (50 mg/l). Sledila je čeznočna inkubacija na 28°C pri stresanju 120 rpm. Pri $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,7$ smo ustavili rast bakterij z inkubacijo na ledu.

3.6.2 Priprava konidijev *V. nonalfalfa*, izolat T2

Izolat T2 glive *V. nonalfalfa* smo kot založno kulturo pridobili iz zbirke škodljivih organizmov Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu v obliki nekaj dni stare kolonije, nacepljene na sredino 70 mm petrijevke s PDA gojiščem. Za namene razmnoževanja kulture smo v sterilnih pogojih na gojišče z založno kulturo dodali 1 ml sterilne dvakrat destilirane vode, podrgnili s sterilno ukrivljeno stekleno pasteurjevo pipeto ter nacepili po 100 μL suspenzije na sveža $\frac{1}{2}$ CD gojišča, s premerom petrijevke 90 mm. Po 10 dneh rasti v temi in na sobni temperaturi smo spore iz ene petrijevke poželi (dodali 2 ml sterilne vode in podrgnili s sterilno ukrivljeno stekleno pasteurjevo pipeto) ter prešeli z uporabo števne komore (Bürker Türk, Brand, Nemčija). Spore smo z vodo redčili do koncentracij 10^8 spor/ml in 10^7 spor/ml.

3.6.3 Postopek transformacije glive *V. nonalfalfa*, izolat T2

Kulturo *A. tumefaciens* in spore izolata T2 glive *V. nonalfalfa* smo v 1,5 ml mikrocentrifugirkah zmešali v razmerju 1:1 (v:v). Zmešali smo *A. tumefaciens* z $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,7$ in spore s koncentracijo 10^8 spor/ml ter *A. tumefaciens* z $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,7$ in spore s koncentracijo 10^7 spor/ml. Na trda IMAS gojišča [1X raztopina soli, 10 % (w/v) glukoze, 20 % (v/v) glicerola in 20 g/l agarja; po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 55°C in dodali 40 ml 1 M MES ter 1 ml 200 mM acetosiringona] smo položili avtoklavirane celofanske membrane [membrane krožne oblike v velikosti petrijevke smo predhodno izrezali, jih sprali v bidestilirani vodi, nato namočili v 1 mM EDTA ter vreli 10 minut, zelo dobro sprali, nato pa avtoklavirali]. Nato smo na membrane nanesli 100 in 200 μl suspenzije bakterijskih celic in glivnih spor ter s sterilno stekleno pasteurjevo pipeto razmazali po površini membrane. Petrijevke smo zaprli in oblepili s parafinskim filmom (Parafilm®M; Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, ZDA) ter inkubirali v temi pri sobni temperaturi za 72 ur. Po inkubaciji smo membrane sterilno prestavili na trdo $\frac{1}{2}$ CD primarno selekcijsko gojišče, kateremu sta bila dodana selekcijska antibiotika 150 mg/l timentina (selekcija na bakterije *A. tumefaciens*) in 75 mg/l higromicina B (selekcija za

netransformirane kolonije glive). Petrijevke smo inkubirali od 5 do 7 dni pri sobni temperaturi in v temi. Po inkubaciji smo membrane prestavili na trdo $\frac{1}{2}$ CD sekundarno selekcijsko gojišče ter ponovno inkubirali od 5 do 7 dni pri sobni temperaturi in v temi.

Nato smo posamezne kolonije, ki so se pojavile na selekcijskem gojišču, precepili na trdo $\frac{1}{2}$ CD tercijarno selekcijsko gojišče, ki je bilo vrito v 25-kvadratne petrijevke (Thermo Scientific). S sterilnim zobotrebcem smo postrgali delček micelija iz kolonije transformanta in ga prestavili v kvadratki. Vsakega transformanta smo prestavili v svoj kvadratki ter tako pridobili transformante, ki so bili kandidati za transformante z izbitim tarčnim genom. Po 7-dnevni inkubaciji, ko so se kolonije razrasle čez razpoložljiv prostor v kvadratkih, smo za namene izolacije glivne DNA s sterilnim zobotrebcem postrgali delček micelija s posamezne kolonije transformanta in ga v obliki mreže precepili na sveže $\frac{1}{2}$ CD gojišče v 90 mm petrijevki. Petrijevke smo inkubirali od 7 do 10 dni pri sobni temperaturi in v temi, dokler gojišče ni bilo enakomerno prekrito z glivnim micelijem.

3.6.4 Preverjanje transformantov s PCR metodo

3.6.4.1 Izolacija glivne DNA za namene PCR testiranja

DNA iz transformantov smo izolirali po »Modificirani Arabidopsis genomske DNA metodi« (Koste, 2012). Na 7 – 10 dni stara gojišča, ki so bila prerasla z micelijem transformantov, smo dodali po 5 ml vode in spore z ukrivljeno stekleno pasteurjevo pipeto poželi. Suspenzijo spor smo prenesli v 50 ml centrifugirke ter centrifugirali 10 min pri 4 °C in 4000 obr/min. Supernatant smo odlili iz centrifugirke ter pri tem pazili, da nismo izgubili peleta. V centrifugirke smo dodali 5 ml sveže vode in pelet resuspendirali ter ponovili korak centrifugiranja in odlivanja supernatanta. Nato smo s pipeto z odrezano konico dodali 800 µl svežega DNA ekstracijskega pufra [sestavljen iz DNA pufra, lizacijskega pufra in Sarkosyl (10 % w/v) raztopine v razmerju 2,5:2,5:1; DNA pufer (0,35 M Sorbitol; 0,1 M Tris-base, 5 mM EDTA); pH = 7,5; lizacijski pufer (0,2 M Tris; 0,05 M EDTA; 2 M NaCl; 2 % CTAB)] in 32 µl ProteinazeK encima (Sigma-Aldrich) (založna koncentracija 20 mg/ml), pelete resuspendirali s pipetiranjem ter jih prenesli v nove 2 ml mikrocentrifugirke z vijačnimi pokrovčki, v katere smo pred tem dodali 1,0 g steklenih kroglic (Sigma-Aldrich), premera 0,5 mm. Sledila je homogenizacija 60 s v stresalniku Mini-Beadbeater™ (BioSpec products) pri hitrosti 30 Hz ter inkubacija mikrocentrifugirke v vodni kopeli pri 65 °C za eno uro. Med inkubacijo smo vzorce z obračanjem mikrocentrifugirke premešali na 10 do 20 min. Nato smo v vzorce dodali 10 µl encima RNaseA (Sigma-Aldrich) (založna koncentracija 10 mg/ml) ter inkubirali pri 37 °C vsaj 20 min. Nato smo dodali $\frac{1}{2}$ volumna sveže pripravljene PCI raztopine (PCI je zmes fenola, kloroforma in izoamilalkohola v razmerju 25:24:1) ter močno mešali 5 min. Sledila je inkubacija 5 min na sobni temperaturi ter centrifugiranje 15 min pri 14.000 obr/min in sobni temperaturi. Supernatante smo prenesli v nove 2 ml mikrocentrifugirke in dodali $\frac{1}{2}$ volumna zmesi kloroforma in izoamilalkohola v razmerju 24:1 ter močno mešali vsaj 10 s. Nato smo centrifugirali 10 min pri 14.000 obr/min in sobni temperaturi. Nato smo supernatante prenesli v nove 1,5 ml mikrocentrifugirke ter dodali 1 volumen izopropanola, ogretega na sobno temperaturo. Mikrocentrifugirke smo nežno premešali z obračanjem in

pustili 5 min na sobni temperaturi. Nato smo jih centrifugirali 10 minut pri sobni temperaturi in 10.000 obr/min. Supernatant smo previdno odstranili, preostali pelet pa sprali v 70 % etanolu (Merck) pri sobni temperaturi. Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 10.000 obr/min in s pipeto previdno odstranili ves supernatant. Preostali pelet smo posušili pri sobni temperaturi (5 do 10 min) in ga raztopili v 50 µl raztopine TdE. Vzorce izolirane DNA transformantov smo shranili pri -20 °C.

3.6.4.2 Potrjevanje delecijskih mutantov s PCR testiranjem

Po transformaciji so se na selekcijskih gojiščih pojavile posamezne glivne kolonije. To so bile kolonije, ki so bile transformirane in so vsebovale gen *hph* iz knock-out plazmida, ki jim je omogočal preživetje kljub dodatku antibiotika higromicina B v gojišče. Vendar pa uspešna transformacija še ne pomeni tudi uspešne homologne rekombinacije in s tem izbitje tarčnega gena iz genoma glive, saj se lahko T-DNA iz Ti plazmida vgradi v glivni genom tudi naključno. Zato je potrebno preveriti, ali genom transformanta ne vsebuje več tarčnega gena. Ta test se naredi s PCR preverjanjem DNA iz posameznih transformantov z uporabo šestih različnih parov ZO, ki omogočajo razlikovanje med delecijskimi mutantmi in transformanti, ki še vedno vsebujejo tarčni gen. Pari ZO, ki se uporabljajo pri PCR testiranju DNA iz transformantov, so:

1. par ZO → pomnoževanje notranjega dela tarčnega gena,
2. par ZO → pomnoževanje desnega dela stičišča higromicinske kasete iz knock-out plazmida in glivnega genoma,
3. par ZO → pomnoževanje levega dela stičišča higromicinske kasete iz knock-out plazmida in glivnega genoma,
4. par ZO → pomnoževanje HRS1,
5. par ZO → pomnoževanje HRS2,
6. par ZO → pomnoževanje gena *hph* iz higromicinske kasete iz knock-out plazmida, ki se je vključila v glivni genom.

Prvi, drugi in tretji par ZO nedvoumno potrdijo prisotnost higromicinske kasete iz knock-out plazmida in odsotnost tarčnega gena v glivnem genomu. Četrти, peti in šesti par so kontrole, ki potrdijo odsotnost napak pri homologni rekombinaciji in uspešnost PCR reakcije.

S PCR smo testirali po 10 transformantov za posamezen tarčni gen. Za PCR reakcijo v volumnu 10 µl smo uporabili 10 ng izolirane glivne DNA. Reakcijske mešanice so vsebovale 1X Taq pufer (iz 10X založne raztopine; Fermentas), 1,5 mM MgCL₂, 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 500 nM začetnih nukleotidov in 0,25 U encima *Taq* Fermentas.

Pogoji PCR reakcije so bili:

- začetna denaturacija: 3 min pri 94 °C,
- 35 ciklov:
 - 30 s pri 94 °C,
 - 30 s pri 55 °C,
 - 1 min pri 72 °C,
- končna ekstenzija: 8 minut pri 72 °C,
- ohlajanje do 4 °C.

Ko smo s PCR reakcijo potrdili, kateri transformanti so tudi transformanti z izbitim tarčnim genom, smo se vrnili nazaj na terciarno selekcijsko gojišče (25-kvadratne petrijevke), kjer smo imeli vse kandidate transformante ter izbrane transformante z izbitim tarčnim genom s sterilnim zobotrebcem v obliki mreže precepili na sveže ½ CD gojišče v 90 mm petrijevki. Po 7-dnevni inkubaciji smo spore z ukrivljeno stekleno pasteurjevo pipeto sterilno poželi ter alikvote shranili v 30 % glicerolu na –80 °C.

3.7 UMETNO OKUŽEVANJE TESTNIH RASTLIN Z GLIVO *V. nonalfafae*

Ali ima izbitje tarčnega gena iz genoma transformanta vpliv na spremenjeno stopnjo njegove virulentnosti, se preveri z umetnim okuževanjem testnih rastlin. V testih okuževanja se poleg delecijskega mutanta uporabi tudi divji tip glive ter nato ocenjuje bolezenska znamenja, ki se razvijejo. Kot testno rastlino se lahko uporabi različne gostitelje, ki so dozvetni za okužbe s testiranim fitopatogenom. Primarni gostitelj *V. nonalfafae* je hmelj. Toda uporaba hmelja kot testne rastline za izvajanje testov umetnega okuževanja je težavna. Zato smo želeli pridobiti drugo gostiteljsko rastlino. V obsegu te naloge smo poleg primarnega gostitelja hmelja testirali še paradižnik, tobakovec *Nicotiana benthamiana*, jajčevec in riček.

3.7.1 Umetno okuževanje paradižnika in test reizolacije

Test okuževanja smo izvajali na sortah 'MoneyMaker' in 'Ailsa Craig'. Semena kultivarjev smo dobili kot dar od prof. Barta Thomma-e iz Univerze v Wageningenu (Nizozemska). Semena smo posejali v stiroporaste plošče s 40 luknjami, vsako seme v svojo luknjo. Sadike smo vzgajali v rastni komori z dnevno-nočnim ciklom 16 h/8 h in pri dnevno-nočni temperaturi 22/18 °C. 18 dni po sejanju smo izbrali sadike, ki so bile glede na videz čim bolj izenačene. Posamezno sadiko smo z zemljo vred vzeli iz luknje iz stiroporaste plošče ter zemljo okoli korenin previdno odstranili in pri tem pazili, da smo poškodovali čim manj korenin. Ostanek zemlje okoli korenin smo sprali s pomakanjem v destilirano vodo. Za umetno okuževanje smo pripravili suspenzijo spor izolata T2 glive *V. nonalfafae*, in sicer smo spore poželi iz 7 – 10 dni starega micelija, jih prešeli z uporabo števne komore ter redčili na koncentracijo 5×10^6 spor/ml. Suspenzijo konidijev smo prelili v plastično kadičko, kamor smo za 3 minute namočili korenine desetih sadik, ki smo

jim pred tem odstranili zemljo. Po namakanju smo posamezno sadiko prestavili v zemljo v cvetlični lonček, prostornine 0,9 litra. Kot kontrolo smo pod istimi pogoji namakali korenine desetih sadik samo v destilirano vodo ter sadike prav tako prestavili v zemljo v cvetlične lončke. Lončke z okuženimi sadikami smo inkubirali v rastni komori pod istimi pogoji, pod katerimi je potekala vzgoja sadik, ter spremljali razvoj bolezenskih znamenj. Na koncu spremeljanja razvoja bolezenskih znamenj smo rastline fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon D80 (Nikon Corporation, Tokyo, Japonska).

Po koncu spremeljanja razvoja bolezenskih znamenj smo izvedli test reizoalcije. Za površinsko sterilizacijo smo iz rastlin odrezali 10 cm stebla, ki smo jih namakali v 1,67 % raztopini dikloroizocianurne kisline natrijeve soli (DICA) (Sigma) z dodatkom 3 kapljic detergenta Tween® 20 (Sigma) za 5 min v sterilnih 250 ml erlenmajericah. Nato smo stebla 3x spirali v destilirani vodi, po 15 min. Nato smo s skalpelom prečno odrezali nekaj tankih kolobarjev in jih položili na ½ CD gojišče z dodatki različnih antibiotikov (100 mg/l kloramfenikola, 100 mg/l streptomicina in 100 mg/l neomicina). Po 10 do 14 dnevni inkubaciji na sobni temperaturi in v temi smo pregledali pojavljanje micelija glive na gojiščih reisolacije in gojišča fotografirali.

Že predhodno sta bila v laboratoriju prof. Barta Thomma-e na Univerzi v Wageningenu testirana slovenska patotipa PV1 (genotip PG2, izolat T2) in M (genotip PG1, izolat Rec) na sortah paradižnika 'MoneyMaker' in 'Motelle'. V poskusih sta bila poleg slovenskih patotipov kot kontroli uporabljena še dva patotipa glive *V. dahiae*, in sicer izolat JR2, ki spada v raso 2, ter izolat Vdls.17, ki spada v raso 1.

3.7.2 Umetno okuževanje tobakovca (*Nicotiana benthamiana*), jajčevca (*Solanum melongena*) in rička (*Camelina sativa*)

Za umetno okuževanje tobakovca smo uporabili vrsto *Nicotiana benthamiana*. Cvetlični lonček s površino 133 cm² smo napolnili z zemljo in semena tobakovca ali rička potrosili po površini ter rahlo zalili z vodo. Semena jajčevca smo sejali v stiroporaste škatle s 40 luknjami. Posejana semena smo inkubirali v rastni komori z dnevno-nočnim ciklom 16 h/8 h in pri dnevno-nočni temperaturi 24/18 °C. Sadike vseh treh vrst smo uporabili po 12 do 15 dneh od sajenja. Sadike smo okuževali z dvema različnima izolatom glive *V. nonalfalfa*, in sicer letalnim patotipom PV1 (genotip PG2, izolat T2) ter blagim patotipom M (genotip PG1, izolat Rec). Po pripravi suspenzije spor s koncentracijo 5 x 10⁶ spor/ml smo za okuževanje z letalnim izolatom izbrali 10 na videz izenačenih sadik, jih previdno odstranili iz rastnega lončka ter za 3 minute namočili v suspenzijo spor. Nato smo vsako sadiko prestavili v zemljo v nov cvetlični lonček. Isti postopek smo uporabili za okuževanje z blagim izolatom ter za kontrolno okuževanje, kjer smo namesto suspenzije konidijev uporabili destilirano vodo. Lončke z okuženimi sadikami smo inkubirali v rastni komori pod istimi pogoji, pod katerimi je potekala vzgoja sadik, ter spremljali razvoj bolezenskih znamenj. Na koncu spremeljanja razvoja bolezenskih znamenj smo rastline fotografirali.

Test reizoalcije pri tobakovcu je potekal na enak način kot pri paradižniku (poglavje 3.7.1). Za rastline jajčevca in rička testa reizoalcije nismo opravljali.

3.7.3 Umetno okuževanje hmelja, test konidiacije in test reizolacije

Primarni gostitelj *V. nonalfalfa*, ki je predmet te naloge, je bil izoliran iz hmelja (*Humulus lupulus*), saj je hmelj primarni gostitelj. Test umetnega okuževanja pa je potekal po naslednjem protokolu: inokulum mutantov in divjega tipa glive izolata T2 glive *V. nonalfalfa* smo pripravili s 6-dnevnim gojenjem kulture izolata v tekočem gojišču GFM (general fungal medium; Kayser, 1992) na rotacijskem stresalniku (50 obr./min) pri sobni temperaturi in v temi. Pred nadaljnjam delom smo ocenili konidiacijo pod svetlobnim mikroskopom z uporabo števne komore. Na podlagi primerjave konidiacije mutantov z divjim tipom smo določili oceno konidiacije. Nato smo spore s filtracijo ločili od biomase in v sterilni destilirani vodi redčili na koncentracijo 5×10^6 spor/ml inokuluma. V poskusih umetnega okuževanja smo uporabljali kultivar 'Celeia', ki je občutljiv kultivar za napade glive *V. nonalfalfa*. Rastline smo umetno okuževali v fenološki fazi BBCH 12. Za okuževanje s posameznim izolatom oz. mutantom smo uporabili od 10 do 15 rastlin. Z rastlinskih korenin smo najprej odstranili zemljo, jih sprali s sterilno destilirano vodo ter na ta način odstranili vso zemljo. Nato smo rastline okužili z 10 minutnim namakanjem korenin v suspenzijo glivnih spor pripravljene koncentracije. Kontrolne rastline smo inokulirali na enak način s sterilno bidestilirano vodo. Po inokulaciji smo rastline posadili v 1 lonce ter jih vzgajali na opori iz trstike pod 12-urno fotoperiodo fluorescentne svetlobe (L 58W/77; Fluora, Osram). V času osvetlitve je bila temperatura 22° C in relativna zračna vlažnost 65 %, v fazi teme je bila temperatura 20 °C in relativna zračna vlažnost 70 %. Ocenjevanje bolezenskih znamenj je potekalo od njihovega prvega pojava (običajno okoli 18 dni po okuževanju) do največ 55 dni po okuževanju. V razmaku okoli 7 dni se je za vsako okuženo rastlino določil bolezenski indeks DSI (angl. disease severity index) z ocenami 0 do 5 na podlagi lestvice za ocenjevanje pojava bolezenskih znamenj na listih (Radišek in sod., 2003); ocena 0 pomeni, da na listih rastlin ni opaziti bolezenskih znamenj; ocena 1 pomeni, da 1 do 20 % listne površine rastline kaže bolezenska znamenja venenja; ocena 2 pomeni, da 21 do 40 % listne površine rastline kaže bolezenska znamenja venenja; ocena 3 pomeni, da 41 do 60 % listne površine rastline kaže bolezenska znamenja venenja; ocena 4 pomeni, da 61 do 80 % listne površine rastline kaže bolezenska znamenja venenja; ocena 5 pomeni, da 81 do 100 % listne površine rastline kaže bolezenska znamenja venenja.

Po zadnjem ocenjevanju bolezenskih znamenj je sledil test reizolacije oz. potrditev prisotnosti glive v prevodnem tkivu. Tik nad zemljo smo odrezali 5 do 10 cm stebla okužene rastline. Od tu naprej je delo potekalo v sterilnih pogojih. Steblo smo površinsko sterilizirali z omočenjem v 96 % etanolu in kratkotrajnim pridržanjem (3 do 5 s) nad ognjem iz gorilnika. S skalpelom smo izrezali koščke prevodnega tkiva in jih položili na PDA gojišča, v katera je bil dodan streptomycin-sulfat (Sigma-Aldrich, Nemčija). Po 3 do 5 dnevnih inkubacij na sobni temperaturi je bilo mogoče na okuženih koščkih prevodnega tkiva opaziti rast belega glivnega micelija. Z uporabo svetlobnega mikroskopa smo nato na osnovi značilnih konidioforov določili prisotnost glive, ki smo jo uporabili za okuževanje.

Vrednosti DSI indeksa smo uporabili za izračun AUDPC vrednosti (area under the disease progress curve) po enačbi (1) iz objave od Campbell in Madden (1990):

$$\text{Enačba za izračun AUDPC} = \sum_i^{n-1} (y_i + y_{i+1})/2 \times (t_{i+1} - t_i) \dots (1)$$

Pri izračunu smo upoštevali:

- n = število ocenjevanj
- y = DSI indeks
- t = število dni od okuževanja

AUDPC vrednosti smo izrazili kot relativne AUDPC vrednosti (rAUDPC) z enačbo (2) (Simko and Piepho, 2012):

$$rAUDPC = \text{določena AUDPC vredost} / \text{najvišja potencialna AUDPC vredost} \dots (2)$$

Za izračun AUDPC vrednosti smo uporabili samo rastline, katerih okužbo smo potrdili s pozitivnim testom reisolacije. AUDPC vrednosti smo pretvorili v rAUDPC vrednosti (obseg vrednosti je 0 do 100 %) in jih uporabili za statistične izračune. Z Levene-ovim testom smo najprej preverili enakost varianc po skupinah (mutanti in kontrolna skupina).

Če se variance niso statistično značilno razlikovale, smo uporabili parametrični pristop analize variance in Dunnett-ov test, ki primerja vsako obravnavano skupino (mutanti) s kontrolno skupino (divji tip *V. nonalfalfa*, izolat T2): povprečne rAUDPC vrednosti posameznega mutanta se primerja s povprečno rAUDPC vrednostjo divjega tipa.

Če pa so se variance pri Levene-ovem testu statistično značilno razlikovale, smo uporabili neparametrični pristop statistične analize. S Kruskal-Wallis-ovim testom smo primerjali porazdelitve rangiranih vrednosti rAUDPC. Če smo ugotovili med skupinami statistično značilne razlike v porazdelitvah, smo z Dunn-ovim testom primerjali posamezen delecijski mutant na kontrolo (divji tip *V. nonalfalfa*, izolat T2): za primerjavo se uporabi povprečja rangiranih vrednosti.

3.8 EKSPRESIJSKI VZORCI GENOV *VnaPRX1.1277* IN *VnaSSP4.2*

3.8.1 Okuževanje in vzorčenje rastlin hmelja

Okuževanje neodporne sorte 'Celeia' je potekalo po istem postopku, kot je opisan v poglavju 3.7.3. 48 rastlin je bilo okuženih z izolatom T2 glive *V. nonalfalfa*, za kontrolno namakanje korenin rastlin v vodi je bilo uporabljenih 12 rastlin. Vzorčenje rastlin je potekalo 6., 12., 18. in 30. dan po okuževanju, in sicer je bilo naključno izbranih 9 okuženih in 3 kontrolne rastline na vzorčenje. Vzorčenje je potekalo tako, da smo v tekočem dušiku strli nadzemne dele rastline (steblo do višine 10 cm) ter jih zamrznili na -80°C do nadaljnje uporabe.

3.8.2 Izolacija celokupne RNA iz hmelja in prepis v cDNA

V tekočem dušiku strt rastlinski material (stebla) smo vzeli iz -80°C in 100 mg praha prestavili v nove mikrocentrifugirke. Celokupno RNA smo izolirali s kompletom SpectrumTM Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) po navodilih proizvajalca. Koncentracijo celokupne RNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoVue (GE Healthcare). Vzorce smo hranili na -80°C . Za prepis v cDNA smo uporabili 1 μg celokupne RNA in uporabili komplet High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) po navodilih proizvajalca.

3.8.3 Preverjanje ekspresije s kvantitativnim PCR v realnem času (RT-qPCR)

Za pripravo PCR reakcijske mešanice smo uporabili komplet FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, Basel, Švica). RT-qPCR reakcijo smo izvajali z uporabo SYBR Green tehnologije na napravi ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, ZDA). V končnem volumnu reakcije, ki je bil 10 μl , je bilo 5 μl fast SYBR Green RT-qPCR mešanice, 50 ng cDNA in 300 nM vsakega specifičnega ZO (ZO so navedeni v prilogi A). RT-qPCR reakcija je potekala pri naslednjih pogojih: začetna denaturacija pri 95°C je trajala 10 minut, sledilo je 40 ciklov izmenjevanja temperature in časa 95°C in 10 s ter 60°C in 30 s. Vse reakcije so potekale v treh tehničnih ponovitvah. Za normalizacijo smo uporabili referenčna gena za topoizomerazo in splicing faktor (ZO so navedeni v prilogi A). Rezultate smo analizirali s programskim paketom SDS 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems), pri čemer smo za izračun vrednosti ekspresije uporabili $\Delta\Delta\text{CT}$ metodo.

3.9 KOMPLEMENTACIJA GENOV *VnaPRX1.1277* IN *VnaSSP4.2*

Za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* smo naredili test komplementacije. V delecijskega mutanta, ki smo mu izbili tarčni gen, smo z gensko transformacijo zopet vnesli tarčni gen nazaj v genom. Razlika je v tem, da se tarčni gen pri komplementaciji v genom vgradi v naključno mesto in ne nazaj v isto mesto, kjer se je nahajal v divjem tipu glive.

3.9.1 Priprava komplementacijskega plazmida

Posebnost komplementacijskega plazmida je v tem, da mora vsebovati drug markerski gen kot pa knock-out plazmid, kar omogoča selekcijo komplementacijskih transformantov, ki so v procesu komplementacijske transformacije prestali drugo transformacijo in imajo na koncu v svoj genom vgrajena dva markerska gena. Komplementacijski plazmid ne vsebuje homolognih rekombinacijskih zaporedij okoli selekcijskega markerja, saj vgrajevanje tarčnega gena ni ciljano, ampak je naključno. Protokol priprave komplementacijskega plazmida pa je naslednji: najprej smo pripravili osnovni komplementacijski plazmid, poimenovan kHUEn, ki je primeren za uporabo komplementacijske transformacije za kateri koli izbrani gen v našem sistemu. Ogrodje kHUEn plazmida je predstavljal plazmid pRF-HUE (Frandsen in sod., 2008), ki je sestavljen tako, da vsebuje dodatni promotor *gpdA*, za katerim se nahaja leva UCS, ki omogoča usmerjeno kloniranje tarčnega gena na

mesto takoj za *gpdA* promotor. *GpdA* je promotor, ki se nahaja v *Aspergillus nidulans* in je močan promotor za gliceraldehid dehidrogenazo (Punt in sod., 1990). Iz plazmida pRF-HUE smo izrezali higromicinsko kaseto in jo nadomestili z zeomicinsko kaseto iz plazmida pBT081 (Houterman in sod., 2008). Tako smo pridobili osnovni komplementacijski plazmid kHUEn in v njega vstavili tarčni gen na mesto za promotorjem *gpdA*, kar je omogočilo visoko ekspresijo tarčnega gena, zeomicinska kaseta pa je zagotavljala komplementacijskim mutantom preživetje na selekcijskem gojišču z zeomicinom.

3.9.1.1 Pomnoževanje zeomicinske kasete iz plazmida pBT081 za pripravo osnovnega komplementacijskega plazmida kHUEn

Kot selekcijski marker smo izbrali gen za antibiotik zeomicin (gen *ble*), ki spada v bleomicinsko (angl. phleomycin) skupino antibiotikov. Zeomicinska kaseto se nahaja na plazmidu pBT081 (Houterman in sod., 2008). Plazmid pBT081 smo dobili kot dar od prof. Barta Thomma-e iz Univerze v Wageningenu (Nizozemska). Zeomicinsko kaseto smo pomnožili s paroma ZO ZEO_kasetaSpeI_for (ATCGAG**ACTAGT**CACAGGAAAC-AGCTATGACATGA) in ZEO_kasetaApaI_rev (ATCGAG**GGGCC**GGCTTGAGAG-TTCAAGGAAGAA). ZO ZEO_kasetaSpeI_for vsebuje na svoji 5' dodatno zaporedje za prepoznavo restriktijskega encima *SpeI* (v zaporedju ZO označeno krepko in rdeče). ZO ZEO_kasetaApaI_rev pa vsebuje na svoji 5' dodatno zaporedje za prepoznavo restriktijskega encima *ApaI* (v zaporedju ZO ozančeno krepko in rdeče). Prepoznavni mesti za *SpeI* in *ApaI* omogočata razrez z omenjenima restriktijskima encimoma in usmerjeno kloniranje v naslednjem koraku.

PCR pomnoževanje je potekalo v reakcijskem volumnu 25 µl. Za pomnoževanje smo uporabljali DNA polimerazo Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs, New England) skladno z navodili proizvajalca. Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala Q5® Reaction pufer (iz 5X založne raztopine; BioLabs, New England), 200 µM vsakega od štirih nukleotidov, 0,5 µM vsakega od obeh začetnih oligonukleotidov in 0,5 U Q5 encima.

Pomnoževanje v PCR smo izvedli z naslednjim programom:

- začetna denaturacija: 30 s pri 98 °C,
- 35 ciklov:
 - 10 s pri 98 °C,
 - 30 s pri 72 °C,
 - 75 s pri 72 °C,
- končna ekstenzija: 2 minuti pri 72 °C,
- ohlajanje do 4 °C.

Pristnost PCR produkta pravilne dolžine smo preverili z ločevanjem s horizontalno gelsko elektroforezo na 1,2 % agaroznem gelu. Nato smo PCR produkt s skalpelom izrezali iz gela in očistili s komercialnim kompletom »Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit« (GE Healthcare) po navodilih proizvajalca in raztoplili v 20 µl vode.

3.9.1.2 Restrikcija plazmida pRF-HUE

Ogrodje za komplementacijski plazmid smo vzeli od plazmida pRF-HUE. Gre za plazmid, ki je namenjen za uporabo v funkcijskih študijah prekomerne ekspresije in je prirejen za USER Friendly kloniranje (Frandsen in sod., 2008). Plazmid vsebuje selekcijsko kaseto s kanamicinom B (gen *hpt*) in močan konstitutivni promotor *gpdA*, za katerim se nahaja UCS zaporedje, ki omogoča usmerjno kloniranje tarčnega gena. Plazmid pRF-HUE smo razrezali z restriktijskima encimoma *SpeI* in *ApaI* (BioLabs, New England) v reakcijski mešanici, ki je vsebovala 2 µg plazmida pRF-HUE, 10 U *SpeI*, 10 U *ApaI* in 1X CutSmart pufer. Končni volumen reakcijske mešanice je bil 50 µg. Restrikcija je potekala 2 uri pri 25 °C. Po koncu inkubacije smo restriktijsko mešanico ločevali s horizontalno gelsko elektroforezo na 1,2 % agaroznem gelu. Ločila sta se dva fragmenta, in sicer higromicinska kasa (2451 bp) in ogrodje plazmida (6258 bp). Iz gela smo s skalpelom izrezali ogrodje plazmida (6258 bp) in ga očistili s komercialnim kompletom »Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit« (GE Healthcare) po navodilih proizvajalca.

3.9.1.3 Kloniranje kHUEn plazmida

Očiščen PCR produkt pomnoževanja zeomicinske kasete iz plazmida pBT081 smo najprej razrezali v 50 µl reakcijski mešanici z restriktijskima encimoma *SpeI* (10 U) in *ApaI* (10U) ter 1X CutSmart pufrom. Čas inkubacije je bil 1 uro pri 25 °C. Nato smo reakcijsko mešanico očistili s komercialnim kompletom »Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit« (GE Healthcare) po navodilih proizvajalca in raztopili v 10 µl vode. Za ligacijo smo za končni volumen 20 µl uporabili 3 µl očiščenega ogrodja plazmida pRF-HUE, 6 µl razrezanega in očiščenega PCR produkta zeomicinske kasete iz plazmida pBT081, 10 µl 2X Rapid Ligation Buffer in 1 µl T4 DNA ligaze (Promega, ZDA). Ligacijsko mešanico smo premešali s stresanjem in kratko centrifugirali, nato pa inkubirali čez noč pri 4 °C. Za transformacijo kompetentnih celic *E. coli* DH5-α smo uporabili celoten volumen ligacijske mešanice. Zrasle kolonije smo za prisotnost pravilno skloniranega plazmida testirali s PCR reakcijo na osnovi kolonije. Pri tem smo uporabili tri pare ZO, in sicer par plHUEsp1_for in plHUEsp1_rev, ki pomnožuje levi spoj med ogrodjem pRF-HUE plazmida in zeomicinsko kaseto; par plHUEsp2_for in plHUEsp2_rev, ki pomnožuje desni spoj med ogrodjem pRF-HUE plazmida in zeomicinsko kaseto; ter par gpdA_for in RF1_rev, ki pomnožuje konec *gpdA* promotorja vključno z levim UCS zaporedjem. Vsi ZO so navedeni v prilogi A. Kolonijo, ki je vsebovala pravilno skloniran plazmid, smo namnožili in iz nje izolirali plazmid. Na izoliranem plazmidu smo za namene potrditve ustrezno skloniranega plazmida opravili dodatno restrikcijo. K 400 ng plazmida smo dodali 10 U encima *EcoRV*, 10 U encima *NotI*, 1X pufer 3 (BioLabs, New England), 1x BSA (BioLabs, New England) in vode do končnega volumena 20 µl. Po enourni inkubaciji na 37 °C smo restriktijsko mešanico ločili z agarozno elektroforezo.

3.9.1.4 Priprava komplementacijskih plazmidov za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*

Gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* smo s specifičnimi ZO, ki omogočajo USER Friendly kloniranje v plazmid kHUEn, pomnožili iz genomske DNA divjega tipa T2 *V. nonalfalfa*e. Gen *VnaPRX1.1277* smo pomnoževali z ZO PRX1.1277_comp_for in PRX1.1277_comp_rev, gen *VnaSSP4.2* pa z ZO SSP4.2_comp_for in SSP4.2_comp_rev. Vsi ZO so navedeni v prilogi A. ZO za pomnoževanje obeh genov za namene komplementacije so bili zasnovani tako, da pomnožujejo celotno kodogeno regijo gena, ki je bila izbita z nekaj dodanimi robnimi nukleotidi. Protokol pomnoževanja je bil enak kot v poglavju 3.4.2, le da je bila temperatura prileganja ZO 62 °C. Uspešnost PCR reakcije smo preverili s horizontalno gelsko elektroforezo. PCR produktov pred nadaljnjim kloniranjem nismo čistili. Postopka restrikcije in čiščenja kHUEn plazmida sta bila enaka, kot sta opisana v poglavjih 3.4.3.3 in 3.4.3.4.

Reakcija USER Friendly kloniranja je poteka v volumnu 25 µl v sestavi:

- 15 µl PCR produkta (zaporedje gena *VnaPRX1.1277* ali *VnaSSP4.2*),
- 4 µl linealiziranega plazmida kHUEn,
- 2,5 µl CutSmart pufra (New England Biolabs),
- 1 µl USER mešanice encimov (založna raztopina 1000 U/ml; New England Biolabs),
- 2,5 µl vode.

Mešanico smo inkubirali 20 min pri 37 °C in nato 20 min pri 25 °C. Po inkubaciji smo celotno mešanico uporabili za transformacijo kompetentnih celic *E. coli* DH5-α. Transformacijo smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.4.3.1. Preverjanje *E. coli* kolonij je potekalo s PCR reakcijo na osnovi kolonije, kjer smo uporabili specifična ZO PRX1.1277_comp_for in RF1_rev za preverjanje vgradnje gena *VnaPRX1.1277* v plazmid kHUEn ter specifična ZO SSP4.2_comp_for in RF1_rev za preverjanje vgradnje gena *VnaSSP4.2* v plazmid kHUEn. Vsi ZO so navedeni v prilogi A. Izbira pravilno skloniranega plazmida in shranjevanje je potekalo po enakem postopku, kot je bil opisan v poglavju 3.4.5. Elektroporacija komplementacijskih plazmidov v *Agrobacterium tumefaciens* je potekala na enak način, kot je opisano v poglavju 3.5.

3.9.2 Komplementacijska transformacija in testiranje virulentnosti komplementacijskih mutantov na testnih rastlinah

Komplementacijska transformacija je potekala po protokolu iz poglavja 3.6 z naslednjimi spremembami:

- izvorna izolata za transformacijo sta bila delecijska mutanta Δ *VnaPRX1.1277* in Δ *VnaSSP4.2*,
- selekcijski antibiotik je bil zeomicin, v primarnem selekcijskem gojišču sta bila dodana selekcijska antibiotika 150 mg/l timentin (selekcija na bakterije *A. tumefaciens*) in 300 mg/l zeomicin (selekcija za komplementacijske mutante),
- PCR testiranje je potekalo z naslednjimi pari ZO:

1. par ZO → pomnoževanje notranjega dela tarčnega gena (isti par ZO kot pri preverjanju delecijskih mutantov),
2. par ZO → pomnoževanje notranjega dela *ble* gena iz zeomicinske kasete, ki se naključno vgradi v genom delecijskega mutanta v procesu komplementacijske transformacije,
3. par ZO → pomnoževanje gena *hph* iz higromicinske kasete iz delecijskega mutanta, ki je prisoten že od prve transformacije (isti par ZO kot pri preverjanju delecijskih mutantov).

Komplementacijske transformante smo v poskusu umetnega okuževanja testirali samo na hmelju. Postopki okuževanja, ocenjevanje bolezenskih znamenj, test reizolacije in izračun AUDPC vrednosti so potekali na enak način, kot je opisano v poglavju 3.7.3.

4 REZULTATI

4.1 IZBRANI KANDIDATNI GENI ZA FUNKCIJSKO ANALIZO

4.1.1 *In planta* določeni kandidatni geni

Fitopatogeni mikroorganizmi, ki živijo v vaskularnem tkivu gostitelja, izločajo v času okužbe različne molekule z namenom vplivati na gostiteljske obrambne odzive in uspešno kolonizirati gostitelja. Zato lahko v ksilemskem soku najdemo različne glivne proteine, ki so vpleteni v virulenco patogena in posredno ali neposredno povzročajo pojav bolezenskih znamenj na gostiteljski rastlini. V nalogi smo za funkcijsko analizo izbrali štiri kandidatne virulentne gene, ki so bili na proteomske ali transkriptomski način določeni *in planta* (preglednica 4).

Preglednica 4: Ime *in planta* gena, okrajšava imena, genski model in dolžina za izbrane gene.

Table 4: Names of genes and abbreviations, gene models and lengths of genes.

Gen	Okrajšava imena gena	Genski model* (oznaka)	Dolžina gena (bp)
lignin-peroksidaza VnaPRX1.1277	<i>VnaPRX1.1277</i>	chr1_1435YY.1277	1120
majhen sekretorni protein	<i>VnaSSP4.2</i>	chr4_116292YY.2	390
protein z domeno za vezavo hitina	<i>VnaCBD8.213</i>	chr8_117813YY.213	1200
ohranjen hipotetični protein	<i>VnaHYP07.546</i>	chr7_742YN.546	771

*oznaka genskega modela iz genomskega brskalnika JBrowse (www.vert.fri.uni-lj.si).

Protein VnaPRX1.1277 je bil določen kot peroksidaza VPL1 (Mandelc, 2010) na podlagi visoke homologije (92 % identičnost, 98 % pokritost) z raznoliko peroksidazo VPL1 iz *V. alfalfa*, izolat VaMs.102 (Klosterman in sod., 2011). Protein je sestavljen iz 354 aminokislinskih ostankov in vsebuje signalni peptid za izločanje iz celice. Aminokislinsko zaporedje proteina VnaPRX1.1277 smo analizirali z spletnim orodjem za klasifikacijo PeroxiScan (Fawal in sod., 2013), ki je na voljo na spletni strani podatkovne baze PeroxiBase. Protein je bil na podlagi analize strukture identificiran kot ne-živalska hem-vsebujoča lignin-peroksidaza tipa II. V to skupino spadajo encimi, ki modificirajo strukturo lignina. Encimi za svoje delovanje potrebujejo vodikov peroksid.

VnaSSP4.2 je majhen, bazičen protein z neznano funkcijo in velikostjo 14,1 kDa. Sestavlja ga 129 aminokislinskih ostankov. Edini homologni protein VDBG_05080 (95 % identičnost, 99 % pokritost) je bil najden v *V. alfalfa* (izolat VaMs.102) (Klosterman in sod., 2011). V *V. dahliae* se nahajata še dva podobna proteina, in sicer protein VDAG_10515 v izolatu VdLs.17 s 60-odstotno identičnostjo (96 % pokritost) (Klosterman in sod., 2011) in protein VDAG_JR2_chr3g00670 v izolatu JR2 z 68-odstotno identičnostjo (66 % pokritost) (de Jonge in sod., 2012). V ostalih glivnih genomih ni homolognih proteinov. VnaSSP4.2 vsebuje dva cisteinska ostanka, signalni peptid in ne vsebuje nobenih znanih proteinskih domen.

VnaCBD8.213 je na nukleotidnem nivoju visoko podoben (98 % identičnost) lektinskemu proteinu iz *V. alfalfa* VaMs.102 (Klosterman in sod., 2011). VnaCBD8.213 spada v družino ogljikohidratnih proteinov, ki vsebujejo proteinsko domeno ogljikohidratno-vezavni modul 18 oz. CBM18 (angl. Carbohydrate-Binding Module 18). Gen *VnaCBD8.213* ima povečano *in planta* ekspresijo v okuženem odpornem kot tudi neodpronem kultivarju hmelja (Cregeen in sod., 2015).

VnaHYPO7.546 je na nukleotidnem nivoju visoko podoben (96 % identičnost) proteinu iz *V. alfalfa* VaMs.102 (Klosterman in sod., 2011). Gre za ohranjen hipotetični protein, za katerega funkcija ni znana. Orodje Blast2go (Conesa in sod., 2005) predvidi za VnaHYPO7.546 tri funkcije, in sicer udeleženost v metabolizmu glutamina, transferazno aktivnosti in regulacijo transkripcije (Cregeen in sod., 2015).

4.1.2 *In silico* določeni kandidatni geni

In silico kandidatni virulentni geni so bili določeni s primerjavo genoma letalnega patotipa PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa* z genomom blagega patotipa M (genotip PG1). Določene so bile regije, ki se nahajajo samo v letalnem patotipu in nato na teh regijah predvideni genski modeli. Na podlagi kriterijev, ki so bili nivo izražanja RNA glive v ksilem posnemajočem gojišču, dolžina kandidatne regije, prisotnost signale domene za izločanje in število cisteinskih aminokislinskih ostankov, so bili genski modeli razvrščeni po vrstnem redu. Za funkcionalno analizo smo izbrali 12 kandidatnih genov (preglednica 5).

Z orodjem BLASTx smo pregledali kandidatne virulentne gene ter v bazi NCBI preverili podobne proteine in njihove morebitne znane proteinske domene.

Protein, kodiran z *Vna1gUN* genom, ima visoko homologen protein v *V. alfalfa* VaMs.102 (99 % pokritost, 99 % identičnost). Gre za hipotetični protein z oznako EEY24019 (model *VDBG_10129*), ki je sestavljen iz 323 aminokislin in ne vsebuje nobenih znanih proteinskih domen. *Vna1gUN* kaže še visoko homologijo s 611 aminokislin dolgim hipotetičnim proteinom z oznako BN1708_015964 (95 % pokritost, 99 % identičnost) iz *V. longisporum*, za katerega prav tako niso znane nobene ohranjene proteinske domene.

Vna2gUN.246 ima podoben protein v *V. longisporum*, kjer ima oznako BN1708_014749 (59 % pokritost, 94 % identičnost). Ta hipotetični protein sestavlja 785 aminokislin in vsebuje serin/treonin kinazno domeno. Podobnost z *Vna2gUN.246* kažeta še dva proteina (oba 60 % pokritost, 99 % identičnost), in sicer iz 330 aminokislin sestavljen hipotetični protein z oznako EGY23830 (model *VDAG_05268*) iz *V. dahliae* (izolat VdLs.17) in 330 aminokislin dolg predvideni protein z oznako EEY24038 (model *VDBG_10148*) iz *V. alfalfa* (izolat VaMs.102).

Preglednica 5: Genski model in mesto v genomu *V. nonalfafae*, okrajšava imena, dolžina regije, število cisteinskih ostankov in ekspresija za izbrane *in planta* regije.

Table 5: Gene models and genome position in *V. nonalfafae* genome, abbreviations of genes' names, length of the region, number of cistein residues and gene expression for selected *in planta* genes.

Genski model in mesto v genomu	Okrajšava imena	Dolžina regije (bp)	Število Cys ostankov	Ekspresija ¹
ni modela				
chr-unplaced 2023913-2022942	<i>Vna1gUN</i>	971	4	9726
chr-unplaced.246 892960-894563	<i>Vna2gUN.246</i>	1603	6	7027
chr4_116292YY.790 3425597-3423593	<i>Vna3g4.790</i>	2004	1	1961
chr-unplaced.245 882935-884137	<i>Vna4gUN.245</i>	1202	2	1917
ni modela				
chr9_120842YY 818857-819658	<i>Vna5g9</i>	801	13	1856
chr4_116292YY.792 3439232-3443498	<i>Vna6g4.792</i>	4266	2	1347
ni modela				
chr-unplaced 3438829-3439718	<i>Vna7gUN</i>	889	3	1286
chr-unplaced.246 890955-892959	<i>Vna8gUN.246</i>	2004	4	1207
chr-unplaced.496 2835067-2836330 1683930-1684161	<i>Vna9gUN.496</i>	1494	2	1066
chr4_116292YY.803 3506685-3510293	<i>Vna10g4.803²</i>	3608	8	113
chr4_116292YY.791 3432014-3434820	<i>Vna11g4.791³</i>	2806	9	167
chr-unplaced.279 1185586-1188392	<i>Vna12gUN.279³</i>	2806	0	7

¹Ekspresijski vzorci celotnega genoma *V. nonalfafae* v oknu 400 bp so bili pridobljeni iz BAM datoteke. Podatek, ki je bil na voljo, je bila pokritost regije ("coverage") v izbranem dolžinskem oknu. V primeru, da se pokritost ni spremenila v več oknih, je bila pokritost sešteva skupaj in podatek normaliziran na dolžino regije.

²Gen je bil izbran zaradi prisotnosti FluG domene.

³Gen je bil izbran na podlagi prisotnosti signalnega peptida.

Gen *Vna3g4.790* nima homolognih proteinov, podobnost (7 % pokritost, 92 % identičnost) kaže hipotetični protein z oznako EGY23433 (model *VDAG_04871*) iz *V. dahliae* (izolat VdLs.17), ki je sestavljen iz 215 aminokislin. Za hipotetični protein niso znane ohranjene proteinske domene.

Vna4gUN.245 ima večje število homolognih proteinov med drugimi vrstami gliv. Najbolj podobna sta dva (oba 91 % pokritost, 100 % identičnost). Prvi je hipotetični protein, označen z BN1708_014745 iz *V. longisporum*, dolžine 224 aminokislin in ne vsebuje ohranjenih proteinskih domen. Drugi je hipotetični protein iz *V. dahliae* (izolat VdLs.17) z oznako EEY24040 (model *VDBG_10150*) in dolžino 224 aminokislin. Tudi ta protein je brez ohranjenih proteinskih domen.

Na genomski regiji gena *Vna5g9* ni bil predviden noben genski model, toda regija kaže visoko ekspresijo. Podoben protein (23 % pokritost, 100 % identičnost) je hipotetični protein z oznako EGY23745 (model *VDAG_05183*) iz *V. dahliae* (izolat VdLs.17), dolžine 106 aminokislin, brez ohranjenih proteinskih domen.

Gen *Vna6g4.792* nima podobnih proteinov znotraj rodu *Verticillium*. Najbolj podobna (17 % pokritost, 91 % oz. 89 % identičnost) sta dva proteina iz *Ustilaginoidea virens*, in sicer hipotetični protein z oznako GAO20057, dolžine 255 aminokislin in bakterijsko serin/treonin kinazno domeno ter protein s kinazno domeno (oznaka KDB15999), ki je sestavljen iz 655 aminokislin.

Regija *Vna7gUN* ne vsebuje predvidenih genskih modelov. Podobna sta dva proteina (39 % pokritost, 97 % oz. 87 % identičnost), prvi je ohranjeni hipotetični protein z oznako EEY24022 (model *VDBG_10132*) iz *V. alfalfae* (izolat VaMs.102), dolžine 159 aminokislin, drugi pa hipotetični protein z oznako EGY23739 (model *VDAG_05177*), dolžine 161 aminokislin. Oba podobna proteina ne vsebujeta ohranjenih proteinskih domen.

Predvideni protein gena *Vna8gUN.246* ima najbližji podobni protein (52 % pokritost, 98 % identičnost) v *V. dahliae* VdLs.17, in sicer hipotetični protein z oznako EGY23829 (model *VDAG_05267*), sestavljen iz 345 aminokislin in brez ohranjenih proteinskih domen. Drugi podoben protein (51 % pokritost, 98 % identičnost) se nahaja v *V. longisporum*, hipotetični protein ima oznako BN1723_011987 in je dolg 341 aminokislin. Prav tako ne vsebuje ohranjenih proteinskih domen.

Gen *Vna9gUN.496* ima podoben protein v *V. dahliae* (izolat VdLs.17), z oznako EGY18171 (model *VDAG_08505*) in brez ohranjenih proteinskih domen, toda pokritost med proteinoma znaša 25 % (identičnost 99%). Hipotetičen protein je sestavljen iz 239 aminokislin.

Predvideni protein gena *Vna10g4.803* ima več podobnih proteinov v *F. oxysporum*. Najbolj podoben je hipotetični protein z oznako FOQG_16576 iz *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (92 % pokritost, 87 % identičnost), dolžine 813 aminokislin. Drugi podoben protein (92 % pokritost, 86 % identičnost) je hipotetični protein z oznako FOZG_18315 iz *F. oxysporum* seva Fo47, dolžine 813 aminokislin. Oba hipotetična proteina imata neznano funkcijo. Spadata v družino proteinov, ki vsebujejo pfam00589 domeno, zato bi lahko bila encima integrazi. *Vna10g4.803* je podoben tudi proteinu z oznako EJP61982 (66 % pokritost, 70 % identičnost) iz *Beauveria bassiana*, ki vsebuje FluG domeno in je sestavljen iz 793 aminokislin.

Tudi *Vna11g4.791* ima večino podobnih proteinov znotraj vrste *F. oxysporum*. Najbolj podobna (oba 94 % pokritost, 68 % identičnost) sta hipotetični protein z oznako FOMG_02270 iz *F. oxysporum* f. sp. *melonis* in hipotetični protein z oznako FOYG_05839 iz *F. oxysporum* sev FOSC 3-a, oba dolžine 1051 aminokislin in z več proteinskimi domenami (cd00204, pfam14479, cl21455 in pfam12796). Protein gena *Vna11g4.791* vsebuje signalni peptid za izločanje proteina iz celice.

Dolžina regije gena *Vna12gUN.279* je 2,8 kbp in vsebuje cel genski model chr-unplaced.279, ki kaže podobnost s fosfoetanolamin n-metiltransferazo 3. Predvideni protein modela chr-unplaced.279 na *Vna12gUN.279* regiji kaže podobnost s proteini iz številnih drugih glivnih vrst, najbolj na protein z oznako EGY23483 (model VDAG_04921) in dolžino 461 aminokislin iz *V. dahliae* VdLs.17 (51 % identičnost pri 15 % pokritosti proteina in celotne *Vna12gUN.279* regije). Gen *Vna12gUN.279* vsebuje signalni peptid za izločanje proteina iz celice.

4.2 KLONIRANJE KNOCK-OUT PLAZMIDOV

Skupno smo izbrali 16 kandidatnih genov za posamično izbjaganje iz genoma glive *V. nonalfafae* (izolat T2).

4.2.1 Pomnoževanje HRS zaporedij

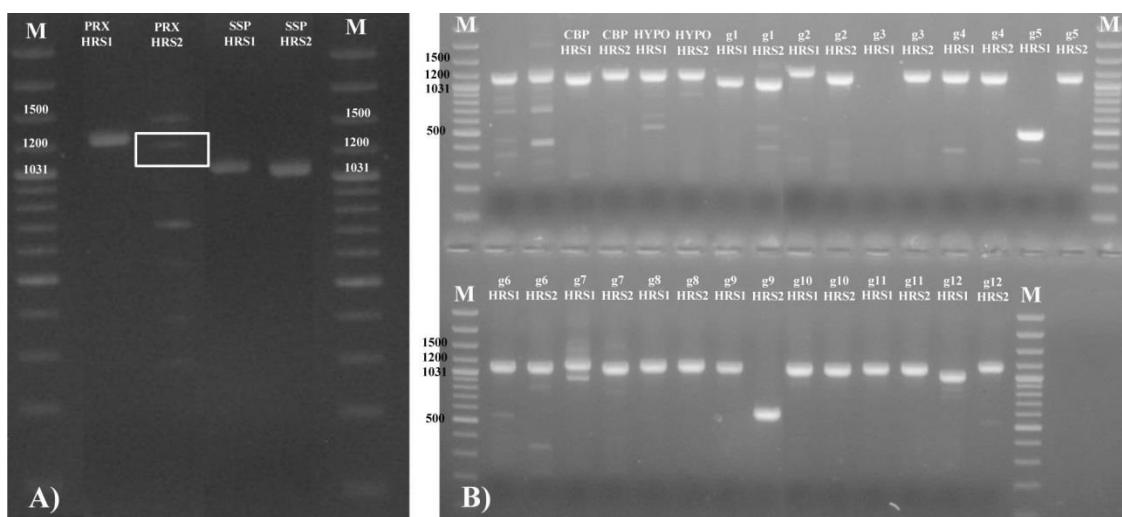
V PCR reakciji smo s specifičnimi ZO pomnoževali HRS1 in HRS2. Seznam kandidatnih genov in predvidene dolžine PCR amplikonov so navedene v preglednici 6. Vsi ZO so navedeni v prilogi A.

Preglednica 6: Dolžine HRS1 in HRS2 zaporedij za kandidatne virulentne gene.

Table 6: Sequence length of HRS1 and HRS2 for candidate virulence genes.

Gen	Dolžina HRS1	Dolžina HRS2
<i>VnaPRX1.1277</i>	1324	1216
<i>VnaSSP4.2</i>	1180	1138
<i>VnaCBD8.213</i>	1076	1137
<i>VnaHYPO7.546</i>	1113	1136
<i>Vna1gUN</i>	1018	1005
<i>Vna2gUN.246</i>	1102	1114
<i>Vna3g4.790</i>	1097	1142
<i>Vna4gUN.245</i>	1130	1108
<i>Vna5g9</i>	486	1092
<i>Vna6g4.792</i>	1074	1085
<i>Vna7gUN</i>	1121	1084
<i>Vna8gUN.246</i>	1120	1120
<i>Vna9gUN.496</i>	1084	581
<i>Vna10g4.803</i>	1076	1078
<i>Vna11g4.791</i>	1089	1101
<i>Vna12gUN.279</i>	994	1127

Pri PCR pomnoževanju smo pridobili vse amplikone za HRS1 in HRS2 predvidenih dolžin (slika 8). PCR pomnoževanje ni uspelo pri HRS1 za gen *Vna3g4.790*, zato z USER kloniranjem knock-out plazmida za ta gen nismo nadaljevali.



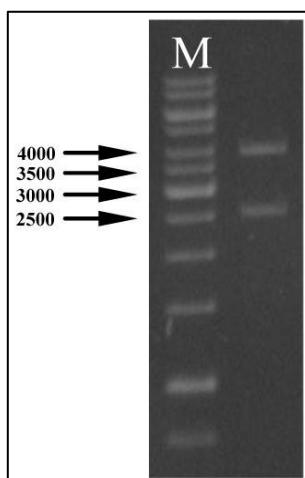
Slika 8: PCR pomnoževanje HRS1 in HRS2 iz genoma izolata T2 glive *V. nonalfalfa* za kandidatne virulentne gene. **A)** Gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*; **B)** geni *VnaCBD8.213*, *VnaHYPO7.546*, *VnaIgUN*, *Vna2gUN.246*, *Vna3g4.790*, *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna7gUN*, *Vna8gUN.246*, *Vna9gUN.496*, *Vna10g4.803*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279*.

Figure 8: PCR amplification of HRS1 and HRS2 from *V. nonalfalfa* T2 isolate genome. **A)** Genes *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2*; **B)** genes *VnaCBD8.213*, *VnaHYPO7.546*, *VnaIgUN*, *Vna2gUN.246*, *Vna3g4.790*, *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna7gUN*, *Vna8gUN.246*, *Vna9gUN.496*, *Vna10g4.803*, *Vna11g4.791* and *Vna12gUN.279*.

V nekaterih pomnoževanjih smo na gelu opazili tudi nespecifične fragmente. Kljub temu smo za USER kloniranje uporabili direktno PCR reakcije HRS zaporedij in ne iz gela očiščenih specifičnih fragmentov. Nespecifični fragmenti pomenijo tveganje za nižjo učinkovitost USER kloniranja, vendar pa ne morejo onemogočiti pridobitve pravilno skloniranega knock-out plazmida.

4.2.2 Restrikcija plazmida pRF-HU2

10 µg plazmida pRF-HU2 smo razrezali z encimoma *PacI* in *Nt.BbvCI* ter na agaroznem gelu preverili uspešnost restrikcije plazmida (slika 9). Linearizacija plazmida je v celoti potekla, saj smo na gelu videli samo dva fragmenta pričakovanih dolžin. Nato smo restriktijsko mešanico očistili s komercialnim kompletom in jo uporabili za USER kloniranje. Mešanica USER kloniranja sestoji iz naslednjih segmentov: PCR produkt 1 (zaporedje HRS 1), PCR produkt 2 (zaporedje HRS 2), linealiziran plazmid pRF-HU2 in USER mešanica encimov (New England Biolabs) v končnem volumnu 25 µl. Celotno mešanico smo uporabili za transformacijo *E. coli*.



Slika 9: Razrezan plazmid pRF-HU2. Velikost plazmida pRF-HU2 je 6323 bp. Po razrezu z restriktijskima encimoma *PacI* in *Nt.BbvCI* nastaneta dva fragmenta, in sicer ogrodje plazmida (3834 bp – zgornji fragment) in higromicinska kaseta (2489 bp – spodnji fragment).

Figure 9: Digested plasmid pRF-HU2. Plasmid pRF-HU2 is 6323 bp long. After digestion with *PacI* and *Nt.BbvCI* restriction enzymes two fragments appear; the backbone of the plasmid is 3834 bp (upper DNA fragment) and hygromycin cassette is 2489 bp (bottom DNA fragment).

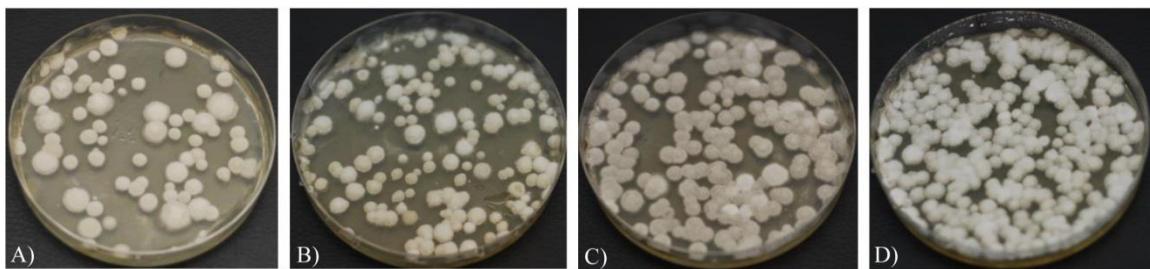
4.2.3 Preverjanje knock-out plazmida s PCR na osnovi kolonije

Na seleksijskem gojišču smo izbrali 5 do 10 kolonij *E. coli*, ki smo jih transformirali z mešanico USER kloniranja. Preverjanje smo naredili s PCR na osnovi kolonije. Preverili smo, katera kolonija vsebuje pravilno skloniran plazmid. V ta namen smo uporabili 4 pare specifičnih ZO. Po izolaciji plazmida smo ponovili PCR za vsak plazmid. Pri gelski elektroforezi PCR preverjanja smo videli prisotnost vseh predvidenih fragmentov iz preglednice 5. S tem smo potrdili uspešno kloniranje knock-out plazmidov. Dolžine predvidenih PCR fragmentov in slike gelske elektroforeze preverjanja knock-out plazmidov so prikazane v prilogi B.

Izolirane knock-out plazmide smo elektroporirali v bakterije *A. tumefaciens*. Po 3 do 5 dneh so se pojavile kolonije, ki smo jih testirali s PCR na osnovi kolonije. Naključno smo izbrali eno kolonijo s posameznim knock-out plazmidom, pri kateri smo potrdili prisotnost vseh štirih predvidenih fragmentov (priloga B). *A. tumefaciens* smo namnožili ter uporabili za gensko transformacijo izolata T2 glive *V. nonalfafae*.

4.3 PRIDOBIVANJE DELECIJSKIH MUTANTOV

Uspešnost genske transformacije je bila v povprečju 50 do 100 zraslih kolonij na 10^6 transformiranih spor (slika 10).



Slika 10: Transformatni *V. nonalfalfa* na selekcijskem gojišču. **A)** Transformanti za gen *VnaSSP4.2* na primarnem selekcijskem gojišču pri transformaciji 10^6 glivnih konidijev; **B)** transformanti za gen *VnaSSP4.2* na primarnem selekcijskem gojišču pri transformaciji 10^7 glivnih konidijev; **C)** transformanti za gen *VnaPRX1.1277* na primarnem selekcijskem gojišču pri transformaciji 10^6 glivnih konidijev; **D)** transformanti za gen *VnaPRX1.1277* na primarnem selekcijskem gojišču pri transformaciji 10^7 glivnih konidijev.

Figure 10: Transformation mutants of *V. nonalfalfa* on selection medium. **A)** Transformation mutants of candidate gene *VnaSSP4.2*, growth on primary selection medium from 10^6 conidia; **B)** transformation mutants of candidate gene *VnaSSP4.2*, growth on primary selection medium from 10^7 conidia; **C)** transformation mutants of candidate gene *VnaPRX1.1277*, growth on primary selection medium from 10^6 conidia; **D)** transformation mutants of candidate gene *VnaPRX1.1277*, growth on primary selection medium from 10^7 conidia.

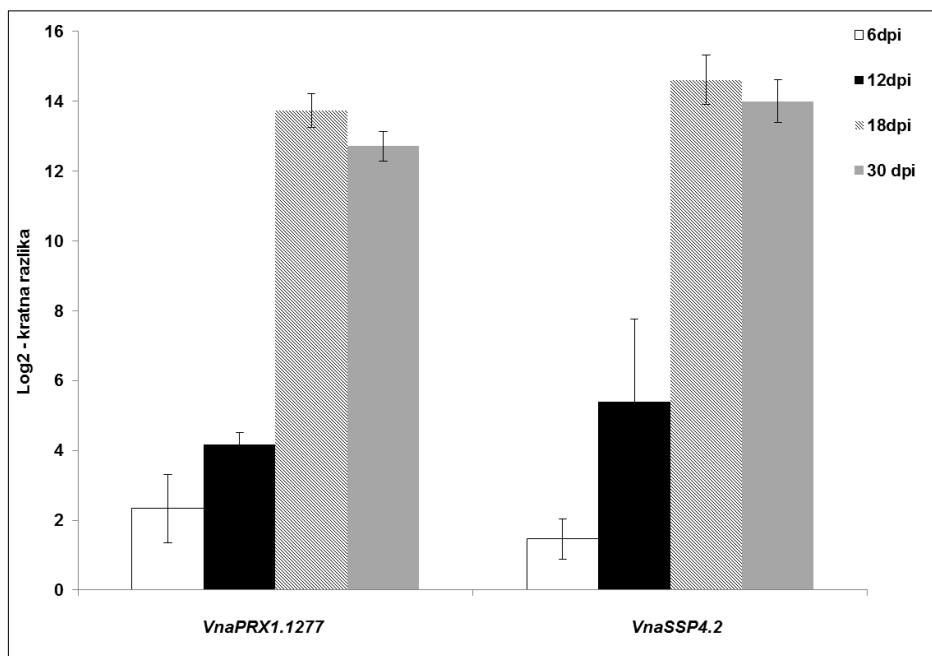
Po izolaciji DNA iz transformantov (uporabljen protokol je omogočal izolacijo do koncentracije 200 ng/ μ l) smo s PCR testiranjem iskali prave delecijske mutante. S kombinacijo šestih ZO smo potrdili prave delecijske mutante. Slike gelske elektroforeze s PCR fragmenti in predvidene dolžine PCR produktov za delecijske mutante so podane v prilogi C. Delecijske mutante smo uspešno pridobili za vse štiri *in planta* kandidatne gene (*VnaPRX1.1277*, *VnaSSP4.2*, *VnaCBD8.213* in *VnaHYPO7.546*) ter za 8 *in silico* kandidatnih genov (*Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna8gUN.246*, *Vna9gUN.496*, *Vna10g4.803*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279*).

Za gene *Vna1gUN*, *Vna2gUN.246* in *Vna7gUN* nismo pridobili delecijskih mutantov. Za gen *Vna1gUN* smo testirali skupno 115 transformantov, za gen *Vna2gUN.246* 62 transformantov in za gen *Vna7gUN* 36 transformantov. Za gen *Vna3g4.790* nam ni uspelo pridobiti že plazmida za izbijanje gena, zato tudi nismo pridobili delecijskih mutantov.

4.4 PREVERJANJE EKSPRESIJE GENOV *VnaPRX1.1277* IN *VnaSSP4.2* V DIVJEM TIPU *V. nonalfalfa* (IZOLAT T2)

Ekspresijo genov *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* s kvantitativnim PCR v realnem času (RT-qPCR) smo preverjali v nadzemnih delih občutljivega kultivarja 'Celeia', ki je bil okužen z divjim tipom glive *V. nonalfalfa*, izolat T2. Za preverjanje ekspresije smo izbrali tri okužene rastline (3 biološke ponovitve) in štiri časovne točke (6, 12, 18 in 30 dni po okuževanju). Za normalizacijo smo uporabili referenčna gena topoizomerazo in splicing faktor. Za izračun vrednosti ekspresije smo uporabili $\Delta\Delta CT$ metodo. Za oba gena je opaziti enak vzorec ekspresije, in sicer v točkah 6 in 12 dpi ekspresija obeh genov rahlo narašča; za gen *VnaPRX1.1277* naraste iz 2,3 na 4,1-kratno povečanje (na \log_2 pretvorbi višine izražanja), pri genu *VnaSSP4.2* pa se zgodi večji preskok, in sicer iz 1,5 na 5,4-kratno povečanje izražanja. V točki 18 dpi je ekspresija obeh genov najvišja; gen *VnaPRX1.1277* doseže 13,7-kratno in gen *VnaSSP4.2* 14,6-kratno povečanje na \log_2 skali. V zadnji točki

(30) dpi ekspresija obeh genov rahlo pade, vendar je še vedno bistveno višja kot v točkah 6 in 12 dpi (slika 11).

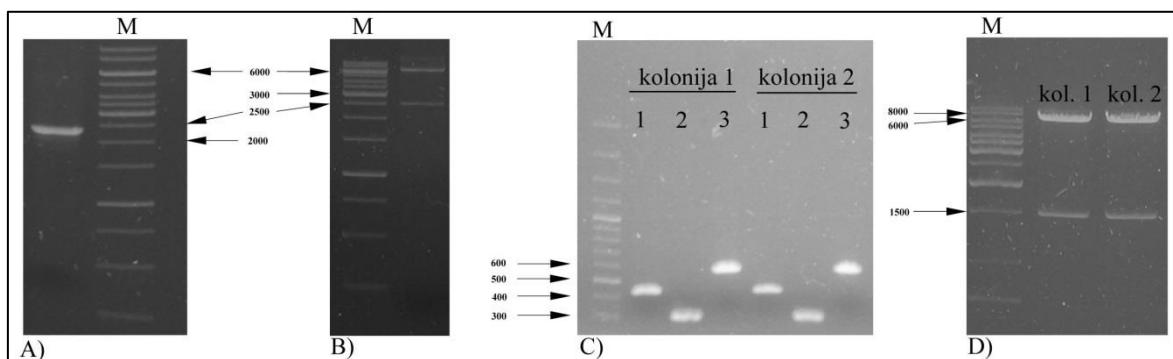


Slika 11: Izražanje genov *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*. Ekspresija genov *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* v nadzemnih delih okuženega neodpornega kultivarja 'Celeia' v točkah 6, 12, 18 in 30 dpi (dni po okuževanju).
Figure 11: Gene expression of *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2*. Expression levels of *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2* genes in shoots of infected susceptible hop plants measured at 6, 12, 18 and 30 days post inoculation (dpi).

4.5 TEST KOMPLEMENTACIJE

4.5.1 Kloniranje osnovnega komplementacijskega plazmida kHUEn

Z uporabo ZO ZEO_kasetaSpeI_for in ZEO_kasetaApaI_rev (priloga A) smo pomnožili 2356 bp dolgo zeomicinsko kaseto iz plazmida pBT081 (slika 12 A). Pri razrezu plazmida pRF-HUE z restriktijskima encimoma *SpeI* in *ApaI* sta se na gelu pojavila dva fragmenta, pričakovanih dolžin (slika 12 B). Po ligaciji zeomicinske kasete v razrezano in iz gela očiščeno ogrodje pRF-HUE plazmida je sledila transformacija *E. coli* z ligacijsko mešanicijo. Pojavili sta se dve *E. coli* koloniji. PCR testiranje na osnovi kolonije s specifičnimi ZO (priloga A) je potrdilo uspešno kloniranje zeomicinske kasete v ogrodje pRF-HUE plazmida in s tem pridobitev osnovnega komplementacijskega plazmida kHUEn (slika 12 C). Izolirali smo plazmida iz obeh kolonij in naredili dodatno restrikcijo, kjer sta se pojavila oba pričakovana fragmenta (slika 12 D) in potrdila uspešno kloniranje kHUEn plazmida.

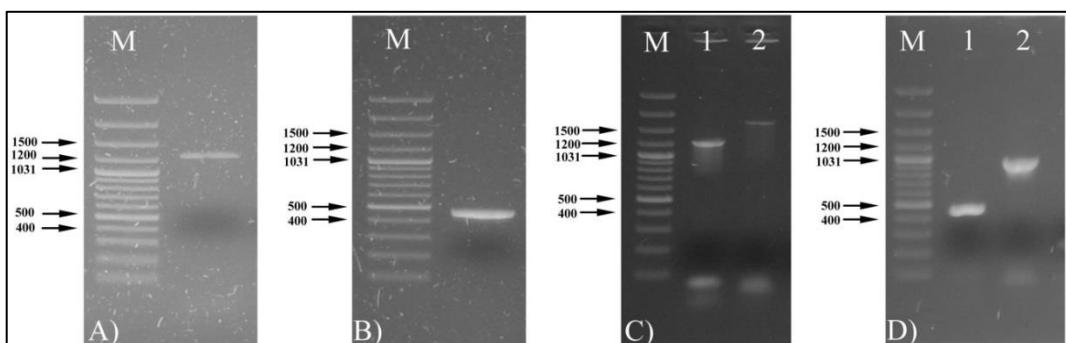


Slika 12: Kloniranje osnovnega komplementacijskega plazmida kHUEn. **A)** Pomnoževanje zeomicinske kasete iz plazmida pBT081 – dolžina 2356 bp; **B)** razrez plazmida pRF-HUE (8709 bp) z restikcijskima encimoma *SpeI* in *ApaI*, na gelu sta vidna dva fragmenta dolžine 6258 bp (zgornji fragment), ki predstavlja ogrodje plazmida, in 2451 bp (spodnji fragment), ki predstavlja izrezano higromicinsko kaseto; **C)** rezultat PCR testiranja na osnovi kolonije dveh *E. coli* kolonij, ki sta se pojavili po transformaciji z ligacijsko mešanico za plazmid kHUEn: 1 – fragment za levi spoj med ogrodjem pRF-HUE plazmida in zeomicinsko kaseto, dolžina 496 bp; 2 – fragment za desni spoj med ogrodjem pRF-HUE plazmida in zeomicinsko kaseto, dolžina 297 bp; 3 – fragment za konec *gpdA* promotorja vključno z levim UCS zaporedjem, dolžina 589 bp; **D)** dva fragmenta, ki sta nastala po dodatni restrikciji kHUEn plazmidov iz kolonij 1 in 2 z encimoma *EcoRV* in *NotI*, dolžin 7095 bp (zgornji fragment) in 1511 bp (spodnji fragment).

Figure 12: Cloning of complementation plasmid kHUEn. **A)** Amplification of zeomicin resistance cassette from the pBT081 plasmid – length 2356 bp; **B)** restriction of pRF-HUE plasmid (8709 bp) with restriction enzymes *SpeI* and *ApaI*, upper fragment (6258 bp) represents the backbone of the plasmid and bottom fragment (2451 bp) represents the hygromycin cassette; **C)** results of colony-PCR of two *E. coli* colonies, which appear after transformation with kHUEn ligation mixture: 1 – PCR fragment of left junction of backbone of pRF-HUE plasmid and zeomicin resistance cassette, length 297 bp; 2 - PCR fragment of right junction of backbone of pRF-HUE plasmid and zeomicin resistance cassette, length 589 bp; 3 - PCR fragment of *gpdA* promoter and left UCS sequence, length 589 bp; **D)** additional restriction of kHUEn plasmids formed colony 1 and colony 2 with *EcoRV* and *NotI* restriction enzymes resulted in of two fragments of 7095 bp (upper fragment) and 1511 bp (bottom fragment).

4.5.2 Kloniranje komplementacijskih plazmidov za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*

V PCR reakciji smo s specifičnimi ZO, ki omogočajo USER Friendly kloniranje, pomnožili gena celotnih kodogenih regij genov *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* (slika 13 A, B). Po USER kloniraju smo celotno mešanico (razrezan kHUEn plazmid in kodogena regija posameznega gena, volumen 25 µl) uporabili za transformacijo *E. coli*. Pojavilo se je veliko kolonij. Naključno smo izbrali 10 kolonij in naredili PCR test na osnovi kolonije z dvema paroma specifičnih ZO (PRX1.1277_comp_for in RF1_rev za preverjanje vgradnje gena *VnaPRX1.1277* v plazmid kHUEn ter specifična ZO SSP4.2_comp_for in RF1_rev za preverjanje vgradnje gena *VnaSSP4.2* v plazmid kHUEn) (slika 13 C, D). Za vsak plazmid smo izbrali po eno kolonijo, iz katere smo izolirali komplementacijski plazmid. Plazmid smo elektroporirali v bakterije *A. tumefaciens*. Ko so se po okoli štirih dneh pojavile kolonije, smo nekaj naključno izbranih kolonij testirali s PCR na osnovi kolonije. Izbrano kolonijo za posamezen plazmid, za katero smo ugotovili, da vsebuje nepoškodovan komplementacijski plazmid, smo namnožili ter uporabili za transformacijsko komplementacijo.



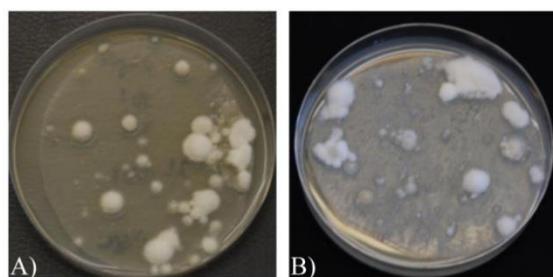
Slika 13: Kloniranje komplementacijskih plazmidov za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*. Pomnoževanje kodogenega zaporedja za namen USER Friendly kloniranja komplementacijskega plazmida **A**) za gen *VnaPRX1.1277*, dolžina 1186 bp in **B**) za gen *VnaSSP4.2*, dolžina 435 bp. PCR test na osnovi kolonije za izbrano *E. coli* kolonijo z dvema specifičnima ZO za komplementacijski plazmid **C**) za gen *VnaPRX1.1277*, 1 – 1186 bp in 2 – 1678 ter **D**) za gen *VnaSSP4.2*, 1 – 435 bp in 2 – 924 bp.

Figure 13: Cloning of complementation plasmids of *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2* genes. Amplification of gene region with USER Friendly specific primers for cloning of complementation plasmids of **A**) gene *VnaPRX1.1277*, length 1186 bp and **B**) gene *VnaSSP4.2*, length 435 bp. Colony-PCR test of one *E. coli* colony with two specific primers for verification of complementation plasmids of **C**) gene *VnaPRX1.1277*, 1 – 1186 bp and 2 – 1678 and **D**) gene *VnaSSP4.2*, 1 – 435 bp and 2 – 924 bp.

4.5.3 Komplementacijska transformacija delecijskih mutantov $\Delta VnaPRX1.1277$ in $\Delta VnaSSP4.2$ ter potrjevanje komplementacijskih mutantov

Za komplementacijsko transformacijo s komplementacijskim plazmidom za gen *VnaPRX1.1277* smo uporabili $\Delta VnaPRX1.1277$ delecijske mutante. Za komplementacijsko transformacijo s komplementacijskim plazmidom za gen *VnaSSP4.2* smo uporabili $\Delta VnaSSP4.2$ delecijske mutante.

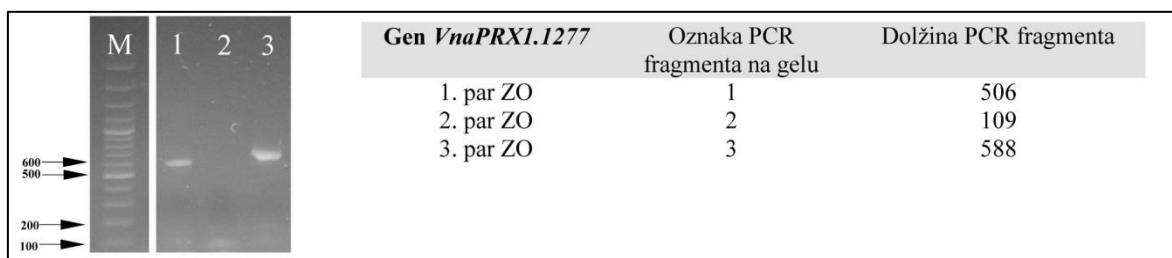
Uspešnost komplementacijske transformacije je bila zelo različna, lahko se je razlikovala tudi za več 100 kolonij med posameznimi obravnavanji. Povprečna ocena transformacije je nekaj 10 do nekaj 100 zraslih kolonij na 10^6 transformiranih spor (slika 14).



Slika 14: Komplementacijski transformanti za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*. **A)** Komplementacijski transformanti za delecijskega mutanta $\Delta VnaPRX1.1277$, ki so se pojavili na primarnem selekcijskem gojišču po 10 dneh pri transformaciji 10^5 glivnih konidijev; **B)** komplementacijski transformatni za delecijskega mutanta $\Delta VnaSSP4.2$, ki so se pojavili na primarnem selekcijskem gojišču po 10 dneh pri transformaciji 10^5 glivnih konidijev.

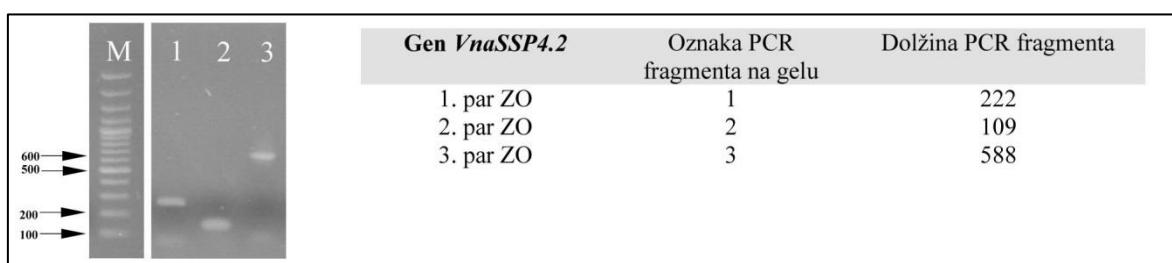
Figure 14: Complementation mutants of *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2* genes. **A)** Complementation mutants of knock-out $\Delta VnaPRX1.1277$ after 10 days on primary selection medium from 10^5 conidia used in transformation; **B)** complementation mutants of knock-out $\Delta VnaSSP4.2$ after 10 days on primary selection medium from 10^5 conidia used in transformation.

PCR testiranje komplementacijskih transformantov je potekalo z uporabo treh specifičnih ZO, s katerimi smo določili komplementacijske transformante (sliki 15 in 16). Pojavili so se PCR fragmenti pričakovanih dolžin, s čimer smo potrdili uspešnost naključne vgradnje komplementacijske kasete in s tem tarčnega gena v genom delecijskih mutantov.



Slika 15: PCR določanje komplementacijskega mutanta za gen *VnaPRX1.1277*.

Figure 15: PCR identification of complementation mutant of the gene *VnaPRX1.1277*.



Slika 16: PCR določanje komplementacijskega mutanta za gen *VnaSSP4.2*.

Figure 16: PCR identification of complementation mutant of the gene *VnaSSP4.2*.

4.6 TESTI UMETNEGA OKUŽEVANJA RASTLIN

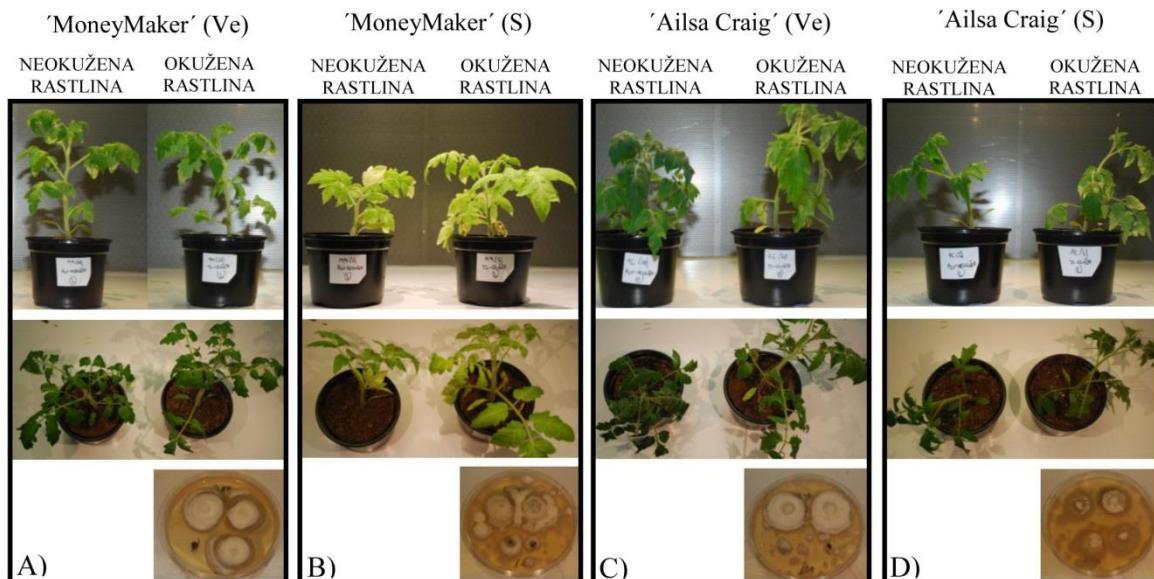
V nalogi smo za test umetnega okuževanja z glivo *V. nonalfalfa*e uporabili paradižnik, katerega smo okuževali samo z letalnim patotipom PV1 (genotip PG2), ter tobakovec *Nicotiana benthamiana*, jajčevec in riček, katere smo okuževali z letalnim patotipom PV1 in blagim patotipom M (genotip PG1) glive *V. nonalfalfa*e. Vse delecijske in komplementacijske mutante smo testirali z umetnim okuževanjem hmelja.

4.6.1 Test umetnega okuževanja paradižnika

Test umetnega okuževanja smo izvajali na sortah 'MoneyMaker' in 'Ailsa Craig'. Uporabili smo dve liniji za vsako sorto, in sicer odporno linijo, ki je vsebovala *Ve* gen za odpornost na verticilijsko uvelost (oznaka *Ve*), in neodporno linijo, ki gena ni vsebovala (oznaka *S*). Umetno okuževanje smo izvajali samo z divjim tipom izolata T2 glive *V. nonalfalfa*e, saj smo želeli najprej testirati dovzetnost obeh kultivarjev paradižnika na okužbo z izolatom T2 glive *V. nonalfalfa*e.

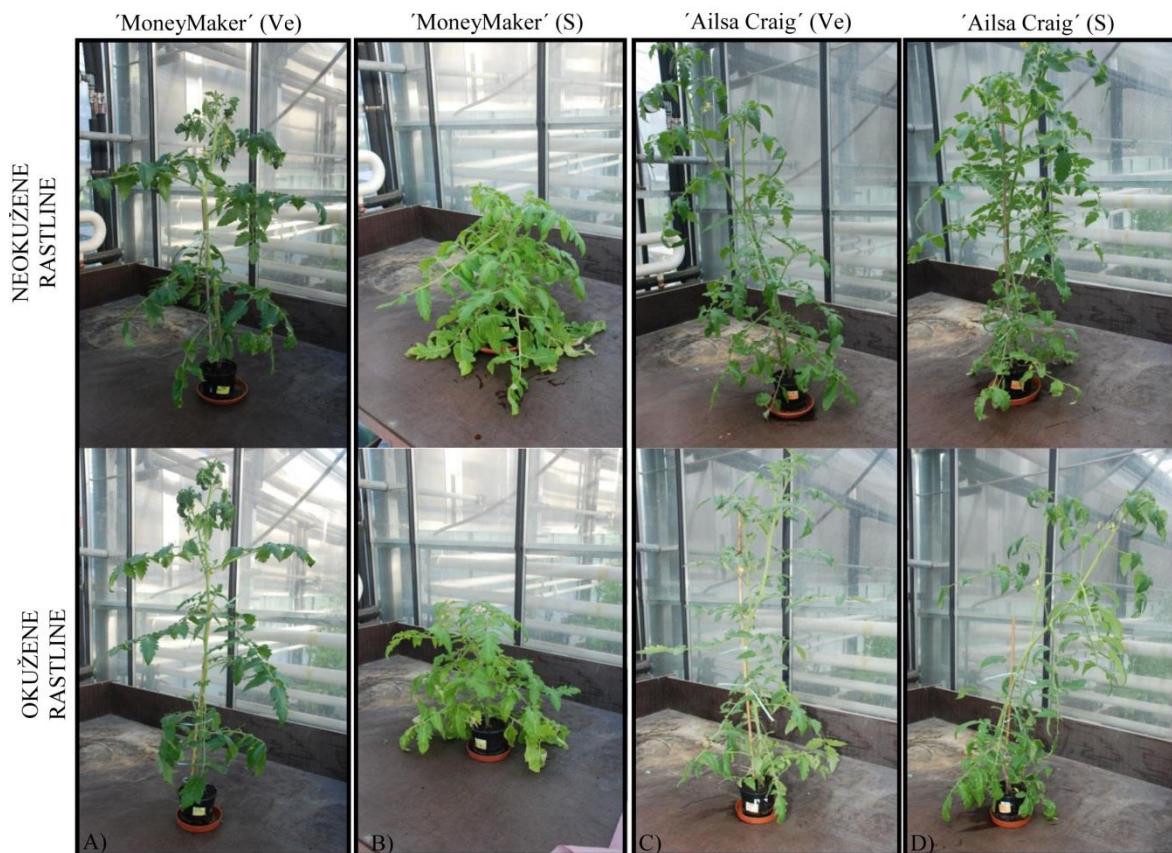
Izkazalo se je, da nobena sorta paradižnika ni občutljiva na izolat T2 glive *V. nonalfalfa*e (slika 17). Bolezenskih znamenj namreč na okuženih rastlinah ni bilo. V času 20 dni po

okuževanju smo opazili samo nekoliko zmanjšano rast nekaterih okuženih rastlin v primerjavi z neokuženimi rastlinami, značilnih simptomov venenja in rumenenja listov nismo opazili. V kasnejšem obdobju (54 dni po okuževanju) se okužene rastline niso razlikovale od neokuženih (slika 18). Rast je bila bujna in izenačena. Okuževali smo skupno 28 rastlin, od katerih smo s testom reizolacije potrdili okužbo pri desetih rastlinah. Nobena od rastlin ni izkazovala tipičnih simptomov okužbe.



Slika 17: Rezultati poskusa umetnega okuževanja paradižnika (20 dpi). Rastline dveh sort paradižnika 20 dni po okuževanju s T2 izolatom glive *V. nonalfalfa*e (okužene rastline). Neokužene rastline so bile ob okuževanju tretirane samo z destilirano vodo. Zgornja vrstica slik – pogled rastlin od sredaj; srednja vrstica slik – pogled rastlin od zgoraj; spodnja vrstica slik – rast glive (reizolacija) iz okuženih rastlin paradižnika po 18 dneh od reizolacije. **A)** Neokužena in okužena rastlina odporne sorte 'MoneyMaker'; **B)** neokužena in okužena rastlina neodporne sorte 'MoneyMaker'; **C)** neokužena in okužena rastlina odporne sorte 'Ailsa Craig'; **D)** neokužena in okužena rastlina neodporne sorte 'Ailsa Craig'.

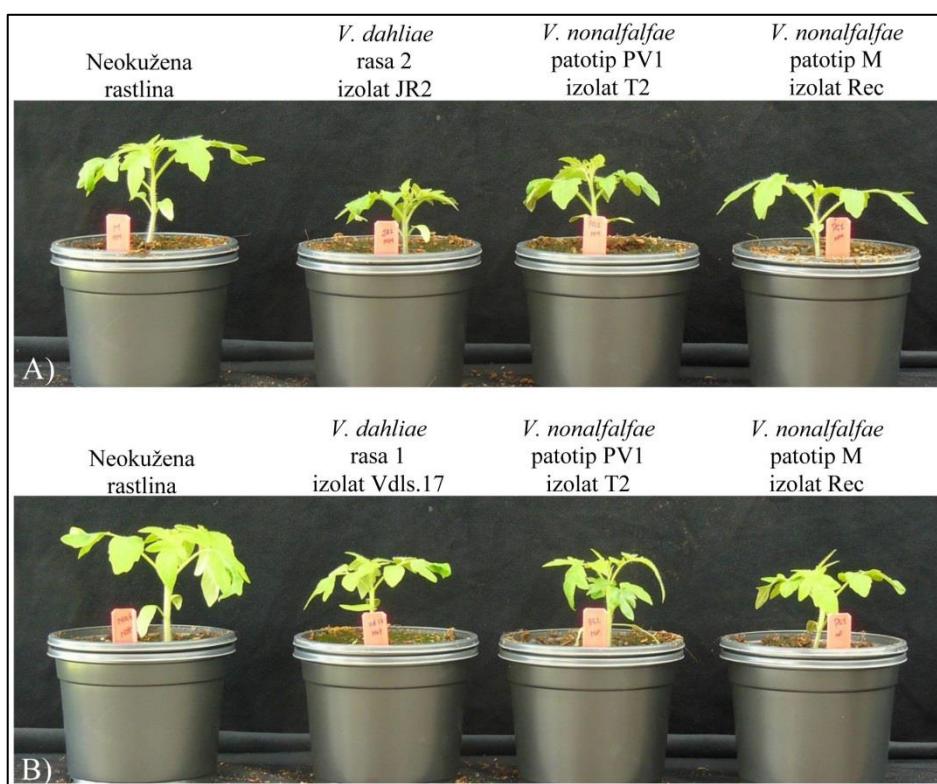
Figure 17: Results of artificial infection of tomato (20 dpi). Artificial infection of two cultivars of tomato with T2 isolate of fungus *V. nonalfalfa*e. Mock inoculated plants were treated with distilled water only. Top panel - side view of tomato plants; middle panel – top view of tomato plants; bottom panel – fungal outgrowth at 18 days after plating of stem sections harvested at 20 days postinoculation. **A)** mock inoculated and infected plants of resistant cultivar 'MoneyMaker'; **B)** mock inoculated and infected plants of susceptible cultivar 'MoneyMaker'; **C)** mock inoculated and infected plants of resistant cultivar 'Ailsa Craig'; **D)** mock inoculated and infected plants of susceptible cultivar 'Ailsa Craig'.



Slika 18: Rezultati poskusa umetnega okuževanja paradižnika (54 dpi). Rastline paradižnika 54 dni po okuževanju s T2 izolatom glive *V. nonalfalfa*e (spodnja vrstica) in neokužene rastline (zgornja vrstica); **A**) sorta 'MoneyMaker', odporna; **B**) sorta 'MoneyMaker', neodporna; **C**) sorta 'Ailsa Craig', odporna; **D**) sorta 'Ailsa Craig', neodporna.

Figure 18: Results of artificial infection of tomato (54 dpi). Tomato plant 54 days post inoculation infected with T2 isolate of fungus *V. nonalfalfa*e (top panel) and mock inoculated (bottom panel); **A**) resistant cultivar 'MoneyMaker'; **B**) susceptible cultivar 'MoneyMaker'; **C**) resistant cultivar 'Ailsa Craig'; **D**) susceptible cultivar 'Ailsa Craig'.

Pri testih umetnega okuževanja sort 'MoneyMaker' in 'Motelle' v s slovenskima patotipoma M in PV1 v laboratoriju prof. Barta Thomma-e na Univerzi v Wageningenu se je izkazalo, da oba patotipa povzročata milo obliko obolenja, ki jo na paradižniku povzroča tudi rasa 2 glive *V. dahliae*. Vseeno pa je bilo mogoče opaziti majhno razliko v simptomih na paradižniku tudi med patotipoma M in PV1, saj je patotip PV1 povzročal nekoliko bolj izrazite simptome obolenja, predvsem je bilo bolj opazno venenje rastline (slika 19).

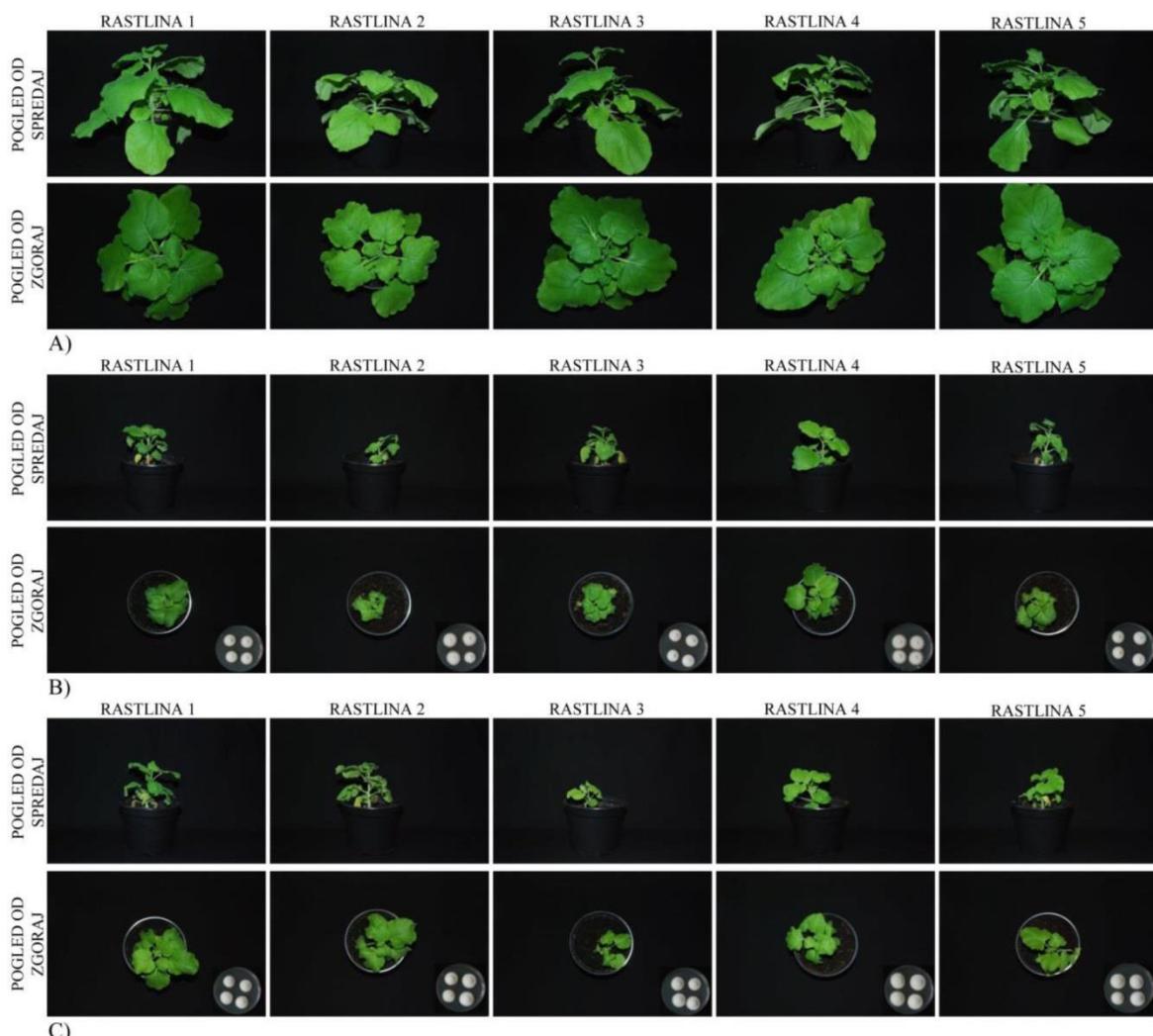


Slika 19: Rezultati okuževanja paradižnika na Nizozemskem. Rastline paradižnika 14 dni po okuževanju z dvema izolatoma glive *V. dahliae* (JR2 in Vdls.17) ter s slovenskima izolatoma *V. nonalfalfae* T2 (patotip PV1) in Rec (patotip M) ter neokužene rastline. A) Sorta 'MoneyMaker'; B) sorta 'Motelle'.
 Figure 19: Results of artificial infection of tomato in Netherlands. Tomato plants 14 dpi, infected with two isolates of *V. dahliae* (JR2 and Vdls.17) and two Slovenian *V. nonalfalfae* isolates T2 (pathotype PV1) and Rec (pathotype M) and mock inoculated plants. A) Variety 'MoneyMaker'; B) variety 'Motelle'.

4.6.2 Test umetnega okuževanja tobakovca, jajčevca in rička

Tobakovec *N. benthamiana*, jajčevci in riček smo okuževali z letalnim patotipom PV1 (izolat T2) ter blagim patotipom M (izolat Rec) glive *V. nonalfalfae*. Ko so bila bolezenska znamenja dobro vidna, smo rastline fotografirali. To je bilo 28 dni po okuževanju za tobakovec (slika 20), 21 dni po okuževanju za jajčevci (slika 21) in 41 dni po okuževanju za riček (slika 22). Bolezenska znamenja na okuženih rastlinah so bila različna, opazili pa smo predvsem zmanjšano rast rastlin, uvelost, zakrnelost in odmiranje listov. Pri tobakovcu in jajčevcu je bila pri okuženih rastlinah vidna uvelost celotne rastline, rastline so bile zaradi okužbe močno prizadete. Neokužene rastline so bile bujne, imele so velike in temno zelene liste. Okužba pri ričku je bila vidna predvsem kot venenje in odmiranje spodnjih listov, medtem ko okužba na višino rastlin ni vplivala. Rastline vseh treh rastlinskih vrst, ki so bile okužene z blagim izolatom M (izolat Rec), so izkazovale enako stopnjo bolezenskih znamenj kot rastline, ki so bile okužene z letalnim izolatom PV1 (izolat T2). Opazili smo venenje, rjavenje in rumenenje listov, zmanjšano rast in odmiranje rastlin. Skupno smo z letalnim izolatom PV1 (izolat T2) glive *V. nonalfalfae* okužili 166 rastlin tobakovca, od katerih smo v 128 rastlinah s testom reisolacije potrdili prisotnost glive. Z blagim izolatom M (izolat Rec) glive *V. nonalfalfae* smo okužili skupno 24 rastlin

tobakovca, od katerih je bilo 22 uspešno okuženih. Za jajčevcev in riček smo okužili po pet rastlin na obravnavanje. Zaradi pojava hudej simptomov na jajčevcu in ričku, reisolacije glive iz teh rastlin nismo izvajali, prav tako pa zaradi istega razloga okuževanj nismo ponavljali.



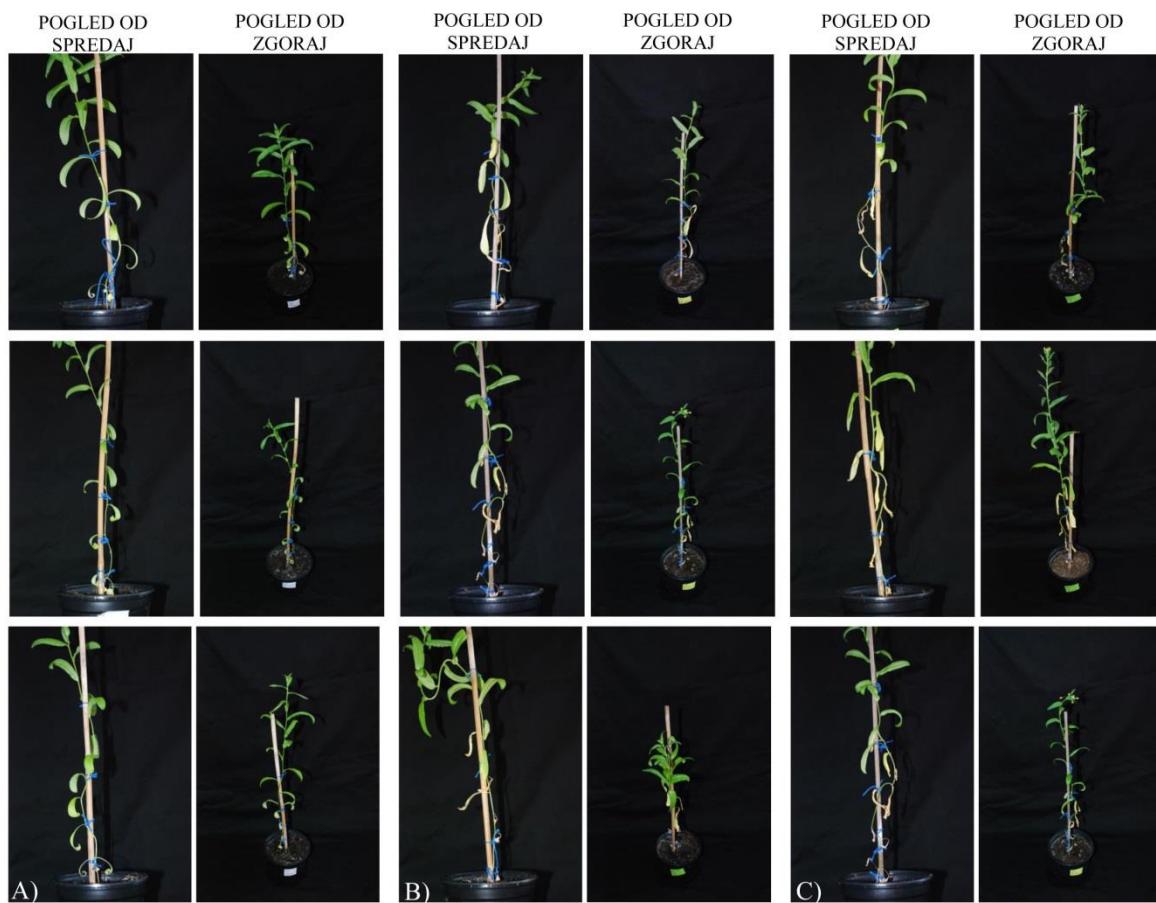
Slika 20: Rezultati poskusa umetnega okuževanja tobakovca. Prikazan je pogled od spredaj in pogled od zgoraj za pet rastlin na posamezno obravnavanje. Rastline so bile slikane 28 dni po okuževanju. **A)** Kontrola - neokužene rastline (rastline so bile pri umetnem okuževanju tretirane samo z destilirano vodo); **B)** rastline, okužene z letalnim izolatom PV1 (izolat T2) glive *V. nonalfalfa*, v spodnjem desnem kotu pogleda od zgoraj za posamezno rastlino je gojišče z reisolacijo po 14-dnevni inkubaciji od prestavitev koščkov stebel okuženih rastlin na gojišče; **C)** rastline, okužene z blagim patotipom M (izolat Rec) glive *V. nonalfalfa*, v spodnjem desnem kotu pogleda od zgoraj posamezne rastline se nahaja 14 dni staro gojišče z reisolacijo glive iz kolobarjev steba okuženih rastlin.

Figure 20: Results of artificial infection of tobacco. Side and top view of five plants, used in different pathogenicity essays at 28 days postinoculation. **A)** Control—mock inoculated plants; **B)** plants infected with lethal pathotype PV1 (isolate T2) of *V. nonalfalfa*, at the right bottom of the side view of each plant, the fungal outgrowth at 14 days after plating of stem sections is shown; **C)** plants infected with mild pathotype M (isolate Rec) of *V. nonalfalfa*, at the right bottom of the side view of each plant, the fungal outgrowth at 14 days after plating of stem sections is shown.



Slika 21: Rezultati poskusa umetnega okuževanja jajčevca. Pogleda od spredaj in od zgoraj na rastline jajčevca pri testu umetnega okuževanja z **A**) destilirano vodo (neokužene kontrole); **B**) letalnim patotipom PV1 glive *V. nonalfalfa* (izolat T2); **C**) blagim patotipom PV1 glive *V. nonalfalfa* (izolat Rec). Rastline so bile slikane 21 dni po okuževanju.

Figure 21: Results of artificial infection of eggplants. Side and top view of five eggplants 21 dpi, used in pathogenicity essay. **A)** Mock inoculated plants; **B)** plants, infected with lethal pathotype PV1 (isolate T2) of *V. nonalfalfa*; **C)** plants infected with mild pathotype M (isolate Rec) of *V. nonalfalfa*.



Slika 22: Rezultati poskusa umetnega okuževanja rička. Pogled od spredaj in od zgoraj na tri rastline rička na obravnavanje, slikano 41 dni po okuževanju. **A)** Neokužene rastline; **B)** rastline, okužene z letalnim patotipom PV1 glive *V. nonalfalfaе* (izolat T2); **C)** rastline, okužene z blagim patotipom M glive *V. nonalfalfaе* (izolat Rec).

Figure 22: Results of artificial infection of camelina. Side and top view of three camelina plant 41 dpi, used in pathogenicity assay. **A)** mock inoculated plants; **B)** plants, infected with lethal pathotype PV1 (isolate T2) of *V. nonalfalfaе*; **C)** plants infected with mild pathotype M (isolate Rec) of *V. nonalfalfaе*.

4.6.3 Test umetnega okuževanja hmelja

V testih umetnega okuževanja hmelja smo uporabili vse pridobljene delecijske mutante. To so bili delecijski mutanti za gene *VnaPRX1.1277*, *VnaSSP4.2*, *VnaCBD8.213*, *VnaHYPO7.546*, *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna8gUN.246*, *Vna9gUN.496*, *Vna10g4.803*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279*. Testirali smo tudi komplementacijska transformanta za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*. V vsakem poskusu smo uporabili dva neodvisna delecijska mutanta za isti tarčni gen, ki sta predstavljala biološki ponovitvi. Teste umetnega okuževanja rastlin hmelja smo izvajali na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu. Za okuževanje smo vedno uporabljali neodporno sorto 'Celeia'. Okuževali smo po 10 do 15 rastlin s posameznim izolatom oz. mutantom. Okuževanja smo izvajali od marca do septembra v letih 2013 do 2015. V vsakem posameznem poskusu smo kot kontroli uporabljali neokužene rastline (inokulacija s sterilno bidestilirano vodo) in divji tip glive *V. nonalfalfaе* (izolat T2). S tem smo

zagotovili primerljivost med poskusi, saj je bil vsak poskus samostojno izveden ter rezultatsko neodvisen in nepovezan z ostalimi poskusi.

4.6.3.1 Testiranje delecijskih in komplementacijskih mutantov za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*

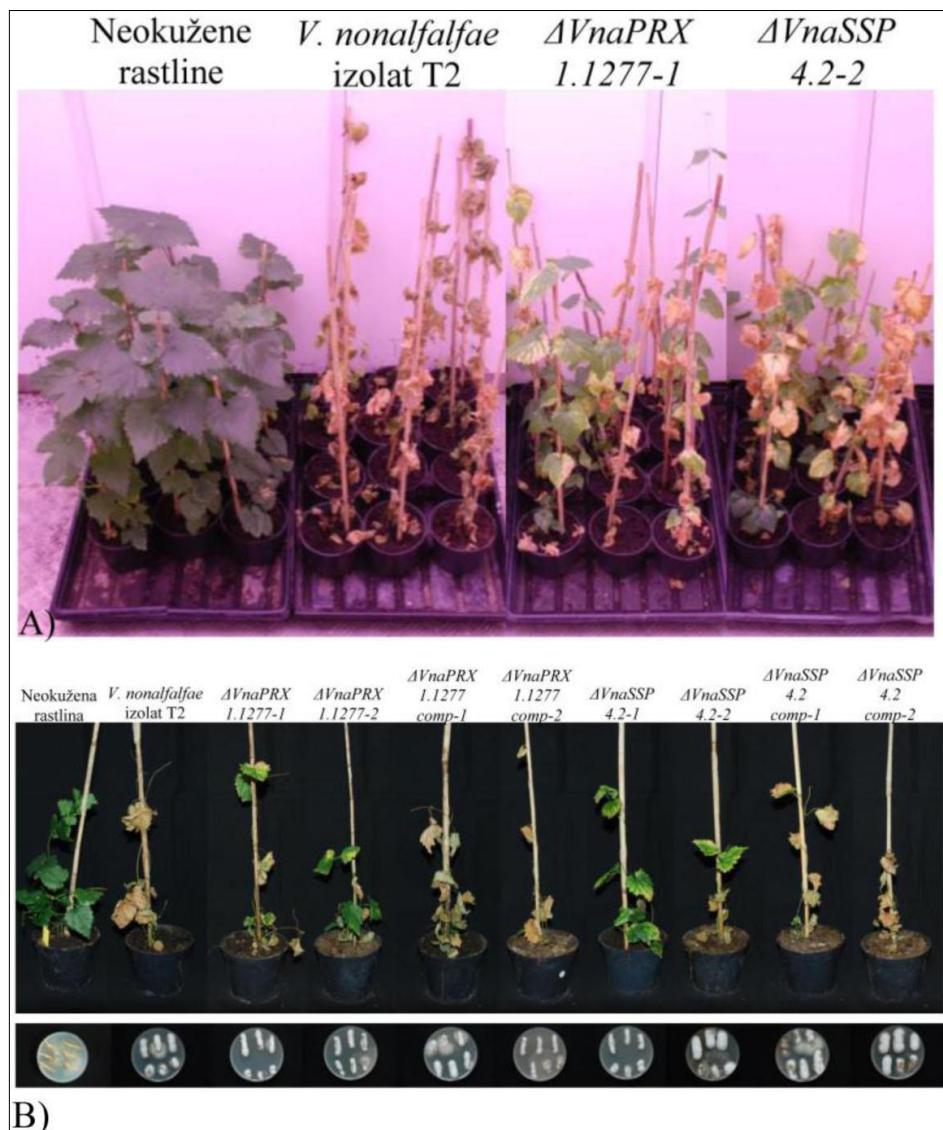
Delecijske mutante za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* smo testirali v dveh poskusih umetnega okuževanja hmelja. Aprila leta 2014 smo v preliminarnem testu testirali delecijska mutanta $\Delta VnaPRX1.1277\text{-}1$ in $\Delta VnaSSP4.2\text{-}2$. Okuževali smo po 12 rastlin za vsak *V. nonalfalfa* izolat. Septembra leta 2014 pa smo v ponovljenem poskusu testiranje omenjenih delecijskih mutantov ponovili ter dodali $\Delta VnaPRX1.1277\text{-}2$ in $\Delta VnaSSP4.2\text{-}1$ ter po dva pripadajoča komplementacijska mutanta ($\Delta VnaPRX1.1277comp\text{-}1$ in $\Delta VnaPRX1.1277comp\text{-}2$ ter $\Delta VnaSSP4.2comp\text{-}1$ in $\Delta VnaSSP4.2comp\text{-}2$). Okuževali smo po 12 rastlin za vsak *V. nonalfalfa* izolat. Sporulacija mutantov je bila v obeh poskusih v večini primerov manjša kot sporulacija divjega tipa. Toda to ni vplivalo na frekvenco okuževanj. Npr. mutanti $\Delta VnaPRX1.1277\text{-}2$, $\Delta VnaSSP4.2\text{-}2$ in $\Delta VnaSSP4.2comp\text{-}2$ so imeli vsi oceno sporulacije 2, uspešno pa so okužili 70, 80 in 100 % rastlin. Na drugi strani je imel mutant $\Delta VnaPRX1.1277$ oceno sporulacije 5, a je okužil samo 50 % rastlin (preglednica 7).

Preglednica 7: Ocena sporulacije, frekvence obolenja rastlin, bolezenski indeks DSI in rAUDPC vrednosti za dva poskusa okuževanja hmelja z delecijskimi in komplementacijskimi mutanti za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*.

Table 7: Conidiation, disease frequency, disease severity index DSI and rAUDPC values of two experiments of pathogenicity essay of knock-out and complementation mutants of *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2* genes.

<i>V. nonalfalfa</i> izolat	Ocena konidiacije (0-5)	Frekvenca obolenja rastlin (%)	Bolezenski indeks DSI (disease severity index)					rAUDPC (%)	
			15 dpi	25 dpi	32 dpi	39 dpi	46 dpi		
Okuževanje april 2014 - preliminarni poskus									
<i>V. nonalfalfa</i> , izolat T2	5	100	0,7	2,1	3,6	4,8	5,0	79,7	
$\Delta VnaPRX1.1277\text{-}1$	2	100	0,7	1,8	2,5	3,5	4,0	59,4	
$\Delta VnaSSP4.2\text{-}2$	3	100	0,3	0,8	1,9	3,0	3,9	48,6	
Okuževanje september 2014 - ponovljen poskus									
			18 dpi	24 dpi	31 dpi	38 dpi	45 dpi		
<i>V. nonalfalfa</i> , izolat T2	5	100	2,4	3,4	4,2	4,9	4,9	88,3	
$\Delta VnaPRX1.1277\text{-}1$	5	50	2,4	2,6	3,4	4,4	4,6	76,0	
$\Delta VnaPRX1.1277\text{-}2$	2	70	1,7	2,1	2,9	3,6	4,0	63,3	
$\Delta VnaPRX1.1277$ <i>comp</i> $\text{-}1$	4	70	2,1	3,1	3,7	4,7	5,0	83,3	
$\Delta VnaPRX1.1277$ <i>comp</i> $\text{-}2$	3	90	2,7	3,2	4,2	4,7	4,7	85,0	
$\Delta VnaSSP4.2\text{-}1$	5	60	1,5	2,2	3,0	3,5	4,3	75,8	
$\Delta VnaSSP4.2\text{-}2$	2	80	2,1	2,9	3,5	4,1	4,6	84,4	
$\Delta VnaSSP4.2comp\text{-}1$	3	90	2,6	3,2	4,1	4,6	4,8	87	
$\Delta VnaSSP4.2comp\text{-}2$	2	100	2,4	3,3	4,0	4,9	5,0	79,8	

Ocenjevanje bolezenskih znakov (DSI – angl. disease severity index) je potekalo z ocenami 0 do 5 na podlagi lestvice za ocenjevanje pojava bolezenskih znamenj na listih (Radišek in sod., 2003), izvajalo pa se je 15., 25., 32., 39. in 46. dan po okuževanju v poskusu april 2014 ter 18., 24., 31., 38. in 45. dan po okuževanju za poskus september 2014. Na zadnji dan vzorčenja rastlin smo opravili reizolacijo ter po treh do petih dneh opazovali rast glive iz okuženih stebel rastlin. Za izračun AUDPC vrednosti smo uporabili samo rastline, katerih okužbo smo potrdili s pozitivnim testom reizolacije. Delecijski mutanti so imeli znižano virulenco, komplementacijskima mutantoma pa se je virulanca povrnila na raven divjega tipa (slika 23 A, B).



Slika 23: Rezultati poskusa umetnega okuževanja hmelja z mutanti za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*.
Figure 23: Results of artificial infection of hop plants with *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2* mutants.

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Opis Slike 23: **A)** Okuževanje april 2014 (preliminarni poskus): Neokužene rastline hmelja in rastline, okužene z divjim tipom *V. nonalfalfa*e, izolat T2 ter delecijskima mutantoma $\Delta VnaPRX1.1277-1$ in $\Delta VnaSSP4.2-2$. Rastline so bile slikane 43 dni po okuževanju; **B)** okuževanje september 2014 (ponovljen poskus): Primerjava neokuženih posameznih rastlin hmelja in rastlin, okuženih z divjim tipom *V. nonalfalfa*e, izolat T2, dvema delecijskima mutantoma za gen *VnaPRX1.1277* ($\Delta VnaPRX1.1277-1$ in $\Delta VnaPRX1.1277-2$), dvema komplementacijskima mutantoma za gen *VnaPRX1.1277* ($\Delta VnaPRX1.1277comp-1$ in $\Delta VnaPRX1.1277comp-2$), dvema delecijskima mutantoma za gen *VnaSSP4.2* ($\Delta VnaSSP4.2-1$ in $\Delta VnaSSP4.2-2$) in dvema komplementacijskima mutantoma za gen *VnaSSP4.2* ($\Delta VnaSSP4.2comp-1$ in $\Delta VnaSSP4.2comp-2$) (zgornja vrstica). Rastline so bile slikane 31 dni po okuževanju. Spodnja vrstica slik prikazuje gojišča z rastjo glive po treh dneh od reizolacije.

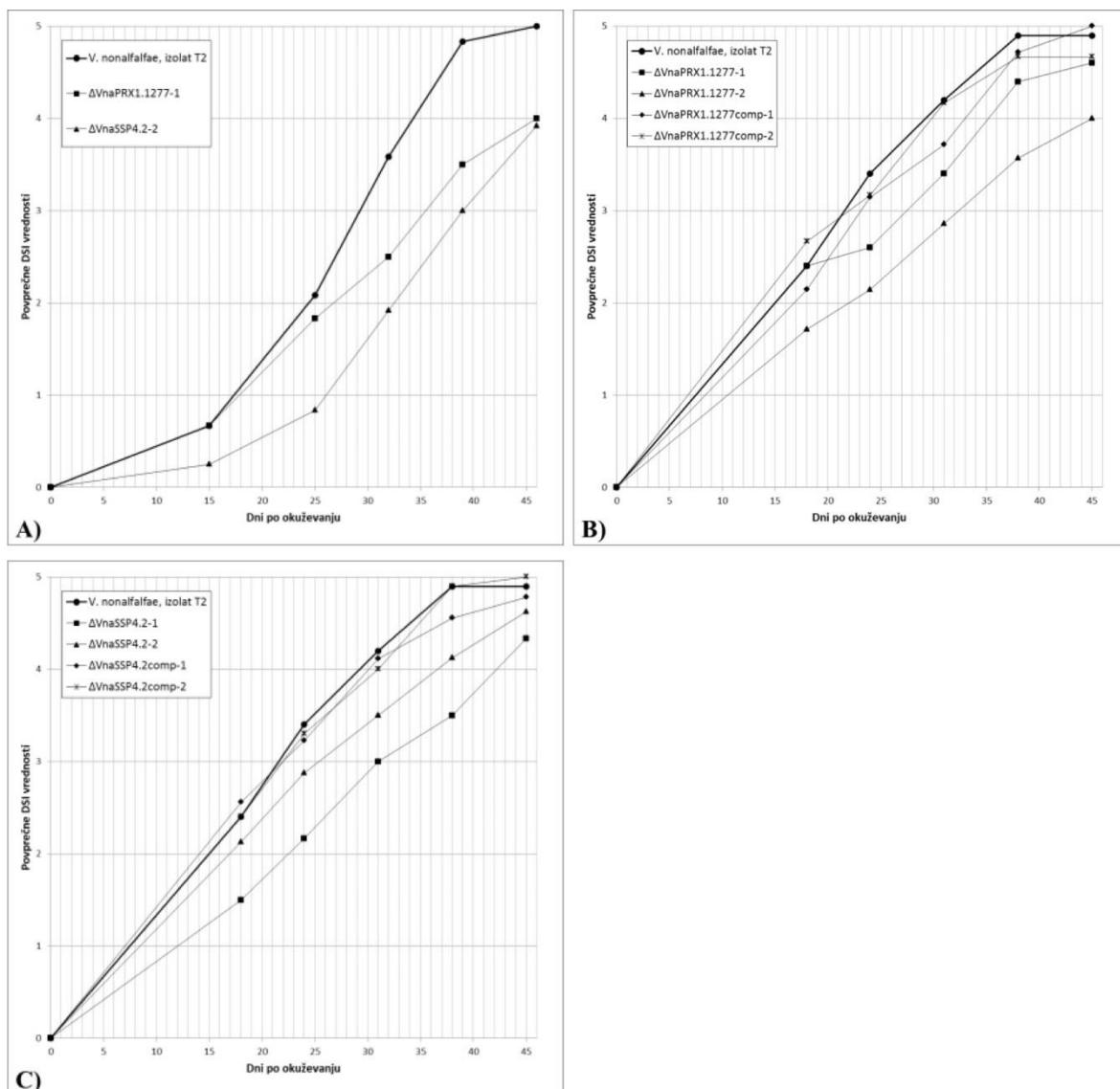
Description of Figure 23: **A)** Pathogenicity essay conducted in April 2014 (preliminary test): Mock inoculated plants and disease symptoms of hop plants inoculated with wild-type *V. nonalfalfa*e, isolate T2 and $\Delta VnaPRX1.1277-1$ and $\Delta VnaSSP4.2-2$ deletion strains. Plants were imaged 43 days after inoculation; **B)** pathogenicity essay of September 2014 (follow up experiment): Disease symptoms of hop plants inoculated with wild-type *V. nonalfalfa*e, isolate T2 two *VnaPRX1.1277* deletion strains ($\Delta VnaPRX1.1277-1$ and $\Delta VnaPRX1.1277-2$), two *VnaPRX1.1277* complementation strains ($\Delta VnaPRX1.1277comp-1$ in $\Delta VnaPRX1.1277comp-2$), two *VnaSSP4.2* deletion strains ($\Delta VnaSSP4.2-1$ in $\Delta VnaSSP4.2-2$) two *VnaSSP4.2* complementation strains ($\Delta VnaSSP4.2comp-1$ in $\Delta VnaSSP4.2comp-2$) compared with a mock inoculated asymptomatic plant (top panel). Plants were imaged 31 days after inoculation. Fungal outgrowth from xylem sections of infected hop plants 3 days after plating on agar plates (bottom panel).

Oba delecijska mutanta iz preliminarnega poskusa sta imela vse DSI vrednosti v vsaki točki opazovanja nižje od DSI vrednosti divjega tipa (slika 24 A), razen v točki 15 dpi je imel $\Delta VnaPRX1.1277-2$ DSI vrednost enako kot divji tip, v poznejših točkah opazovanja pa je krivulja bolj počasi naraščala. V zadnji točki opazovanja je divji tip dosegel največjo možno vrednost (5,0), medtem ko sta imela delecijska mutanta $\Delta VnaPRX1.1277-1$ in $\Delta VnaSSP4.2-2$ nižje vrednosti (4,0 in 3,9).

Vsi delecijski mutanti za gen *VnaPRX1.1277* so imeli v poskusu september 2014 DSI vrednosti nižje od divjega tipa v vsaki časovni točki, le mutant $\Delta VnaPRX1.1277-1$ je imel v točki 18 dpi enako DSI vrednost kot divji tip. Povprečne DSI vrednosti delecijskih mutantov za gen $\Delta VnaPRX1.1277$ so naraščale bolj počasi in v nobeni točki niso dosegle enakih vrednosti kot DSI za divji tip. Rastline okužene z divjim tipom so že v točki 31 dpi kazale hude simptome okužbe (DSI vrednost je bila 4,2) in so bile v naslednji časovni točki (38 dpi) že posušene, medtem ko so z delecijskimi mutanti okužene rastline šele v zadnji točki (45 dpi) kazale hude simptome okužbe. Prvi simptomi okužbe na rastlinah, okuženih s komplementacijskima mutantoma $\Delta VnaPRX1.1277comp-1$ in $\Delta VnaPRX1.1277comp-2$, so se pojavili istočasno kot pri divjem tipu (18 dpi) in krivulja DSI vrednosti je pri obeh komplementnih naraščala primerljivo s krivuljo divjega tipa (slika 24 B).

Poznejši pojav bolezenskih znamenj se je zgodil tudi pri okuževanju rastlin z delecijskima mutantoma $\Delta VnaSSP4.2-1$ in $\Delta VnaSSP4.2-2$. Venenje listov kot prvi znak okužbe smo opazili v časovni točki 24 dpi (povprečni DSI vrednosti za oba delecijska mutanta sta bili 2,2 in 2,9), medtem ko sta komplementacijska mutanta $\Delta VnaSSP4.2comp-1$ in $\Delta VnaSSP4.2comp-2$ v tej časovni točki povzročala že bolj izrazite simptome okužbe (povprečni DSI vrednosti sta bili 3,2 in 3,3), ki so bili primerljivi z divjim tipom (DSI je bil 3,4). Podobne razlike med povprečnimi DSI vrednostimi so se pojavljale tudi v poznejših časovnih točkah. Že v točki 38 dpi so DSI vrednosti divjega tipa in obeh komplementacijskih mutantov dosegle skoraj največjo možno vrednost, v zadnji točki

opazovanja pa so bile vse rastline posušene. DSI krivulja obeh delecijskih mutantov je naraščala bolj počasi in posamezne rastline so v zadnji točki opazovanja kazale manjšo prizadetost (slika 24 C).

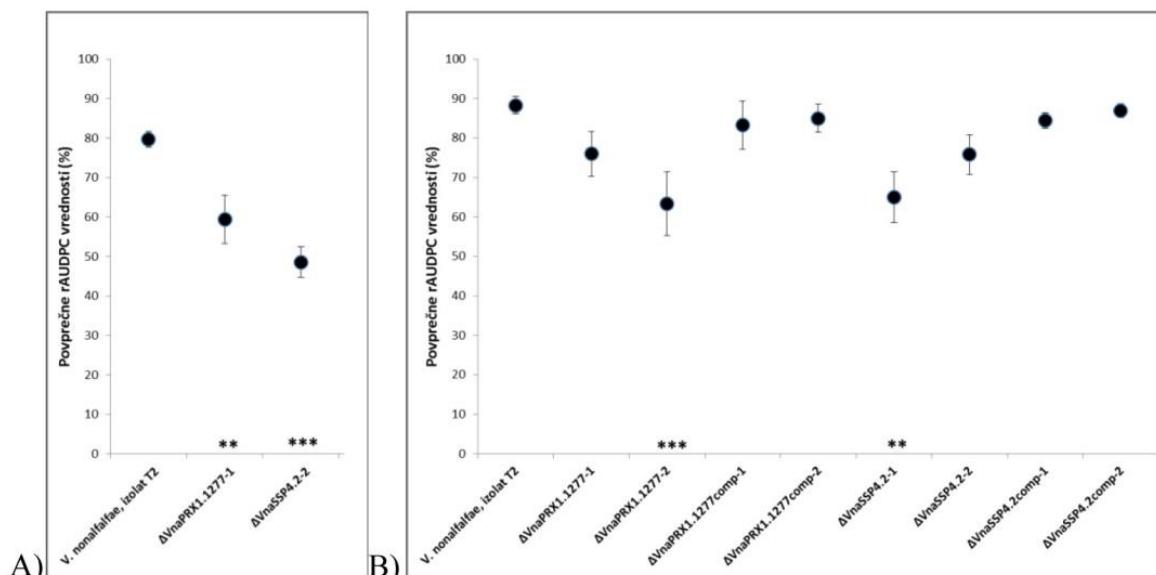


Slika 24: Povprečne DSI vrednosti rastlin hmelja pri okuževanju z mutanti za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*. A) Povprečne DSI vrednosti za $\Delta VnaPRX1.1277-1$ in $\Delta VnaSSP4.2-2$ iz preliminarnega poskusa; B) povprečne DSI vrednosti za delecijске in komplementacijske mutantne za gen *VnaPRX1.1277* iz poskusa september 2014; C) povprečne DSI vrednosti za delecijске in komplementacijske mutantne za gen *VnaSSP4.2* iz poskusa september 2014.

Figure 24: Mean DSI values of plants, infected with *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2* mutants. A) Mean DSI values of $\Delta VnaPRX1.1277-1$ and $\Delta VnaSSP4.2-2$ of preliminary test; B) Mean DSI values of knock-out and complementation mutants of the gene *VnaPRX1.1277* from experiment September 2014; C) Mean DSI values of knock-out and complementation mutants of the gene *VnaSSP4.2* from experiment September 2014.

Na podlagi ocen bolezenskega indeksa smo izračunali rAUDPC vrednosti za oba eksperimenta (slika 25). Po enosmerni analizi variance smo z Dunnett-ovim testom, ki primerja vsako skupino s kontrolno skupino, ugotovili, da se rAUDPC vrednosti rastlin, ki

so bile okužene z delecijskima mutantoma iz poskusa okuževanja april 2014, statistično značilno razlikujejo ($P < 0,01$ za $\Delta VnaPRX1.1277-1$ in $P < 0,001$ za $\Delta VnaSSP4.2-2$) od rADUPC vrednosti rastlin, ki so bile okužene z divjim tipom glive *V. nonalfalfa*e. To pomeni, da je pri rastlinah, ki so bile okužene z delecijskimi mutantami, bolezen napredovala počasneje kot pa pri rastlinah, ki so bile okužene z divjim tipom. Pri poskusu september 2014 smo statistično značilno razliko ugotovili med divjim tipom in delecijskima mutantoma $\Delta VnaPRX1.1277-2$ ($P < 0,001$) in $\Delta VnaSSP4.2-1$ ($P < 0,01$), medtem ko sta imela ostala dva delecijska mutanta $\Delta VnaPRX1.1277-1$ ter $\Delta VnaSSP4.2-2$ tudi nižje rAUDPC vrednosti, toda ne statistično značilno. Prav tako ni bilo razlike med komplementacijskimi mutantami in divjim tipom, kar pomeni, da je obolenje, ki sta ga povzročala komplementacijska mutanta, napredovalo z isto intenziteto kot pri divjem tipu. Dodatna analiza kontrastov smiselnih primerjav povprečnih rAUDPC vrednosti med dvema mutantoma za isti gen je potrdila, da med delecijskima mutantoma za gen *VnaPRX1.1277* ni razlike ($P = 0,4608$), prav tako pa ni razlike med delecijskima mutantoma za gen *VnaSSP4.2* ($P = 0,5494$).



Slika 25: Povprečne rAUDPC vrednosti za mutantne za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*. Povprečna rAUDPC vrednost za divji tip (*V. nonalfalfa*e, izolat T2), delecijske in komplementacijske mutantne za **A)** preliminarni poskus april 2014 in **B)** poskus september 2014. Po enosmerni analizi variance smo uporabili Dunnett-ov test. Zvezdice označujejo statistično značilne razlike (***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$) med povprečji rAUDPC vrednostmi. Pripadajoči intervali predstavljajo standardno napako povprečja.

Figure 25: Mean rAUDPC values of mutants of *VnaPRX1.1277* and *VnaSSP4.2* genes. Mean rAUDPC of wild type, knock-out and complementation mutants for **A)** preliminary test April 2014 and **B)** follow up experiment September 2014. In both experiments, standard one-way analysis of variance followed by Dunnett's test was used for rAUDPC values. The asterisks show significant differences (***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$). Error bars indicate standard error of the mean.

4.6.3.2 Testiranje delecijskih mutantov za gene *VnaCBD8.213*, *VnaHYP07.546*, *Vna9gUN.496*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279*

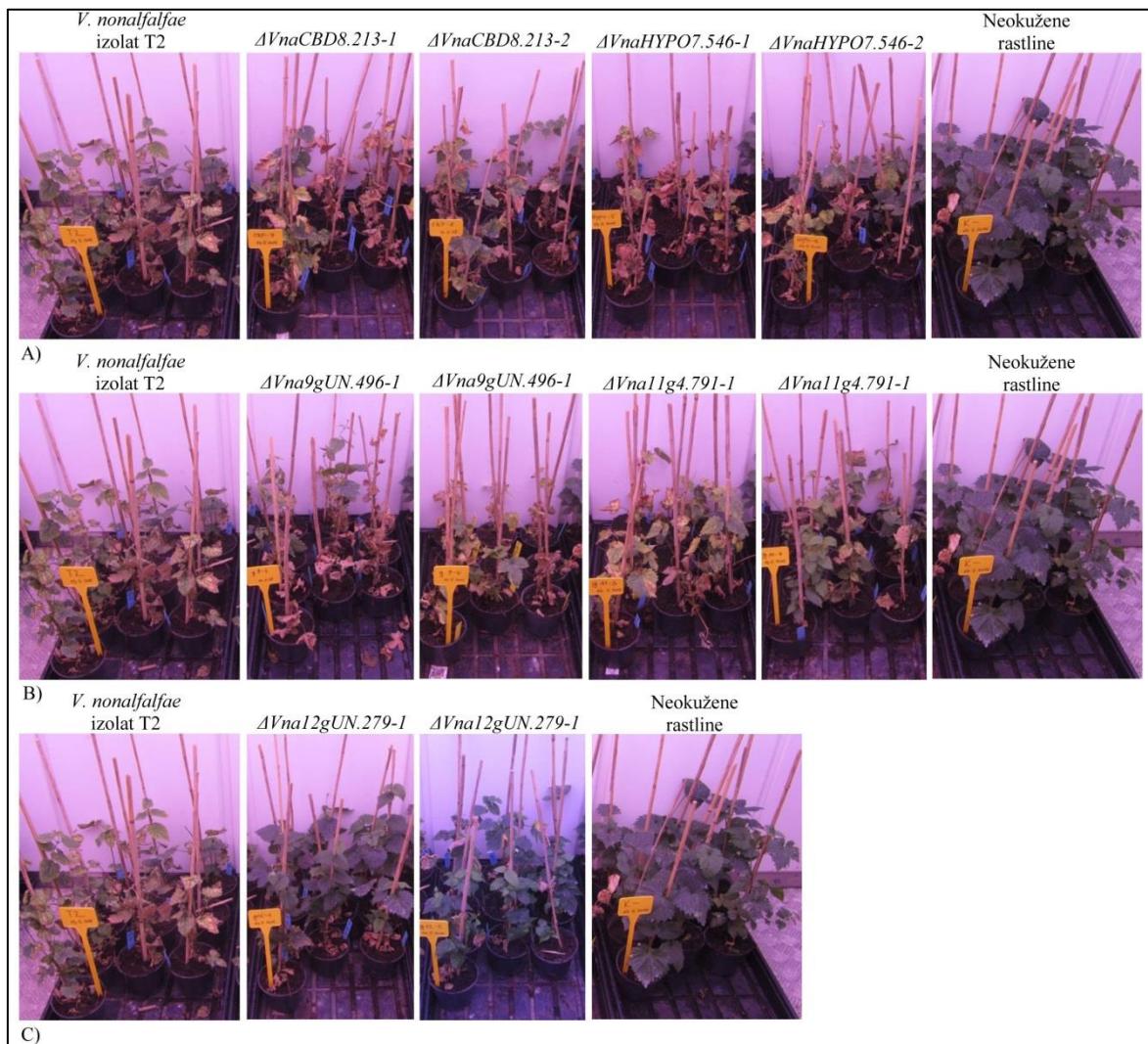
Z delecijskimi mutanti za gene *VnaCBD8.213*, *VnaHYP07.546*, *Vna9gUN.496*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279* smo okuževali po 10 rastlin neodpornega kultivarja 'Celeia'. Test umetnega okuževanja je potekal v maju leta 2015. Sporulacija je bila v primerjavi z divjim tipom glive manjša pri vseh mutantih (razen pri $\Delta VnaHYP07.546$ -2, ki je ime oceno sporulacije 5, enako kot divji tip), toda v večini primerov samo za eno oceno. Pri mutantih $\Delta Vna12gUN.279$ -1 in $\Delta Vna12gUN.279$ -2 je bila frekvenca obolenja 70 in 40 %, pri vseh ostalih izolatih pa so bile okužene vse rastline, ki smo jih uporabili v testu umetnega okuževanja (preglednica 8).

Preglednica 8: Ocena sporulacije, frekvenca obolenja rastlin, bolezenski indeks in rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja z delecijskimi mutanti za gene *VnaCBD8.213*, *VnaHYP07.546*, *Vna9gUN.496*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279*.

Table 8: Conidiation, disease frequency, disease severity index and rAUDPC values of pathogenicity essay of knock-out mutants of *VnaCBD8.213*, *VnaHYP07.546*, *Vna9gUN.496*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279* genes.

<i>V. nonalfafae</i> izolat	Ocena konidiacije (0-5)	Frekvenca obolenja rastlin (%)	Bolezenski indeks DSI (disease severity index)					rAUDPC (%)
			22 dpi	29 dpi	36 dpi	44 dpi	50 dpi	
<i>V. nonalfafae</i> , izolat T2	5	100	1,2	1,9	2,9	3,5	4,4	55,0
$\Delta VnaCBD8.213$ -1	4	100	1,4	2,3	3,3	3,8	4,6	61,5
$\Delta VnaCBD8.213$ -2	3	100	1,4	1,8	2,9	3,5	4,5	55,2
$\Delta VnaHYP07.546$ -1	3	100	2,1	3,6	4,6	5,0	5,0	83,6
$\Delta VnaHYP07.546$ -2	5	100	1,4	2,2	3,5	4,4	4,8	65,5
$\Delta Vna9gUN.496$ -1	4	100	1,9	2,4	3,3	3,7	4,8	63,3
$\Delta Vna9gUN.496$ -2	4	100	1,8	2,7	3,7	4,3	4,6	69,2
$\Delta Vna11g4.791$ -1	4	100	1,0	1,7	3,2	3,8	4,4	56,6
$\Delta Vna11g4.791$ -2	4	100	0,5	1,3	2,4	3,3	4,1	45,9
$\Delta Vna12gUN.279$ -1	4	70	0,1	0,9	1,1	1,4	1,9	21,9
$\Delta Vna12gUN.279$ -2	4	40	0,3	1,0	1,5	2,0	2,5	29,0

Ocenjevanje bolezenskih znakov (DSI - disease severity index) je potekalo z ocenami 0 do 5 na podlagi lestvice za ocenjevanje pojava bolezenskih znamenj na listih (Radišek in sod., 2003). Ocenjevanje je potekalo v petih časovnih točkah, in sicer 22., 29., 36., 44. in 50. dan po okuževanju. Na zadnji dan ocenjevanja rastlin smo opravili reisolacijo ter po treh do petih dneh opazili rast glive iz okuženih stebel rastlin. Za izračun AUDPC vrednosti smo uporabili samo rastline, katerih okužbo smo potrdili s pozitivnim testom reisolacije. AUDPC vrednosti smo pretvorili v rAUDPC vrednosti in z Dunnett-ovim testom primerjali povprečne rAUDPC vrednosti mutantov s povprečno rAUDPC vrednostjo divjega tipa. Okužene rastline so kazale različne odzive na okuževanje z delecijskimi mutantmi (slika 26).



Slika 26: Test umetnega okuževanja hmelja maj 2015. Rastline so bile slikane 35 dni po okuževanju. **A)** Rastline, okužene z divjim tipom *V. nonalfafae*, izolat T2 in z delecijskimi mutanti $\Delta VnaCBD8.213-1$, $\Delta VnaCBD8.213-2$, $\Delta VnaHYP07.546-1$, $\Delta VnaHYP07.546-2$ ter neokužene rastline; **B)** rastline, okužene z divjim tipom *V. nonalfafae*, izolat T2 in z delecijskimi mutanti $\Delta Vna9gUN.496-1$, $\Delta Vna9gUN.496-2$, $\Delta Vna11g4.791-1$, $\Delta Vna11g4.791-2$ ter neokužene rastline; **C)** rastline, okužene z divjim tipom *V. nonalfafae*, izolat T2 in z delecijskima mutantoma $\Delta Vna12gUN.279-1$ in $\Delta Vna12gUN.279-2$ ter neokužene rastline.

Figure 26: Pathogenicity essay conducted in May 2015. Plants were imaged 35 days after inoculation. **A)** Plants inoculated with wild-type *V. nonalfafae*, isolate T2 and knock-out mutants $\Delta VnaCBD8.213-1$, $\Delta VnaCBD8.213-2$, $\Delta VnaHYP07.546-1$, $\Delta VnaHYP07.546-2$ and mock inoculated plants; **B)** plants inoculated with wild-type *V. nonalfafae*, isolate T2 and knock-out mutants $\Delta Vna9gUN.496-1$, $\Delta Vna9gUN.496-2$, $\Delta Vna11g4.791-1$, $\Delta Vna11g4.791-2$ and mock inoculated plants; **C)** plants inoculated with wild-type *V. nonalfafae*, isolate T2 and knock-out mutants $\Delta Vna12gUN.279-1$ and $\Delta Vna12gUN.279-2$ and mock inoculated plants.

$\Delta VnaCBD8.213-1$ delecijski mutant je imel povprečne DSI vrednosti v vseh ocenjevalnih točkah višje od divjega tipa. Drugi mutant $\Delta VnaCBD8.213-2$ pa je imel DSI vrednosti višje samo v prvi in zadnji časovni točki. Oba delecijska mutanta sta imela v zadnji točki ocenjevanja DSI vrednosti višje od divjega tipa (slika 27 A). Statistična primerjava rAUDPC vrednosti delecijskih mutantov z divjim tipom je pokazal, da med mutantoma in

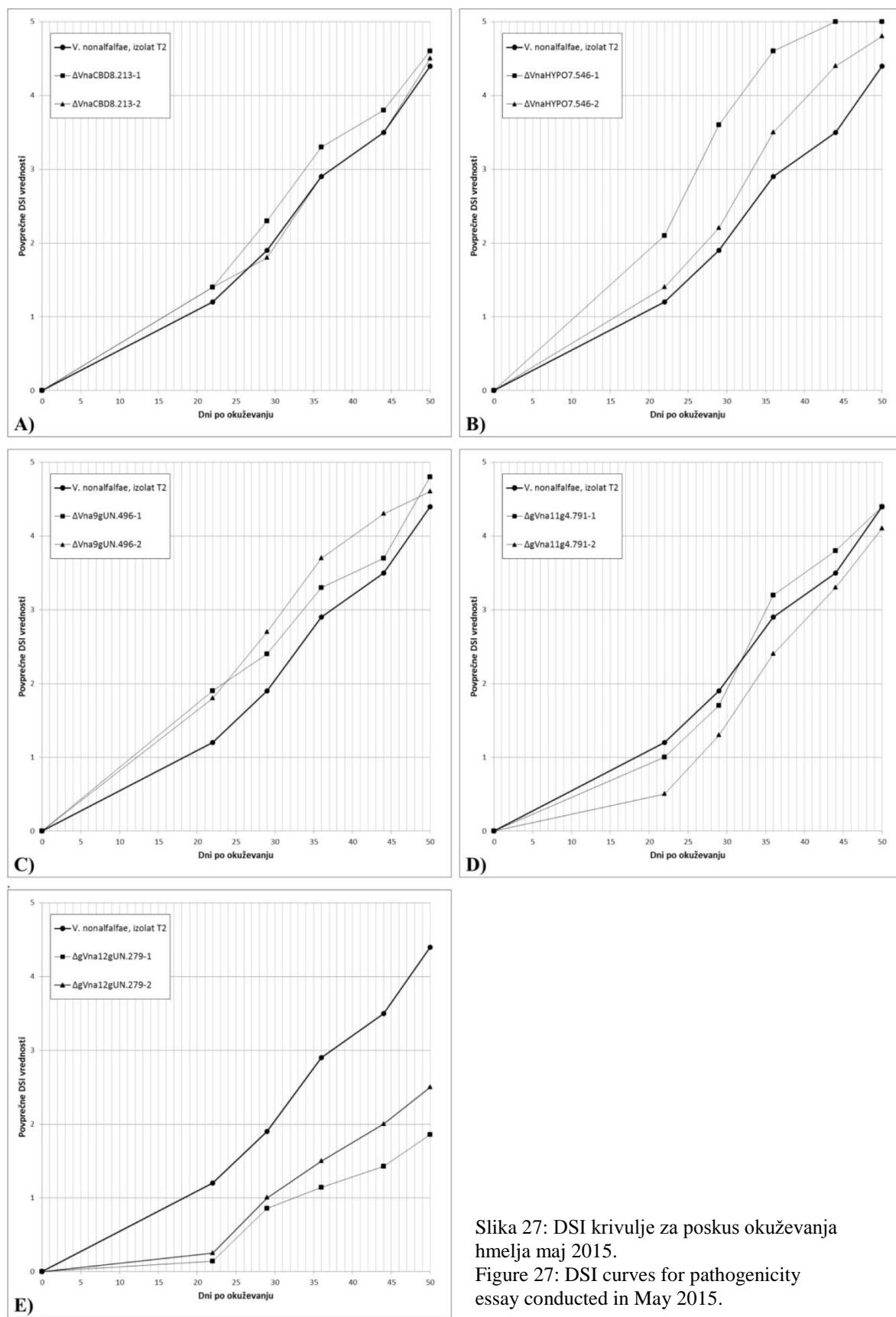
divjim tipom ni razlike v rAUDPC vrednosti, kar pomeni, da oba izolata z izbitim *VnaCBD8.213* genom povzročata enako stopnjo obolenja kot divji tip (slika 28).

Oba delecijska mutanta za gen *VnaHYPO7.546* sta imela v vseh časovnih točkah ocenjevanja povprečne DSİ vrednosti višje od divjega tipa. $\Delta VnaHYPO7.546-1$ je že v predzadnji časovni točki ocenjevanja (44 dpi) dosegel največjo mogočo vrednost (DSI vrednost je bila 5,0). $\Delta VnaHYPO7.546-2$ je imel DSİ vrednosti nekoliko nižje in bliže vrednostim divjega tipa. V zadnji točki je dosegel vrednost 4,8, medtem ko je imel divji tip 4,4 (slika 27 B). Oba delecijska mutanta sta imela povečano virulenco v primerjavi z divjim tipom, razlike v povprečnih rAUDPC vrednostih pa so bile tudi statistično značilne (za $\Delta VnaHYPO7.546-1$ velja $P < 0,001$ in za $\Delta VnaHYPO7.546-2$ velja $P < 0,05$) (slika 28).

Isti vzorec gibanja in razlik povprečnih DSİ vrednosti kot za *VnaHYPO7.546* delecijska mutanta smo opazili tudi pri $\Delta Vna9gUN.496-1$ in $\Delta Vna9gUN.496-2$ mutantih. DSİ vrednosti obeh mutantov so bile namreč v vseh časovnih točkah večje od divjega tipa. V točki 22 dpi sta DSİ vrednosti mutantov zelo blizu skupaj (1,9 za $\Delta Vna9gUN.496-1$ in 1,8 za $\Delta Vna9gUN.496-2$), toda $\Delta Vna9gUN.496-1$ mutant ima v tej točki najvišjo DSİ vrednost. Nato pa DSİ vrednosti hitreje napredujejo pri $\Delta Vna9gUN.496-2$ mutantu in šele v zadnji točki (50 dpi) ima mutant $\Delta Vna9gUN.496-1$ zopet najvišjo DSİ vrednost (4,8; mutant $\Delta Vna9gUN.496-2$ ima v zadnji točki DSİ vrednost 4,6) (slika 27 C). Primerjava povprečnih rAUDPC vrednosti posameznega $\Delta Vna9gUN.496$ delecijskega mutanta z divjim tipom je pokazala, da je napredok bolezni pri mutantih hitrejši, in sicer je za $\Delta Vna9gUN.496-1$ razlika mejno statistično značilna ($P = 0,0975$), za $\Delta Vna9gUN.496-1$ pa je razlika zelo signifikantna ($P < 0,001$) (slika 28).

Mutant $\Delta Vna11g4.791-2$ je imel v vseh časovnih točkah ocenjevanja DSİ vrednosti nižje kot divji tip. Mutant $\Delta Vna11g4.791-1$ pa je imel v prvih dveh točkah DSİ vrednost nižje od divjega tipa, v naslednjih dveh pa nekoliko višje, v zadnji točki (50 dpi) je imel DSİ vrednost enako kot divji tip (4,4) (slika 27 D). Primerjava rAUDPC vrednosti med mutantoma in divjim tipom je razkrila, da med $\Delta Vna11g4.791-1$ in divjim tipom ni razlik v hitrosti napredovanja bolezni, pri mutantu $\Delta Vna11g4.791-2$ pa obolenje napreduje počasneje kot pri divjem tipu, in sicer mejno statistično značilno ($P = 0,0547$) (slika 28).

DSİ vrednosti mutantov $\Delta Vna12gUN.279-1$ in $\Delta Vna12gUN.279-2$ so bile nižje od DSİ vrednosti divjega tipa v vsaki časovni točki. Vidna bolezenska znamenja na rastlinah, okuženih z delecijskima mutantoma, so se začela pojavljati šele 29 dpi in DSİ vrednosti so se do zadnje časovne točke (50 dpi) povečevale v manjši meri kot pri divjem tipu. Medtem ko sta pri zadnjem ocenjevanju (50 dpi) mutanta $\Delta Vna12gUN.279-1$ in $\Delta Vna12gUN.279-2$ doseгла oceni 1,9 in 2,5 ter nista kazala hujših bolezenskih znamenj, je bila povprečna DSİ ocena divjega tipa 4,4, rastline pa so bile že močno prizadete (slika 27 E). Bolezen je pri rastlinah, okuženih z delecijskima mutantoma, napredovala statistično značilno počasneje ($P < 0,001$), kar smo ugotovili s primerjavo povprečnih rAUDPC vrednosti mutantov z divjim tipom (slika 28).



Slika 27: DSI krivulje za poskus okuževanja
 hmelja maj 2015.

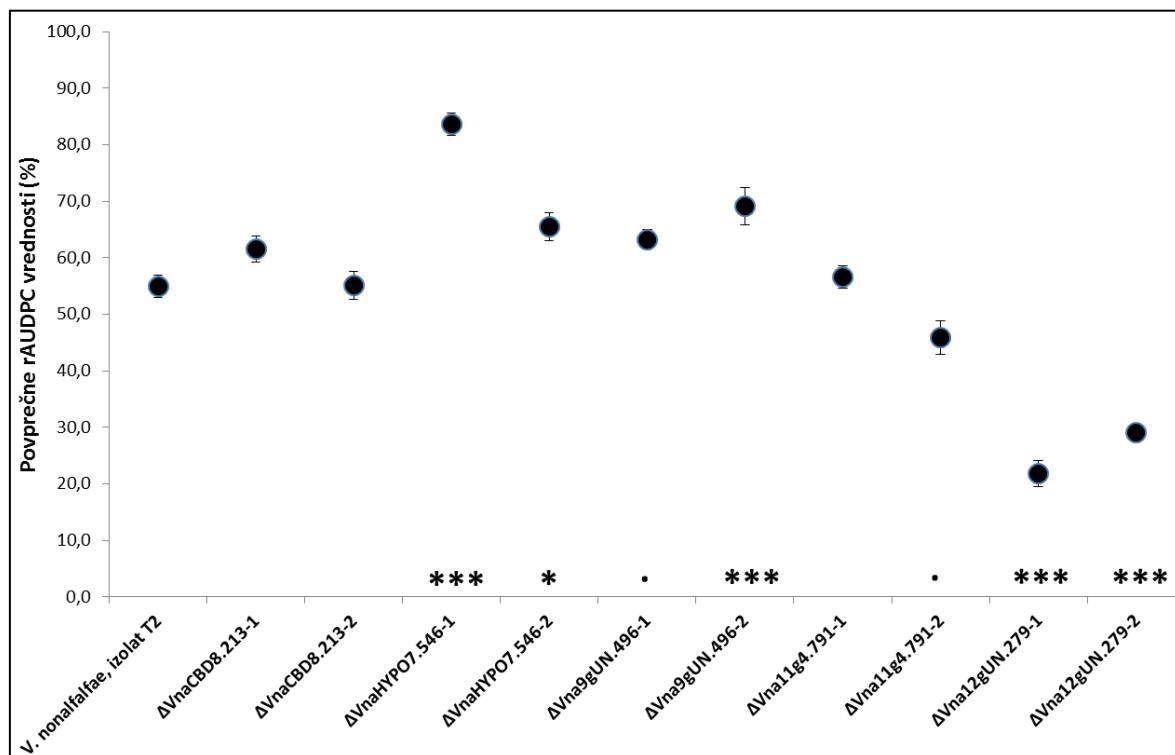
Figure 27: DSI curves for pathogenicity
 essay conducted in May 2015.

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Opis Slike 27: DSI krivulje so bile določene iz ocenjevanja simptomov okuženih rastlin v točkah 22., 29., 36., 44. in 50. dan po okuževanju za divji tip *V. nonalfalfa*, izolat T2 in **A)** delecijska mutanta $\Delta VnaCBD8.213\text{-}1$ in $\Delta VnaCBD8.213\text{-}2$; **B)** delecijska mutanta $\Delta VnaHYP07.546\text{-}1$ in $\Delta VnaHYP07.546\text{-}2$; **C)** delecijska mutanta $\Delta Vna9gUN.496\text{-}1$ in $\Delta Vna9gUN.496\text{-}2$; **D)** delecijska mutanta $\Delta Vna11g4.791\text{-}1$ in $\Delta Vna11g4.791\text{-}2$; **E)** delecijska mutanta $\Delta Vna12gUN.279\text{-}1$ in $\Delta Vna12gUN.279\text{-}2$.

Description of Figure 27: DSI curves were indicated by symptom evaluation of infected plants at 22, 29, 36, 44 and 50 dpi of wild-type *V. nonalfalfa*, isolate T2 and **A)** knock-out mutants $\Delta VnaCBD8.213\text{-}1$ and $\Delta VnaCBD8.213\text{-}2$; **B)** knock-out mutants $\Delta VnaHYP07.546\text{-}1$ and $\Delta VnaHYP07.546\text{-}2$; **C)** knock-out mutants $\Delta Vna9gUN.496\text{-}1$ and $\Delta Vna9gUN.496\text{-}2$; **D)** knock-out mutants $\Delta Vna11g4.791\text{-}1$ and $\Delta Vna11g4.791\text{-}2$; **E)** knock-out mutants $\Delta Vna12gUN.279\text{-}1$ and $\Delta Vna12gUN.279\text{-}2$.



Slika 28: Povprečne rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja maj 2015. Povprečna rAUDPC vrednost za divji tip (*V. nonalfalfa*, izolat T2) in delecijske mutante za gene *VnaCBD8.213*, *VnaHYP07.546*, *Vna9gUN.496*, *Vna11g4.791* in *Vna12gUN.279*. Po enosmerni analizi varianc smo uporabili Dunnett-ov test. Simboli nad imeni delecijskih mutantov označujejo statistično značilne razlike ('***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1) med povprečji rAUDPC vrednostmi. Pripadajoči intervali predstavljajo standardno napako povprečja.

Figure 28: Mean rAUDPC values for pathogenicity essay conducted in May 2015. Mean rAUDPC values of wild type and knock-out mutants of *VnaCBD8.213*, *VnaHYP07.546*, *Vna9gUN.496*, *Vna11g4.791* and *Vna12gUN.279*. rAUDPC values calculated for each treatment were subjected to standard one-way analysis of variance followed by Dunnett's test. The codes above the mutants' labels show significant differences ('***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1) in mean rAUDPC values. Error bars indicate standard error of the mean.

4.6.3.3 Testiranje delecijskih mutantov za gene *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna8gUN.246* in *Vna10g4.803*

Za test umetnega okuževanja rastlin hmelja z delecijskimi mutanti za gene *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna8gUN.246* in *Vna10g4.803* smo v avgustu 2013 uporabili 10 rastlin na izolat. Ocena sporulacije je bila v tem poskusu manjša za vse uporabljeni izolate, tudi za divji tip *V. nonalfalfa*e, izolat T2. Vseeno pa med manjšo sporulacijo in frekvenco okuževanja ni povezave, saj je bila uspešnost okuževanja rastlin 80 % ali več ne glede na oceno sporulacije za posamezen izolat (preglednica 9).

Preglednica 9: Ocena sporulacije, frekvence obolenja rastlin, bolezenski indeks DSI in rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja z delecijskimi mutanti za gene *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna8gUN.246* in *Vna10g4.803*.

Table 9: Conidiation, disease frequency, disease severity index DSI and rAUDPC values of pathogenicity essay of knock-out mutants of *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792*, *Vna8gUN.246* in *Vna10g4.803* genes.

<i>V. nonalfalfa</i> e izolat	Ocena konidiacije (0-5)	Frekvenca obolenja rastlin (%)	Bolezenski indeks DSI (disease severity index)					rAUDPC (%)
			25 dpi	32 dpi	40 dpi	49 dpi	55 dpi	
<i>V. nonalfalfa</i> e, izolat T2	3	100	2,1	3,0	4,1	4,8	4,9	76,9
<i>ΔVna4gUN.245-1</i>	3	80	0,6	1,1	2,1	2,3	2,3	34,9
<i>ΔVna4gUN.245-2</i>	3	80	1,1	2,0	2,8	2,9	3,4	49,3
<i>ΔVna5g9-1</i>	2	90	0,2	0,6	1	1,7	2,6	22,4
<i>ΔVna5g9-2</i>	2	100	1,4	2,0	2,5	3,5	4,5	53,9
<i>ΔVna6g4.792-1</i>	1	100	1,2	1,3	2,0	2,7	3,9	41,9
<i>ΔVna6g4.792-2</i>	1	90	0,8	0,9	2,1	2,8	3,8	39,7
<i>ΔVna8gUN.246-1</i>	2	80	2,0	2,8	3,9	4,8	5,0	74,1
<i>ΔVna8gUN.246-2</i>	2	80	1,8	2,1	3,9	4,8	4,9	70,2
<i>ΔVna10g4.803-1</i>	1	80	0,8	1,6	2,9	4,0	4,6	55,4
<i>ΔVna10g4.803-2</i>	2	100	1,0	2,0	3,1	3,8	4,5	57,9

Ocenjevanje bolezenskih znakov (DSI - disease severity index) je potekalo z ocenami 0 do 5 na podlagi lestvice za ocenjevanje pojava bolezenskih znamenj na listih (Radišek in sod., 2003). Ocenjevanje je potekalo v petih časovnih točkah, in sicer 25., 32., 40., 49. in 55. dan po okuževanju. Na zadnji dan vzorčenja rastlin smo opravili reizolacijo ter po treh do petih dneh opazovali rast glive iz okuženih stebel rastlin. Za izračun AUDPC vrednosti smo uporabili samo rastline, katerih okužbo smo potrdili s pozitivnim testom reizolacije. AUDPC vrednosti smo pretvorili v rAUDPC vrednosti. Z Levene-ovim testom enakosti varianc smo ugotovili, da so variance po obravnavanjih statistično značilno različne ($P < 0,05$), zato smo za primerjavo porazdelitev rAUDPC vrednosti po obravnavanjih uporabili neparametričen pristop. Kruskal-Wallis-ov test, ki obravnavanim vrednostim določi range in primerja porazdelitve rangiranih vrednosti, je pokazal, da so med obravnavanjimi statistično značilne razlike ($P < 0,001$). Z Dunn-ovim testom smo nato primerjali posamezen delecijski mutant na kontrolo (divji tip *V. nonalfalfa*e, izolat T2).

Oba delecijska mutanta za gen *Vna4gUN.245* sta imela povprečne DSI vrednosti nižje od povprečnih DSI vrednosti divjega tipa v vseh točkah opazovanja. Med 32 dpi in 49 dpi imajo DSI krivulje približno enako strmino (simptomi se pri *ΔVna4gUN.245-1* razvijajo

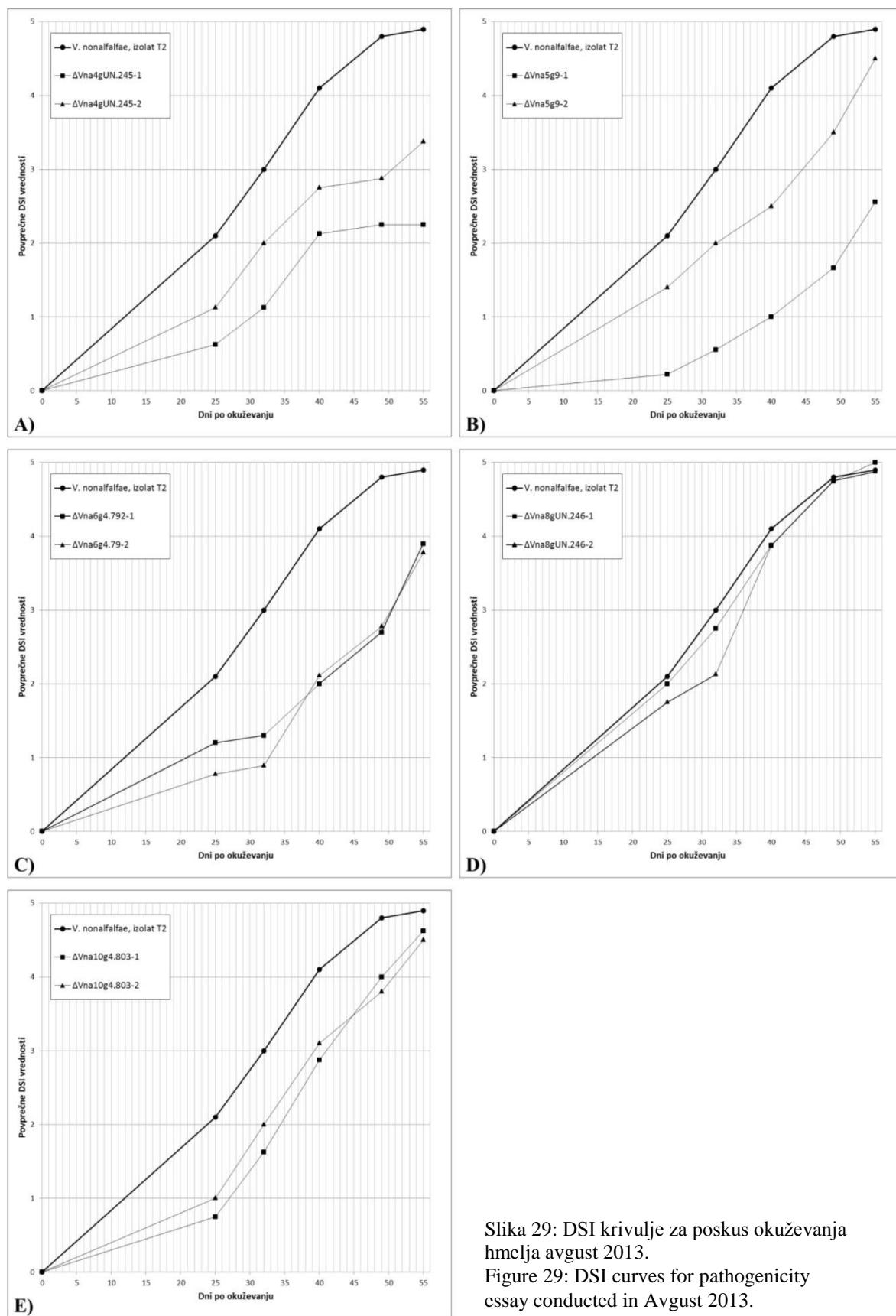
nekoliko počasneje), vendar medtem ko v zadnjih dveh točkah DSI krivulja za divji tip še vedno strmo narašča in se v točki 55 dpi približa največji možni vrednosti (DSI je bil 4,9), se krivulja za $\Delta Vna4gUN.245-1$ skoraj izravna (DSI v točki 55 dpi je 2,3), končna DSI vrednost $\Delta Vna4gUN.245-2$ mutanta pa se je ustavila pri 3,4 (slika 29 A). Povprečni rangi rAUDPC vrednosti kažejo, da je bilo napredovanje bolezni obeh delecijskih mutantov počasnejše v primerjavi z divjim tipom, saj sta povprečji rangov za oba mutanta statistično značilno nižji od povprečnega ranga divjega tipa ($P < 0,001$ za $\Delta Vna4gUN.245-1$ in $P < 0,05$ za $\Delta Vna4gUN.245-2$) (slika 30).

Med delecijskima mutantoma za gen *Vna5g9* prihaja do razlik. Krivulja $\Delta Vna5g9-2$ mutanta je podobna krivulji divjega tipa z nekoliko nižjimi DSI vrednostmi v vsaki časovni točki (končna DSI vrednost je dosegljiva 4,5), povprečne DSI vrednosti za $\Delta Vna5g9-1$ pa so občutno nižje v vsaki točki ocenjevanja in tudi v zadnji točki doseže $\Delta Vna5g9-1$ delecijski mutant precej nižjo končno DSI vrednost (2,6) (slika 29 B). Povprečje rangov rAUDPC vrednosti mutanta $\Delta Vna5g9-1$ je signifikantno nižje ($P < 0,001$) od divjega tipa, medtem ko je razlika med povprečjem rangov rAUDPC vrednosti mutanta $\Delta Vna5g9-1$ in divjega tipa mejno statistično značilno nižja ($P = 0,0698$) (slika 30).

Povprečne DSI vrednosti za mutanta $\Delta Vna6g4.792-1$ in $\Delta Vna6g4.792-2$ so v vsaki točki ocenjevanja precej nižje od divjega tipa. DSI vrednosti obeh delecijskih mutantov se v točkah 25 in 32 dpi še nekoliko razlikujejo ($\Delta Vna6g4.792-1$ ima višje DSI vrednosti od $\Delta Vna6g4.792-2$), potem pa imata do konca ocenjevanja oboje mutanta skoraj enake DSI vrednosti. Do točke 32 dpi pri obeh mutantih DSI vrednosti počasi naraščajo, od 32 dpi naprej pa sta DSI krivulji veliko bolj strmi in po obliki primerljivi z divjim tipom. V zadnji točki ocenjevanja dosežeta mutanta DSI vrednosti 3,9 in 3,8 (slika 29 C) Oba delecijska mutanta kažeta konsistentnost v virulenci. Pri obeh sta povprečji rangov rAUDPC vrednosti signifikantno nižji od divjega tipa pri enaki značilnosti ($P < 0,01$) (slika 30).

Med DSI krivuljami za divji tip ter $\Delta Vna8gUN.246-1$ in $\Delta Vna8gUN.246-2$ delecijskima mutantoma praktično ni razlik. Edino odstopanje predstavlja mutant $\Delta Vna8gUN.246-2$ v točki 32 dpi, ki ima nekoliko nižjo DSI vrednost (DSI vrednost je 2,1; $\Delta Vna8gUN.246-1$ in divji tip imata v tej točki DSI vrednosti 2,8 in 3,0). V zadnji točki se vsi trije izolati približajo največji možni vrednosti oz. $\Delta Vna8gUN.246-1$ delecijski mutant jo tudi doseže (slika 29 D). Prav tako med povprečji rangov rAUDPC vrednosti obeh mutantov in divjim tipom ni signifikantne razlike (slika 30).

Krivulji za mutanta $\Delta Vna10g4.803-1$ in $\Delta Vna10g4.803-2$ imata podobno obliko, povprečne DSI vrednosti obeh mutantov so v vsaki točki nižje od divjega tipa. V prvi točki ocenjevanja (25 dpi) simptomi okužbe pri obeh mutantih še niso izraziti (DSI vrednosti sta 0,8 in 1,0 za $\Delta Vna10g4.803-1$ in $\Delta Vna10g4.803-2$), nato pa se začneta DSI krivulji obeh mutantov strmo vzpenjati. Mutant $\Delta Vna10g4.803-1$ ima do točke 40 dpi nižje DSI vrednosti od mutanta $\Delta Vna10g4.803-2$, v zadnjih dveh točkah ocenjevanja pa se trend obrne in ima $\Delta Vna10g4.803-1$ višje vrednosti. Končna povprečna DSI ocena v točki 55 dpi je bila 4,6 za $\Delta Vna10g4.803-1$ in 4,5 za $\Delta Vna10g4.803-2$ (slika 29 E). Povprečna ranga rAUDPC vrednosti obeh mutantov sta sicer nižja od divjega tipa, toda nobeden od mutantov se v hitrosti napredovanja bolezni statistično značilno ne razlikuje od divjega tipa ($P = 0,01446$) (slika 30).



Slika 29: DSI krivulje za poskus okuževanja
 hmelja avgust 2013.

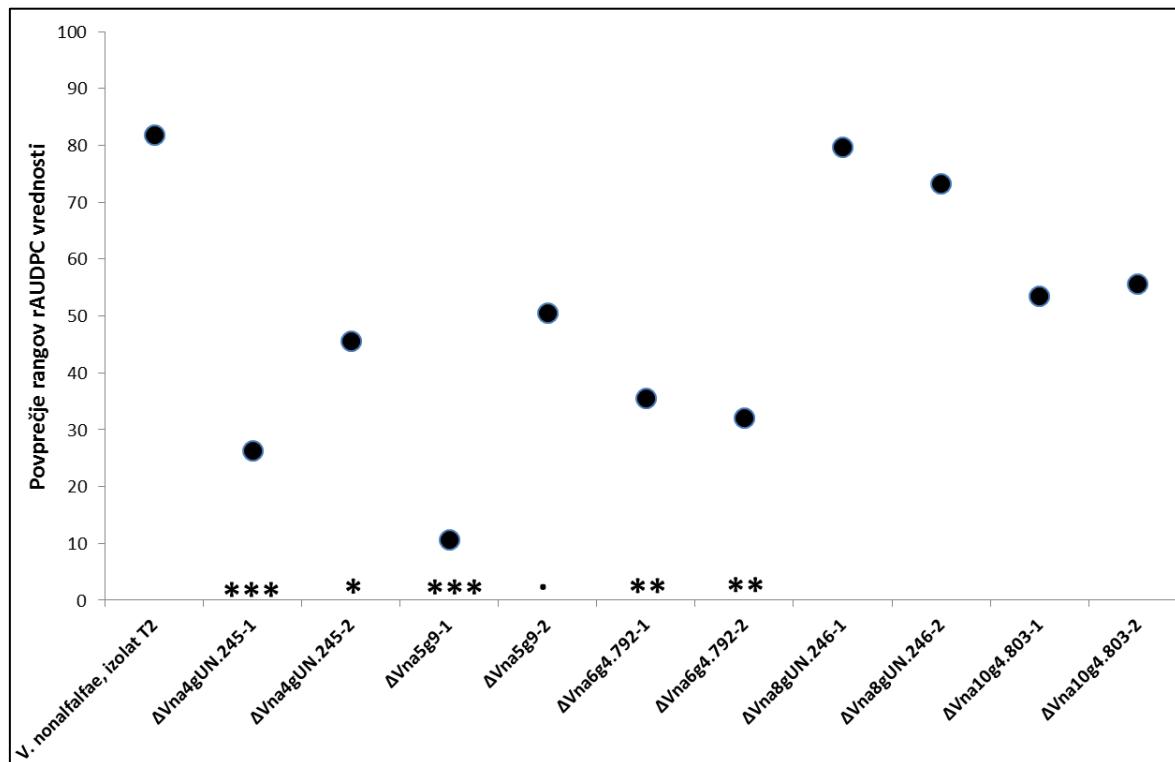
Figure 29: DSI curves for pathogenicity
 essay conducted in Avgust 2013.

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Opis Slike 29: DSI krivulje so bile določene iz ocenjevana simptomov okuženih rastlin v točkah 25, 32, 40, 49 in 55 dni po okuževanju za divji tip *V. nonalfalfa*, izolat T2 in **A**) delecija mutanta $\Delta Vna4gUN.245-1$ in $\Delta Vna4gUN.245-2$; **B**) delecija mutanta $\Delta Vna5g9-1$ in $\Delta Vna5g9-2$; **C**) delecija mutanta $\Delta Vna6g4.792-1$ in $\Delta Vna6g4.792-2$; **D**) delecija mutanta $\Delta Vna8gUN.246-1$ in $\Delta Vna8gUN.246-2$; **E**) delecija mutanta $\Delta Vna10g4.803-1$ in $\Delta Vna10g4.803-2$.

Description of Figure 29: DSI curves were indicated by symptom evaluation of infected plants at 25, 32, 40, 49 and 55 dpi of wild-type *V. nonalfalfa*, isolate T2 and **A**) knock-out mutants $\Delta Vna4gUN.245-1$ and $\Delta Vna4gUN.245-2$; **B**) knock-out mutants $\Delta Vna5g9-1$ and $\Delta Vna5g9-2$; **C**) knock-out mutants $\Delta Vna6g4.792-1$ and $\Delta Vna6g4.792-2$; **D**) knock-out mutants $\Delta Vna8gUN.246-1$ and $\Delta Vna8gUN.246-2$; **E**) knock-out mutants $\Delta Vna10g4.803-1$ and $\Delta Vna10g4.803-2$.



Slika 30: Povprečja rangov rAUDPC vrednosti za poskus okuževanja hmelja avgust 2013. Povprečja rangov rAUDPC vrednosti za divji tip (*V. nonalfalfa*, izolat T2) in delecija mutante $\Delta Vna4gUN.245-1$, $\Delta Vna4gUN.245-2$, $\Delta Vna5g9-1$, $\Delta Vna5g9-2$, $\Delta Vna6g4.792-1$, $\Delta Vna6g4.792-2$, $\Delta Vna8gUN.246-1$, $\Delta Vna8gUN.246-2$, $\Delta Vna10g4.803-1$ in $\Delta Vna10g4.803-2$. Po Kruskal-Wallis-ovem testu smo uporabili neparametričen Dunn-ov test. Simboli nad imeni delecija mutantov označujejo statistično značilne razlike ('***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '! 0.1) med povprečji rangov rAUDPC vrednosti za mutante in divji tip.

Figure 30: Mean ranks of rAUDPC for pathogenicity essay conducted in Avgust 2013. Mean ranks of rAUDPC for wild type and knock-out mutants $\Delta Vna4gUN.245-1$, $\Delta Vna4gUN.245-2$, $\Delta Vna5g9-1$, $\Delta Vna5g9-2$, $\Delta Vna6g4.792-1$, $\Delta Vna6g4.792-2$, $\Delta Vna8gUN.246-1$, $\Delta Vna8gUN.246-2$, $\Delta Vna10g4.803-1$ and $\Delta Vna10g4.803-2$. Kruskal-Wallis test was followed by Dunn's test. The codes above the mutants' labels show significant differences ('***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '! 0.1) in mean ranks between mutants and wild type.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 GENSKA TRANSFORMACIJA GLIVE *V. nonalfalfa*

Uporaba ATMT metode za gensko transformacijo gliv je zelo razširjena pri funkcijskih analizah gliv (Frandsen, 2011), saj lahko kot izvorni material za ATMT transformacijo uporabimo različna intaktna tkiva gliv in zamudna priprava protoplastov ni potrebna. Prav tako se v večini primerov v genom vgradi samo ena kopija DNA iz vektorskega plazmida, kar je prednost pri tarčnih modifikacijah genoma, saj ne pride do neželenih naključnih mutacij. Učinkovitost metode je visoka, laboratorijska izvedba metode pa ni zahtevna. Največja pomanjkljivost metode je v tem, da vse vrste gliv niso dovzetne za transformacijo z bakterijo *A. tumefaciens*. Prav tako je potrebno protokol transformacije prilagoditi za vsako glivno vrsto in celo za posamezen sev posebej (Michielse in sod., 2005). V prvem delu naloge smo optimizirali transformacijo *V. nonalfalfa* izolata T2.

ATMT metodo za transformacijo *V. albo-atrum* so že uporabili Knight in sod. (2009), in sicer za transformacijo izolata 1974, ki izvira iz hmelja iz Velike Britanije. Pri vzpostavitvi protokola so preizkušali različne parametre, kot so koncentracija spor za transformacijo, koncentracija acetosiringona, optimizacija selekcijskega gojišča, čas skupne inkubacije glivnih spor in bakterijskih celic, idr. V naši nalogi smo omenjeni ATMT protokol preizkusili za transformacijo *V. nonalfalfa* izolata T2 in prilagodili določene parametre.

Knight in sod. (2009) so za transformacijo uporabili plazmid z reporterskim genom *DsRed*, zaradi katerega so transformanti oddajali rdečo svetlobo pod fluorescentnim mikroskopom, kar je bil neposredni dokaza za uspešno transformacijo. Posredno so uspešno vgradnjo T-DNA iz plazmida dokazali tudi s PCR metodo in Southern testom. Ugotovili so, da že koncentracija 25 µg/ml antibiotika higromicina B v selekcijskem gojišču zavre rast glive za več kot 90 %. Na koncu so v selekcijskem gojišču uporabili koncentracijo 50 µg/ml higromicina B. Za naš izolat T2 se je izkazalo, da koncentracija 50 µg/ml higromicina B v selekcijskem gojišču ne zavre dovolj rasti, zato smo ga v selekcijsko gojišče dodali 75 µg/ml, kar je uspešno onemogočilo rast divjemu tipu. Zanimivo je, da je T2 izolat tudi manj občutljiv na antibiotik zeomicin. Gen *ble* za odpornost na antibiotik zeomicin, ki spada v bleomicinsko skupino antibiotikov, smo uporabili kot selekcijski marker pri komplementacijski transformaciji. Medtem ko sta Santhanam in Thomma (2013) pri komplementacijski transformaciji glive *V. dahliae* v selekcijskem gojišču uporabila 100 µg/ml zeomicina, je izolatu T2 šele koncentracija 300 µg/ml onemogočala rast, zato smo omenjeno koncentracijo uporabili v selekcijskem gojišču pri komplementacijski transformaciji.

Acetosiringon je fenolna komponenta, ki jo v naravi rastline sproščajo iz ranjenih delov in v *A. tumefaciens* inducira *vir* gene. Knight in sod. (2009) so testirali tudi pomen acetosiringona v transformaciji *V. albo-atrum* izolata 1974. Ugotovili so, da je dodajanje acetosiringona v gojišče, na katerem poteka kokultivacija bakterijskih in glivnih celic, ključnega pomena za uspešno transformacijo, saj na gojišču brez acetosiringona do transformacije ni prišlo. V naši raziskavi transformacije brez acetosiringona nismo

preizkušali. Opazili pa smo, da mora biti raztopina acetosiringona sveža, saj v nasprotnem primeru do uspešne transformacije ne pride ali pa je bila učinkovitost slabša.

Knight in sod. (2009) so 48 ur določili kot optimalen čas skupne inkubacije glivnih spor in bakterijskih celic na indukcijskem gojišču. Pri naši transformaciji *V. nonalfafae* izolata T2 se je izkazalo, da mora biti čas kokultivacije glivnih in bakterijskih celic vsaj 72 ur, saj se v nasprotnem primeru transformanti niso pojavili. Prav tako pa je čas skupne inkubacije, daljši od 96 ur, onemogočal selekcijo transformiranih celic, saj je zraslo preveč glivnega micelija in bakterijskih celic. Na selekcijskem gojišču je velika količina odmrlega glivnega in bakterijskega tkiva povzročila nastanek goste sluzi, ki je onemogočala rast transformantom. Kokultivacija glivnih in bakterijskih celic poteka na indukcijskem gojišču IM (angl. induction medium), v katerega se poleg številnih soli in acetosiringona doda tudi glukoza. V protokol transformacije *V. nonalfafae* izolata T2 smo vnesli še eno bistveno spremembo, in sicer smo v IM gojišče dodali samo polovično količino glukoze glede na protokol Knighta in sod. (2009). Na ta način smo zmanjšali intenzivnost rasti glivnega micelija v času kokultivacije na IM gojišču, kar je zopet povzročilo nastanek manjše količine sluzi na selekcijskem gojišču in s tem omogočilo boljše pogoje za preživetje transformiranih kolonij.

Pri transformaciji T2 izolata smo pridobili od 50 do 100 zraslih kolonij na 10^6 transformiranih spor, kar je primerljivo s Knight in sod. (2009), ki so pridobili 13 do 61 transformantov na 10^6 spor in z Dobinson in sod. (2004), ki so pridobili 50 do 500 transformantov na 10^6 spor. Eynick in sod. (2007) so opazili večjo učinkovitost in so pri transformaciji *V. longisporum* (izolat VL 43) pridobili 33 transformantov na 10^5 spor in pri transformaciji *V. dahliae* (izolat VD 73) 20 transformantov na 10^5 spor. O še večji učinkovitosti poročajo Maruthachalam in sod. (2011), ki so pridobili od 205 do 255 transformantov na 10^5 spor pri transformaciji *V. dahliae* (izolat VdLs.17). Različne učinkovitosti niso presenetljive, saj gre za uporabo različnih izolatov in različnih protokolov transformacije. Veliko variabilnost v številu pridobljenih transformantov smo opazili pri naši komplementacijski transformaciji delecijskih mutantov za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*, kjer je bilo število zraslih komplementacijskih transformantov zelo različno in je obsegalo nekaj 10 do nekaj 100 zraslih kolonij na 10^6 transformiranih spor. Komplementacijski transformanti so prvo transformacijo prestali pri izbijanju tarčnega gena, zato predstavlja komplementacijska transformacija za njih že drugi proces modifikacije genoma. Sam proces transformacije in gojenje na selekcijskem gojišču pomenita stres za glivne celice (Olmedo-Monfil in sod., 2004), zato lahko gensko manipulacijo spremljajo različni odzivi glede števila in viabilnosti transformantov. Uspešnost genske transformacije se giblje v rangu nekaj 10 do nekaj 100 transformantov na 10^6 spor tudi pri ostalih vrstah iz skupine zaprtotrosnic (Grimaldi in sod., 2005; Gorfer in sod., 2007; Aimi in sod., 2005; Eckert in sod., 2005).

5.2 GOSTITELJSKA SPECIFIČNOST GLIVE *V. nonalfafae*

Ko z *in silico* ali *in planta* pristopi določimo kandidatne virulentne gene fitopatogenov, je potrebno njihovo udeleženost oz. pomen v virulenci glive preveriti z eksperimentalnimi pristopi. Obstaja več načinov, kako lahko preverimo, ali je nek glivni protein aktiven v

času okužbe in kakšna je njegova vloga. Z metodami fluorescenčne celične lokalizacije lahko določimo, kje v glivni celici se nahaja tarčni protein (Tran in sod., 2014) in kje se lokalizira v gostiteljski celici (Ma in sod., 2013). Z metodo kvantitativnega PCR v realnem času (RT-qPCR) se preverja izražanje tarčnega glivnega virulentnega gena, ko se patogen nahaja v gostitelju (de Jonge, 2012). Virulentni dejavniki se v gostitelju pogosto vežejo na receptorske proteine gostitelja. Vezavo med receptorjem iz gostitelja in proteinom iz patogena lahko preverimo z metodo agroinfiltracije (Kapila in sod., 1997). S heterologno ekspresijo, npr. v kvasovki *Pichia pastoris* (Kombrink, 2012) ali *E. coli* (Wang in sod., 2004) je mogoče koncentrirano pridobiti kandidatne virulentne proteine in jih uporabiti v *in vitro* testih.

Največ se za ugotavljanje vloge kandidatnih virulentnih genov v patogenezi in/ali virulenci uporablajo različni pristopi funkcijске genomike, kjer proučujemo fenotip mutanta s spremenjenim ali izbitim tarčnim virulentnim genom. Poleg opazovanja sprememb mutantov v rasti, morfologiji, adheziji na gostitelja, vzorcu kolonizacije gostiteljske rastline, sporulaciji, kalitvi spor in tvorbi trajnih struktur, se uporablja še test umetnega okuževanja gostiteljske rastline. Zmanjšana virulenta mutantov pri testu umetnega okuževanja gostiteljske rastline je najbolj zanesljiva in nedvoumna potrditev vloge kandidatnega gena v patogenezi. S testom umetnega okuževanja sicer ne moremo določiti specifične funkcije gena, toda spremenjena virulenta mutantov v primerjavi z divjim tipom je neposredni dokaz, da je kandidatni gen vpletен v virulenco, in zelo dobro izhodišče za nadaljnje študije gena oz. virulentnega proteina.

Hmelj je primarni gostitelj izolata T2 glive *V. nonalfafae*. Zato bi bil že v izhodišču najbolj primeren gostitelj za testiranje virulentnostni delecijskih mutantov. Vendar je uporaba hmelja kot testne rastline težavna v več tehničnih pogledih. Npr. hmelj je trajnica, ki vsako leto požene iz podzemnih rizomov. To se zgodi samo v primeru, če je bila rastlina podvržena nizkim temperaturam (dormanca). Zaradi dormance so testne rastline hmelja na voljo samo dobro polovico leta (od marca do oktobra) in v vmesnem času testov umetnega okuževanja ni mogoče izvajati. Prav tako se zaradi pojava dormance rastline glede na letni čas obnašajo različno. Npr. v začetku pomladi in čez poletje so rastline bujne in simptomi okužbe so zelo dobro vidni. V pozni jeseni pa rastline že same po sebi pešajo in izgubljajo bujnost ter so takrat manj primerne za okuževanje, saj tudi neokužene rastline kažejo določene znake senescence, ki spominjajo na simptome glivne okužbe (npr. odpadanje listov, zmanjšana rast). Hmelj je med testi umetnega okuževanja nagnjen k napadom drugih bolezni in škodljivcev, čeprav se nahaja v rastni komori. Kljub temu da se hmelj razmnožuje vegetativno, je vzgoja sadik pri tej rastlini težavna in zahtevna. Težko je pridobiti tudi povsem izenačene sadike. Prav izenačenost rastlinskega materiala ima namreč ključno vlogo pri patogenih testih. Pri vrstah kjer sadike pridobimo iz semen, je lažje zagotoviti izenačenost začetnega materiala, ker lahko pridobimo večje število sadik in na koncu uporabimo samo najbolj primerne in po videzu izenačene. Pri hmelju so začetni simptomi okužbe vidni šele tri tedne po okuževanju, rastline pa je potrebno spremljati tudi do 8 tednov po okuževanju. Pri drugih testnih rastlinah, kot so paradižnik, tobakovec, bombaževec, navadni repnjakovec in solata je celoten poskus zaključen običajno v treh do štirih tednih. To so razlogi, zakaj smo hoteli za teste umetnega okuževanja pridobiti od hmelja bolj ustrezno gostiteljsko rastlino, ki bi bila primernejša predvsem v smislu

enostavnnejše uporabe pri izvedbi tovrstnih testov, ki bi jih lahko opravljali tudi ne glede na letni čas.

Fitopatogene vrste iz rodu *Verticillium* okužujejo veliko različnih gostiteljev (Pegg in Brady, 2002; Fradin in Thomma, 2006). Iz literature je znano, da se predvsem za vrsto *V. dahliae* pri testih umetnega okuževanja uporablja več različnih gostiteljev. Temu vzorcu smo sledili tudi v naši študiji. Najprej smo testirali paradižnik (*Solanum lycopersicum*), ki je zelo pogosto uporabljen za testiranje virulentnosti različnih izolatov *V. dahliae* (Rauyaree in sod., 2005; Houterman in sod., 2008; Fradin in sod., 2009; de Jonge in sod., 2012). Fitopatogeni testi umetnega okuževanja dveh linij sort 'MoneyMaker' in 'Ailsa Craig' (z ali brez *Ve* gena) z izolatom T2 *V. nonalfafae* so pokazali, da nobena linija paradižnika ni občutljiva na okužbo. De Jonge in sod. (2012) so v *V. dahliae* odkrili *Ave1* protein, ki se veže na *Ve* receptor v paradižniku, s čimer sproži hipersenzitiven odgovor in rastlini omogoči odpornost na okužbo. V genomu izolata T2 glive *V. nonalfafae* se homolog *Ave1* iz *V. dahliae* ne nahaja (Javornik in sod., neobjavljen). To bi lahko bil razlog, da odporna linija paradižnika z *Ve* genom ne more prepoznati vdora patogena in bi bili simptomi okužbe izraziti. Toda pokazalo se je, da letalni patotip PV1 (genotip PG2, izolat T2) glive *V. nonalfafae* iz hmelja ne prizadane paradižnika ne glede na to, če linija vsebuje *Ve* gen za odpornost ali ne. Očitno je odziv rastlinske obrambe (splošen ali specifičen) paradižnika dovolj aktiven, da zatre napredovanje bolezni. Verjetno se vzpostavi ne-gostiteljska odpornost, ki je najbolj pogosta oblika rastlinske odpornosti, ki rastlinam omogoča trajno zaščito pred neprilagojenimi mikroorganizmi (Heath, 2000). Videli smo, da je *V. nonalfafae* (izolat T2) neprilagojen za okuževanje paradižnika.

V laboratoriju prof. Barta Thomma-e na Univerzi v Wageningenu sta bila testirana slovenska patotipa PV1 (izolat T2) in M (izolat Rec) na sortah paradižnika 'MoneyMaker' in 'Motelle'. Paradižnik je primarni gostitelj nekaterih izolatov vrste *V. dahliae*, ki se glede na jakost povzročanja simptomov na okuženih rastlinah deli na dve rasi, in sicer izolati iz rase 1 povzročajo hudo obliko obolenja, medtem ko izolati iz rase 2 povzročajo blage simptome na rastlinah brez *Ve1* pogojene odpornosti. Pri okuževanju paradižnika z obema slovenskima patotipoma je bilo ugotovljeno, da oba patotipa povzročata blage simptome okužbe in se obnašata kot *V. dahliae* rasa 2. Rasa 2 *V. dahliae* ne vsebuje *Ave1* gena, vendar so de Jonge in sod. (2012) dokazali, da s komplementacijo rase 2 z *Ave1* le-ta postane visoko agresivna na paradižniku brez *Ve1* gena, kar potrjuje, da je efektor *Ave1* tudi virulentni dejavnik. *V. nonalfafae* iz hmelja ne vsebuje homologa *Ave1* gena, zato je tudi mogoče, da je ravno odsotnost *Ave1* homologa v genomu T2 *V. nonalfafae* razlog za neobčutljivost paradižnika na okužbo z *V. nonalfafae* iz hmelja.

Iz teh skupnih rezultatov smo zaključili, da je paradižnik (*Solanum lycopersicum*) neprimerna rastlina za okuževanje z glivo *V. nonalfafae* iz hmelja in ga zato v testih umetnega okuževanja nismo uporabljali.

Naslednje testirane vrste so bile tobakovec *N. benthamiana*, jajčevec in riček. Predvsem tobakovec *N. benthamiana* se veliko uporablja v fitopatogenih testih glive *V. dahliae* (Klosterman in sod., 2011; Faino in sod., 2012; Santhanam in sod., 2013), jajčevec se uporablja redko (Tzima in sod., 2011; 2012), uporabe rička v fitopatogenih testih pa v

literaturi nismo zasledili. Naša odločitev za preizkušanje rička v testih umetnega okuževanja je temeljila na predhodnih opazovanjih, da *V. nonalfalfa*e okužuje to rastlinsko vrsto (Radišek, osebna komunikacija). Za test umetnega okuževanja rastlin smo uporabili oba patotipa *V. nonalfalfa*e, in sicer letalni patotip PV1 (genotip PG2, izolat T2) ter blagi patotip M (genotip PG1, izolat Rec). Izkazalo se je, da med patotipoma ni razlike v povzročenih simptomih na testnih rastlinah, saj oba patotipa povzročata hudo obliko obolenja.

To je v nasprotju z opažanji pojava bolezenskih znamenj, ki jih oba patotipa povzročata na primarni gostiteljski rastlini hmelju. Blagi patotip M (genotip PG1) povzroča namreč na okuženih rastlinah hmelja blaga bolezenska znamenja, npr. rumenenje ter venenje listov, okužene rastline pa ne propadejo in lahko rastejo naprej, letalni patotip PV1 (genotip PG2) pa povzroča huda bolezenska znamenja in tudi odmrtje rastline.

Glede na videne rezultate lahko sklepamo, da so tobakovec, jajčivec in riček enako občutljive vrste tako za letalni kot tudi blagi patotip glive *V. nonalfalfa*e iz hmelja. Torej je za rastline tudi okužba z blagim patotipom prevelik stres, da bi lahko preživele oz. kažejo hudo obliko obolenja. Vse tri vrste ne reagirajo na okužbo z *V. nonalfalfa*e na enak način kot primarni gostitelj hmelj, zato smo zaključili, da niso primerne za uporabo v testih umetnega okuževanja z glivo *V. nonalfalfa*e. Na tobakovcu smo opravili še nekaj dodatnih testiranj, kjer smo rastline umetno okuževali z nekaterimi delecijskimi mutantmi, ki so na primarnem gostitelju hmelju zaradi izbitja tarčnega gena izkazovali zmanjšano virulenco. Preizkušeni mutantni na tobakovcu niso kazali pojava zmanjšanih simptomov, ampak so okužene rastline kazale hude znake obolenja, ki so bili podobni simptomom, ki jih je povzročil divji tip glive. Zaključili smo, da se tobakovec ne zmore braniti pred okužbo z glivo, ne glede na to, če so rastline okužene z blagim patotipom ali delecijskimi mutantmi, ki ne vsebujejo za virulenco pomembnega tarčnega gena. Izkazalo se je, da je že sama prisotnost glive prevelik stres in povzroči propad rastline.

Hmelj kot primarni gostitelj določa vzorec odziva na okužbo z blagim in letalnim patotipom glive *V. nonalfalfa*e. Primerjava naših rezultatov umetnega okuževanja paradižnika, tobakovca *N. benthamiana*, jajčevca, rička in hmelja z *V. nonalfalfa*e je razkrila, da se rastline zelo različno odzivajo na okužbo. Medtem ko je paradižnik neobčutljiv že na letalni patotip *V. nonalfalfa*e, so tobakovec, jajčivec in riček občutljivi tako na letalni kot tudi na blagi patotip *V. nonalfalfa*e. Hmelj se na okužbo odziva različno, saj blagi patotip povzroča blago obliko obolenja, medtem ko letalni patotip rastline ubije.

Pojav, ko isti izolat v različnih gostiteljskih rastlinskih vrstah povzroča različne stopnje bolezenskega obolenja ali pa rastlinske vrste sploh ne okužuje, se imenuje gostiteljska ali fiziološka specializacija in je poznan tudi pri drugih izolatih iz vrst rodu *Verticillium*. Gostiteljska specializacija omogoča prilaganje organizmov na njihovo okolje (Fradin in Thomma, 2006).

Pri nekaterih drugih rodovih fitopatogenih gliv najdemo fiziološko specializirane skupine, ki so strogo vezane na samo določene gostiteljske rastline, npr. pri glivah iz rodu *Fusarium*, kjer poznamo več gostiteljsko specializiranih form (*formae specialis*) in naprej fizioloških ras. Pri vrstah iz rodu *Verticillium* pa ne poznamo takih fiziološko

specializiranih skupin, kar pomeni, da lahko isti izolati na več različnih gostiteljih povzročajo pojav bolezenskih znamenj, vendar so na splošno bolezenska znamenja na primarnih gostiteljih bolj izrazita (Bhat in Subbarao, 1999).

Primer so izolati *V. dahliae*, ki okužujejo bombaževec. Delijo se na letalne (angl. defoliating) in blage (angl. non-defoliating). Korolev in sod. (2008) so testirali patogenost *V. dahliae* iz bombaževca na sedmih različnih vrstah gostiteljskih rastlin. Ugotovili so, da letalni izolati najbolj prizadenejo gostiteljsko rastlino bombaževec in okrasno rastlino rožnatni slez (*Hibiscus esculentus*), medtem ko paradižnik in jajčevec nista občutljiva na okužbo. V splošnem so opazili, da letalni izolati povzročajo bolj hude oblike obolenja od blagih izolatov. Za izolate iz bombaževca je znana tudi navzkrižna patogenost na oljko, saj lahko letalni in blagi izolati povzročajo hude oblike obolenj in ekonomsko škodo na obeh gostiteljih (Mercado-Blanco in sod., 2002). Tudi številni drugi raziskovalci so načrtno preizkušali ali v svojih študijah opazili gostiteljsko specializacijo *Verticillium* spp. (Bhat in Subbarao, 1999; Zeise in Tiedemann, 2002; Alkher in sod., 2009; Klosterman in sod., 2011; Santhanam in sod., 2013).

Visoko stopnjo gostiteljske specializacije znotraj rodu *Verticillium* izražajo izolati *V. alfalfaе*, ki so patogeni samo na lucerni in v večini primerov ne povzročajo bolezenskih znamenj na ostalih gostiteljskih rastlinskih vrstah iz rodu *Verticillium* in obratno, izolati iz ostalih gostiteljskih rastlin ne povzročajo uvelosti lucerne (Heale, 1985). Lucerna je zaenkrat edini odkriti gostitelj vrste *V. alfalfaе* (Inderbitzin in sod., 2011a). Zelo ozko gostiteljsko specializacijo imajo tudi izolati vrste *V. longisporum*, ki okužujejo samo rastlinske vrste iz družine križnic (Zeise in Tiedemann, 2002; Inderbitzin in sod., 2011a).

Ozka gostiteljska specializacija, ko nek patotip okužuje samo enega ali majhno število gostiteljev, verjetno nastane zaradi pojava, ko se takšen izolat dalje časovno obdobje in brez prekinitev nahaja v enem gostitelju (Daayf, 2015). Zaradi tega se lahko oblikujejo visoko agresivne oblike (Okoli in sod., 1994), ki se uspešno prilagodijo na neko okolje. V ozadju nastanka gostiteljske specializacije so različni genetski mehanizmi (de Jonge in sod., 2013), ki doprinesejo k nastanku novih patotipov, saj predstavljajo pomemben vir genetske variabilnosti. Poleg fiziološke specializacije predstavljajo vir variabilnosti pri nastanku novih patotipov tudi migracije ali vnos patogenov iz drugih pridelovalnih območij (Burton in Silk, 1997).

5.3 VPLIV KANDIDATNIH VIRULENTNIH GENOV NA VIRULENCO GLIVE *V. nonalfalfaе*

V nalogi smo izbrali skupno 16 kandidatnih virulentnih genov iz patotipa PV1 glive *V. nonalfalfaе* za funkcionalno analizo. Od tega nam je za 12 kandidatnih genov uspelo pridobiti delecijске mutante, katere smo v nadaljevanju testirali na primarni gostiteljski rastlini hmelju. Za okuževanje smo vedno uporabili neodporni kultivar 'Celeia', ki pri okužbi z letalnim patotipom PV1 glive *V. nonalfalfaе* izkazuje hudo obliko bolezenskih znamenj. Na podlagi ocen bolezenskih znamenj, pridobljenih v določenih časovnih točkah, smo določili rAUDPC vrednosti, s katerimi smo opisali virulenco pri posameznem izolatu na podlagi hitrosti napredovanja bolezni. Z ustrezno statistično analizo smo ugotovljali,

kakšna je virulenta delecijskih mutantov v primerjavi z virulenco divjega tipa. Rezultati testov umetnega okuževanja hmelja z delecijskimi mutantami kažejo, da se je dvema mutantoma virulenta povečala (delecijska mutanta za gena *VnaHYP07.546* in *Vna9gUN.496*), štirim mutantom se virulenta ni spremenila (delecijski mutant za gene *VnaCBD8.213*, *Vna8gUN.246*, *Vna10g4.803* in *Vna11g4.791*), šestim mutantom pa se je virulenta zmanjšala (delecijski mutant za gene *VnaPRX1.1277*, *VnaSSP4.2*, *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792* in *Vna12gUN.279*). V razpravi sta obsežneje obravnavana *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* proteina.

5.3.1 *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* sta nova virulentna dejavnika v letalnem patotipu PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa*e

Virulentni dejavniki iz gliv in oomicet vplivajo na fiziologijo gostiteljev, najpogosteje z zaviranjem ali uničenjem obrambnega odziva gostitelja. Zaradi tega razloga jih morajo glive in oomicete izločati v svoje okolje, ko napadejo rastlino. Listni apopolast in ksilemski sok okuženih rastlin sta zato zelo dober vir molekul, ki jih patogeni ob invaziji izločajo v rastline (Rep in sod., 2002; Houterman in sod., 2007). S proteomsko analizo proteinov iz ksilemskega soka hmelja po okužbi z letalnim patotipom PV1 glive *V. nonalfalfa*e so bili določeni trije proteini: alfa-arabinofuranozidaza (*VnaAbf4.216*), peroksidaza (*VnaPRX1.1277*) in hipotetični protein (*VnaSSP4.2*) (Mandelc, 2010). *VnaAbf4.216* je eden od številnih encimov za razgradnjo rastlinskih celičnih sten (CWDE). Isti encim je bil najden tudi v drugih študijah ksilemskega proteoma v okviru raziskav rastlinskih bolezni, npr. pri okužbi z glivami *Sclerotinia sclerotiorum* (Yajima in Kav, 2006), *V. longisporum* (Floerl in sod., 2008) in *F. oxysporum* (Houterman in sod., 2007). Identifikacija encima *VnaAbf4.216* v proteomu ni bila presenečenje, saj so CWDE znani virulentni dejavniki (Walton, 1994), ki jih fitopatogene glive izločajo v apoplast z namenom razgradnje celične stene gostitelja in pridobitve hraniha v obliki ogljikovih hidratov (Kubicek in sod., 2014). Ker se v genomu izolata T2 glive *V. nonalfalfa*e nahajajo širje homologi (Javornik in sod., neobjavljeno), funkcionalne analize z metodo izbijanja gena za ta kandidatni virulentni protein nismo izvajali.

Izbite genov *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* iz genoma *V. nonalfalfa*e izolata T2 pa je imelo vidne učinke na virulenco. Oba delecijska mutanta iz preliminarne poskusa okuževanja hmelja ($\Delta VnaPRX1.1277-1$ in $\Delta VnaSSP4.2-2$) sta imela statistično značilno različno (manjšo) povprečno rAUDPC vrednost od divjega tipa. To pomeni, da sta imela zmanjšano virulenco, saj je bolezen napreduvala počasneje kot pa pri divjem tipu. V ponovljenem poskusu okuževanja hmelja sta ista mutanta izkazovala tudi nižjo povprečno rAUDPC vrednost, vendar razlika ni bila statistično značilna. Predpostavljam, da v tem eksperimentu virulenta delecijskih mutantov ni bila statistično značilno nižja od divjega tipa zaradi specifičnih pogojev poskusa: a) čas okuževanja je bil september, ko rastline že pričnejo prehajati v dormantno fazo, se težje odzivajo na spremembe v okolju in je lahko že sam postopek okuževanja zelo stresen, zato lahko tudi iz tega razloga propadejo; b) rastline so v pozni jeseni že v slabih fizioloških kondicijah in se težko borijo proti napadu patogena; c) rastline rastejo manj bujno kot npr. v začetku pomlad, zaradi česar je ocenjevanje bolezenskih znamenj še bolj subjektivno in podvrženo napakam. Vendar pa sta biološki ponovitvi $\Delta VnaPRX1.1277-2$ in $\Delta VnaSSP4.2-1$ izkazovala signifikantno znižano

virulenco v primerjavi z divjim tipom, s čimer smo potrdili opažanje iz preliminarnega testa, da sta gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* vpletne v virulenco *V. nonalfalfa*e izolata T2. Za potrditev tega opažanja smo v fitopatogene teste vključili še komplemente za oba gena. V fitopatogenih testih se komplementacijska transformacija uporablja kot dodatni test potrditve vpletjenosti nekega gena v virulenco. Pri testu umetnega okuževanja hmelja s komplementacijskimi mutanti za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* smo ugotovili, da ni bilo razlike v virulenci med komplementacijskimi mutanti in divjim tipom. Ti skupni rezultati kažejo, da sta gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* virulentna dejavnika, saj sta udeležena v virulenco izolata T2 glive *V. nonalfalfa*e.

Verjetno je predpogoj, da ima kandidatni virulentni gen vlogo v virulenci, visoka ekspresija gena v gostitelju v času okužbe (de Jonge, 2012). Z metodo kvantitativnega PCR v realnem času (RT-qPCR) smo preverjali, ali gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* na nivoju genske ekspresije sledita tej domnevi. Izražanje genov smo preverjali 6, 12, 18 in 30 dni po okuževanju občutljivega kultivarja hmelja z letalnim patotipom PV1 glive *V. nonalfalfa*e. Za oba gena je opaziti enak vzorec izražanja, in sicer naraščanje do točke 18 dpi, ko imata oba najvišjo ekspresijo, nakar v zadnji točki (30 dpi) ekspresija obeh genov rahlo pada, vendar gena ostajata visoko izražena v primerjavi s prvima dvema točkama. Visoka ekspresija obeh genov v časovni točki 30 dni po okuževanju sovpada s časom vzorčenja ksilemskih proteinov iz rastlin hmeljev, ki je bilo tudi 30 dni po okuževanju, zato visoka ekspresija obeh genov v tej točki ni nepričakovana. Opažanje, da se med kolonizacijo gostitelja izražanje virulentnih genov povečuje (de Jonge in sod., 2011), drži tudi za gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2* ter dodatno potrjuje njuno vpletjenost v virulenco glive *V. nonalfalfa*e patotipa PV1. Lastnost virulentnih dejavnikov, da so *in planta* visoko izraženi, je bila opažena tudi pri drugih potrjenih virulentnih dejavnikih v *Verticillium* spp. (Santhanam in sod., 2012; Santhanam in Thomma, 2013; de Jonge in sod., 2013; Zhou in sod., 2012).

Ker sta se oba gena izkazala kot dobra kandidatna virulentna gena, katerih vlogo v virulenci smo z različnimi testi tudi potrdili, smo gena še bioinformacijsko okarakterizirali z nekaj enostavnimi orodji. Zanimivo je, da se gena ne nahajata samo v letalnem patotipu PV1 (genotip PG2), ampak se homologa nahaja tudi v blagem patotipu M (genotip PG1) *V. nonalfalfa*e (Javornik in sod., neobjavljeno). To pomeni, da gena nista patotip specifična znotraj vrste *V. nonalfalfa*e.

Protein *VnaPRX1.1277* je bil na podlagi analize strukture identificiran kot ne-živalska hem-vsebujoča lignin-peroksidaza tipa II, ki za svoje delovanje potrebuje H_2O_2 . Peroksidaze so encimi, ki uporabljajo vodikov peroksid za svoje delovanje. Peroksidaze, ki jih fitopatogene glive izločajo v okolje v času okužbe, v večini primerov ščitijo glivo pred vodikovim peroksidom iz gostiteljske rastline (Meyer in sod., 2001), ki ga rastlina izloča kot del PTI obrambnega odziva na okužbo (Medentsev in sod., 2001). Če hočejo glive nadaljevati kolonizacijo, morajo uspešno zatreći primarni splošni obrambni odziv, ki se pojavi med drugim tudi v obliki sproščanja ROS (Doehlemann in Hemetsberger, 2013). Poznanih je več primerov peroksidaz in katalaz, ki neposredno ščitijo glivo z odstranjevanjem rastlinskega H_2O_2 . Odkrite so bile v glivah *V. longisporum* (Singh in sod., 2012), *Claviceps purpurea* (Garre in sod., 1998), *Candida albicans* (Wysong in sod., 1998) *A. tumefaciens* (Xu in Pan, 2000), *M. grisea* (Chi in sod., 2009; Mir in sod., 2015) in

drugih. VnaPRX1.1277 bi lahko bil protein, vpleten v zaščito *V. nonalfalfa*e pred rastlinskim vodikovim peroksidom.

Lignin-peroksidaze so encimi, ki modificirajo strukturo lignina (Fernández-Fueyo in sod., 2012). Fitopatogena gliva *Fusarium solani* vsebuje lignin-peroksidazo, ki razgrajuje lignin v celičnih stenah rastlinskih celic in se tako lateralno širi po gostitelju (Lozovaya in sod., 2006), po dodatku H₂O₂ pa je aktivnost encima močno povečana (Obruca in sod., 2012), kar kaže na dvojno vlogo encima v patogenosti glive, torej odstranjevanje H₂O₂ kot del glivne obrambe in razgrajevanje celičnih sten gostiteljskih celic z namenom širjenja glive v sosednja tkiva.

Številne rastlinske vrste kot odgovor na okužbo z glivami iz rodu *Verticillium* ojačajo celične stene s sintezo različnih komponent, med njimi tudi lignina. Pri okužbi z *V. longisporum* je bila opažena obsežna lignifikacija celic kot obrambni odziv rastline pri vrstah *Brassica napus* (Eynck in sod., 2009) in *A. thaliana* (Floerl in sod., 2012). Prav tako se številne druge rastline s povečanim odlaganjem lignina v celične stene odzovejo na okužbo z *Verticillium* spp., npr. paprika (Pomar in sod., 2004), bombaževec (Smit in Dubery, 1997; Xu in sod., 2011), cvetača in brokoli (Njoroge in sod., 2011) ter paradižnik (Gayoso in sod., 2010).

Tudi za hmelj je bilo potrjeno, da se ob okužbi z *V. nonalfalfa*e v celične stene korenin in steba povečano vgrajuje lignin (Cregeen in sod., 2015). Na podlagi poznanih dejstev o peroksidazah in lignin-peroksidazah iz drugih fitopatogenih vrst gliv predpostavljam, da je protein VnaPRX1.1277 ne-živalska hem-vsebujoča lignin-peroksidaza tipa II, ki glivo ščiti pred toksičnim delovanjem rastlinskega H₂O₂, obenem pa isti H₂O₂ porablja za svoje delovanje pri razgrajevanju lignina in širjenju po rastlini. Encim je nujno potreben za vzpostavitev normalne ravni virulence *V. nonalfalfa*e, kar smo ugotovili s fitopatogenimi testi.

VnaSSP4.2 je majhen protein z neznano funkcijo. Edini homologni protein se nahaja v *V. alfalfa*e (95 % identičnost, 99 % pokritost), v *V. dahliae* se nahajata še dva manj podobna proteina. Za nobenega od teh proteinov funkcija ni znana. V ostalih glivnih genomih ni homolognih proteinov. Pri pregledu proteina, ali je v katerih lastnostih podoben znanim efektorjem, smo ugotovili, da vsebuje dva cisteinska ostanka in da ne vsebuje nobenih znanih proteinskih domen. Vsebuje še signalni peptid, zaradi katerega je tudi lahko bil določen *in planta*. VnaSSP4.2 protein je bil določen tudi v ekstracelularnem proteomu (sekretomu) dveh letalnih patotipov *V. nonalfalfa*e, ki sta rasla v tekočem ksilemskem gojišču, ki simulira hranične razmere v ksilemskem soku rastline. Izkazalo se je, da tako gojišče inducira sekrecijo VnaSSP4.2 proteina iz glive v okolje (Mandelc in Javornik, 2015). Lastnosti VnaSSP4.2 proteina, kot so majhnost proteina, prisotnost več kot enega cisteinskega aminokislinskega ostanka v primarni strukturi, neznana funkcija, prisotnost signalnega peptida in visoko *in planta* izražanje, odsotnost poznanih proteinskih domen ter zelo malo zadetkov homolognih proteinov v bazah glivnih proteinov so lastnosti, ki so skupne številnim efektorskim proteinom (de Jonge, 2012; Doehlemann in sod., 2012; Saunders in sod., 2012). S testi umetnega okuževanja hmelja smo ugotovili, da je protein pomemben za virulenco, saj se je virulenta delecijskim mutantom signifikantno zmanjšala

v primerjavi z divjim tipom. Povrnjena virulenta komplementacijskih mutantov je bila dodatna potrditev, da ima gen viden vpliv na virulenco *V. nonalfalfa*e izolata T2.

Homologih proteinov za VnaSSP4.2 izven rodu *Verticillium* ni. Tudi proteina Six2 in Six3, ki so ju Houterman in sod. (2007) pri proteomskej analizi ksilema paradižnika po okužbi z glivo *F. oxysporum* identificirali na podobni poziciji v istem pH območju v proteinskem gelu, ne kažeta podobnosti v aminokislinskem zaporedju z VnaSSP4.2. Prav tako ni bilo v genomih *V. dahliae* (izolat VdLs17) in *V. alfalfa*e (izolat VaMs.102) odkritih homologov Six proteinov (Klosterman in sod., 2011). Vseeno pa je zanimiva primerjava med Six3 in VnaSSP4.2. Namreč tudi Six3 je majhen (15,7 kDa) in bazičen protein, ki ga *F. oxysporum* izloča *in planta*. Prav tako vsebuje dva cisteinska ostanka. Tudi udeleženost Six3 proteina v virulenci patogena je bila potrjena s funkcijsko analizo in testi umetnega okuževanja paradižnika (Houterman in sod., 2009). Toda za Six3 je poznana funkcija, in sicer je Six3 efektor, ki se v paradižniku veže na receptor I-2 (R gen), kar omogoča odpornost rastlin na patogena, zato je bil protein tudi preimenovan v Avr2 (Houterman in sod., 2009). Za Six3 (Avr2) je bilo dokazano, da se mora prenesti v jedro rastlinske celice, da lahko pride do povezave z I-2 receptorjem (Ma in sod., 2013). V genomu *F. oxysporum* se nahaja 14 predvidenih Six efektorjev (de Sain in Rep, 2015). Do sedaj je bila avirulentna (Avr) funkcija potrjena za štiri (Six1, Six3, Six4 in Six6) (Rep in sod., 2004; Houterman in sod., 2009; Houterman in sod., 2008; Gawehts in Houterman, 2014). Za VnaSSP4.2, ki je zaenkrat edini določen protein iz skupine SSP (angl. small secreted proteins) proteinov v *V. nonalfalfa*e, mesto delovanja kot tudi funkcija nista poznani.

5.3.2 Gen *VnaCBD8.213* ne vpliva na virulenco letalnega patotipu PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfa*e, gen *VnaHYPO7.546* ima negativen vpliv

Na podlagi druge *in planta* analize, ki je bila izvedena na nivoju transkriptomov neodpornega kultivarja 'Celeia' in odpornega kultivarja hmelja 'Wye Target', okuženih z letalnim patotipom PV1 glive *V. nonalfalfa*e (Javornik Cregeen, 2010), sta bila za funkcijsko analizo izbrana gena *VnaCBD8.213* (gen za lektin z domeno za vezavo hitina) in *VnaHYPO7.546* (ohranjen hipotetični protein).

VnaCBD8.213 je na nukleotidnem nivoju visoko podoben lektinskemu proteinu iz *V. alfalfa*e VaMs.102, katerega predvidena funkcija je vezava hitina (Klosterman in sod., 2011). *VnaCBD8.213* vsebuje proteinsko domeno CBM18. Funkcija CBM18 domene je vezava hitinskih molekul (Wright in sod., 1991). Vezavo prostega hitina, ki se v okuženi rastlini pojavi po razgradnji glivnih celičnih sten zaradi delovanja rastlinskih hitinaz, opravlja glivni LysM efektorji, ki na ta način preprečijo PTI in omogočijo glivi nadaljnjo kolonizacijo (Kombrink in Thomma, 2013). V *Cladosporium fulvum* je bil odkrit lektinski efektor Avr4 s CBM14 domeno, ki tudi veže hitin. Vendar pa Avr4 ne veže prostega hitina, kot to počnejo LysM efektorji iz številnih glivnih vrst (de Jonge in Thomma, 2009), med njimi tudi Ecp6 iz *C. fulvum* (de Jonge in sod., 2010), ampak se efektor preko CBM14 veže na hitin v glivni celični steni in glivo fizično varuje pred delovanjem rastlinskih hitinaz (van den Burg in sod., 2006; Stergiopoulos in sod., 2010), ki napadajo in razgrajujejo hitin v celični steni glivnih patogenov (Schlumbaum in sod., 1986). *VnaCBD8.213* je bil zelo dober kandidatni virulentni protein predvsem zaradi dejstva, ker vsebuje kar 6 CBM18

domen za vezavo hitina (Javornik in sod., neobjavljen), kar kaže na veliko verjetnost, da je protein vpletен в virulenco *V. nonalfalfaе* z vezavo hitina. Rastlinski receptorji za zaznavanje hitina so široko razširjeni med različnimi rastlinskimi vrstami, zato so glivni efektorji za vezavo hitina verjetno ključnega pomena za vzpostavitev okužbe (Kombrink, 2014). Vendar pa smo s testi umetnega okuževanja hmelja z delecijskima mutantoma ugotovili, da gen ni vpletен в virulenco.

Cregeen in sod. (2015) so pokazali, da je ekspresija gena *VnaCBD8.213* (TDF HO059232) v neodpornem kultivarju enakomerno naraščala vse do točke 30 dpi. Relativno visoka ekspresija gena je bila opazna tudi v odpornem kultivarju (naraščanje do točke 20 dpi in nato upad v točki 30 dpi), kar je prenenetljivo, saj je količina glivne biomase v odpornem kultivarju zelo nizka. *VnaCBD8.213* kaže inducirano izražanje znotraj gostiteljske rastline, kar je lastnost virulentnih dejavnikov, za katere je značilna povečana *in planta* ekspresija (de Jonge, 2012). Za štiri osnovne LysM efektorje iz *V. dahliae* je bilo ugotovljeno, da so med rastjo v tobakovcu ali paradižniku zelo malo izraženi ali pa ekspresije sploh ni. S testi umetnega okuževanja gostiteljskih rastlin je bilo ugotovljeno, da izbitje posameznega gena ni vplivalo na virulenco mutantov (Kombrink, 2014), kar potrjuje hipotezo, da je povečana ekspresija v procesu kolonizacije rastline lastnost virulentnih dejavnikov.

V genomu *V. nonalfalfaе* se nahaja devet domnevnih proteinov z LysM domeno in devet domnevnih proteinov s CBM18 domeno (Javornik in sod., neobjavljen). Mogoče je, da bi vlogo *VnaCBD8.213* proteina prevzeli funkcionalni homologi (LysM proteini ali drugi proteini z CBM18 domeno), ki opravljajo podobno funkcijo, zato izbitje ni imelo vpliva. Princip delovanja funkcionalnih homologov se namreč pojavlja tudi v drugih skupinah proteinov, na primer v primeru CWDE encimov, kjer veliko različnih encimov opravlja enako ali podobno funkcijo, zato lahko vlogo posameznega CWDE encima v patogenezi nadomestijo drugi encimi (Tzima in sod., 2011). Obstaja tudi možnost, da *VnaCBD8.213* prispeva k delovanju *V. nonalfalfaе* v drugih fazah razvojnega kroga glive, ki ga nismo preučevali, npr. v času saprofitske faze ali v obdobju nastajanja trajnega micelija, zato izbitje gena ni imelo vpliva na glivo, ko se je nahajala v parazitski fazi razvojnega cikla med kolonizacijo gostitelja. Na isti način lahko delujejo tudi LysM efektorji iz *V. dahliae* (Kombrink, 2014).

Tudi *VnaHYPO7.546* je na nukleotidnem nivoju zelo podoben (96 % identičnost) proteinu iz *V. alfalfaе* VaMs.102 (Klosterman in sod., 2011). Gre za ohranjen hipotetični protein, katerega funkcija ni znana. Orodje Blast2go, ki je namenjeno funkcionalni anotaciji zaporedij in analizi podatkov (Conesa in sod., 2005), predvidi za *VnaHYPO7.546* protein tri funkcije, in sicer udeleženost v metabolizmu glutamina, transferazno aktivnost in regulacijo transkripcije (Cregeen in sod., 2015). Umetno okuževanje hmelja z delecijskima mutantoma za gen *VnaHYPO7.546* je pokazalo, da mutanta povzročata bolj izrazita bolezenska znamenja kot divji tip, razlika je bila statistično značilna. To bi pomenilo, da je *VnaHYPO7.546* negativno udeležen v glivno virulenco. O podobnem učinku, ko so delecijski mutanti izkazovali povečano virulenco na gostiteljski rastlini, poročata tudi Klimes in Dobinson (2006), ki sta proučevali hidrofobinski gen *VDH1* iz *V. dahliae*. Kot možen razlog navajata dejstvo, da bi lahko bili hidrofobini vpletjeni v prepoznavo in zaznavo patogena s strani rastline in vzpostavitvi splošnega ali specifičnega obrambnega odziva. Pazzagli in sod. (1999) so namreč za hidrofobinski protein cerato-platanin iz

fitopatogene glive *Ceratocystis fimbriata* ugotovili, da po infiltraciji v liste tobakovca cerato-platanin izzove obrambne odgovore specifičnega nivoja obrambe (celične nekroze). Nanos proteina na površino listov platane pa privede do splošnega odziva (izločanje fitoaleksinov). Klimes in Dobinson (2006) razlagata, da bi lahko odsotnost hidrofobinskega gena pomenila, da rastlina ne prepozna vstopa patogena in zato ne vzpostavi obrambnega odgovora, zaradi česar imajo mutanti z izbitim genom povečano virulenco.

Povečana virulanca delecijskih mutantov pa je tipičen pojav pri potrjevanju Avr genov oz. efektorjev. Če se namreč z delecijskim mutantom za predvideni Avr gen okužuje linija gostiteljske rastline brez ujemajočega R gena (neodpora) in rastlina kaže znake obolenja, to pomeni, da rastlina ne zazna patogena in ne vzpostavi specifičnega odziva kot v primeru divjega tipa, kjer pride do prepozname in vezave Avr z R genom. Na ta način je bila potrjena specifična interakcija Ave1 efektorja in Ve receptorja v *V. dahliae* (de Jonge in sod., 2012) ter Six3 (Avr2) efektorja in I-2 receptorja v *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Houterman in sod., 2009). Povečano virulenco *VnaHYPO7.546* delecijskih mutantov bi torej lahko povezali z odsotnostjo prepozname tega proteina s strani rastlinskega receptorja. *VnaHYPO7.546* bi lahko bil aviruletni protein, ki ga prepozna rastlinski receptor in s tem sproži enega izmed rezistenčnih odzivov v rastlini. Za razjasnitve vloge *VnaHYPO7.546* proteina v virulenci bodo vsekakor potrebne nadaljne študije, ob tem pa bo potrebno opazovati spremembe v rasti micelija (bolj bujna rast) in spremembe v konidiaciiji *VnaHYPO7.546* delecijskih mutantov (večja konidiacija), ki bi tudi lahko bile razlog za povečano virulenco mutanta. Konidiacija je pomembna za virulenco patogena, saj so sevi, ki tvorijo večje količine konidijev, običajno bolj agresivni (Fradin in Thomma, 2006). Toda to ni pravilo, saj tako povezava ni bila opažena v primeru mutantov *V. dahliae* z izbitim genov *VdSNF1* (Tzima in sod., 2011) ali *VGB* (Tzima in sod., 2012), kjer so imeli mutantni kljub povečani konidiaciji znižano virulenco.

5.3.3 In silico določeni geni kažejo različne vplive na virulenco patotipa PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfaе*

Kandidatni virulentni geni, določeni *in silico*, se nahajajo na linijsko oz. patotip specifični regiji v genomu letalnega patotipa PV1 (genotip PG2) glive *V. nonalfalfaе*, izolata T2. Gre za regijo, ki je blagi patotip M glive *V. nonalfalfaе* ne vsebuje (Javornik in sod., neobjavljen). Linijsko specifične regije nastanejo z mehanizmom preurejanja kromosomov, kjer pride do duplikacij, delecij, inverzij in translokacij delov kromosomov (Seidl in Thomma, 2014). Na linijsko specifičnih regijah se običajno nahajajo geni za efektorje in druge virulentne dejavnike, ni pa nujno, saj se lahko s patogenezo povezani geni nahajajo tudi na osnovnem genomu (de Jonge in sod., 2013). Efektorji lahko nastanejo z duplikacijo genov in kasnejšimi mutacijami, kar vodi v pojav novih efektorjev s spremenjenimi lastnostmi (Roussel in sod., 2011). Drug način pridobivanja novih efektorjev je preko horizontalnega genskega prenosa (Richards, 2011). Genomske spremembe omogočajo patogenu hitrejšo prilagoditev in specializacijo na novega gostitelja (Raffaele in Kamoun, 2012; de Jonge in sod., 2013; Seidl in Thomma, 2014).

Primerjalne analize celotnih genomskeih zaporedij patogenih gliv so odkrile nove vpoglede v patogenost gliv in njihov razvoj. Odkrito je bilo, da se lahko s patogenezo povezani geni nahajajo na dodatnih (patogenih) kromosomih, na razširjeni subtelomerni regiji ali pa na medgenski regiji kromosoma ter da se nahajajo v gručah (Ma in sod., 2010; Raffaele in Kamoun, 2012).

S komperativno genomiko in *in silico* pristopom je bilo odkritih in nato v funkcijskih analizah potrjenih že več virulentnih dejavnikov iz *Verticillium* spp. Klosterman in sod. (2011) so na podlagi primerjave genomov vrst *V. dahliae*, *V. alfalfa* in *F. oxysporum* določili gen za glukoziltransferazo in tudi potrdili vlogo v virulenci. S primerjavo genomov sevov rase 1 in rase 2 *V. dahliae* je bil odkrit efektor Ave1 iz linijsko specifične regije *V. dahliae* seva JR2 (rasa 1) (de Jonge in sod., 2012) ter dva gena za neznana sekrecijska proteina (XLOC_009059 in XLOC_008951), ki se nahajate na isti linijsko specifični regiji *V. dahliae* seva JR2 (de Jonge in sod., 2013). V opisani študiji so na enak način odkrili tudi LysM protein iz linijsko specifične regije seva *V. dahliae* VdLs.17, ki je edini od sedmih LysM proteinov neposredno vpletен v virulenco. S primerjavo genomov letalnega in blagega patotipa *V. dahliae* iz bombaževca je bila odkrita 27,1 kpb velika regija, na kateri se nahaja pet genov, med njimi tudi *VdSSP1*, in je odgovorna za visoko agresivnost letalnega patotipa *V. dahliae* iz bombaževca (Wang in sod., 2012; Liu in sod., 2013).

Namen funkcijске analize *in silico* določenih kandidatnih genov je bil potrditi vlogo v virulenci nekaj kandidatnim genom iz specifične virulentne regije patotipa PV1 glive *V. nonalfalfa*, katere bi bilo smiselno v nadaljnjih raziskavah bolj podrobno preučiti na nivoju strukture in določanja natančne funkcije oz. vpleteneosti v virulenco *V. nonalfalfa*.

Pri testih umetnega okuževanja hmelja smo ugotovili, da izbitje genov *Vna8gUN.246*, *Vna10g4.803* in *Vna11g4.791* ne vpliva na virulenco izolata T2 glive *V. nonalfalfa*, saj so mutanti povzročali enako stopnjo obolenja kot divji tip. Delecijska mutantna za gena *Vna8gUN.246* in *Vna10g4.803* (biološki ponovitvi) kažeta medsebojno izenačenost v simptomih, ki jih povzročata na hmelju. Oba imata tudi znižani stopnji konidiacije v primerjavi z divjim tipom (ocene 1 ali 2), toda frekvenca okuževanja je 80 ali 100 %. To pomeni, da zmanjšana konidiacija ni vplivala na uspešnost okuževanja testnih rastlin. V primeru, da bi imela zmanjšana konidiacija vpliv na patogenost, bi bilo uspešno okuženih manj rastlin. Predvideni protein gena *Vna8gUN.246* ima najbljžji podoben protein z oznako EGY23829 v *V. dahliae*, vendar funkcija ni znana. Predvideni protein gena *Vna10g4.803* pa je podoben proteinu z oznako EJP61982 (iz glive *Beauveria bassiana*), ki vsebuje FluG domeno. Zaradi tega razloga smo ta gen tudi izbrali za funkcijsko analizo, saj je bilo ugotovljeno, da FluG domena pomembno vpliva na sporulacijo v nitasti glivi *Aspergillus nidulans*, in sicer so mutanti brez proteina s FluG domeno izkazovali zmanjšano sporulacijo (D'Souza in sod., 2001). Stopnja sporulacija pa je lahko razlog za stopnjo agresivnosti fitopatogenih gliv (Fradin in Thomma, 2006). Tudi delecijski mutant za gen *Vna10g4.803* je imel znižano tvorbo spor, toda povezave med tem pojavom in izbitjem gena nismo proučevali. Na splošno opažamo, da ima večina delecijskih mutantov zmanjšano konidiacijo, kar pa očitno ne vpliva na stopnjo virulence.

Gen *Vna11g4.791* ima sicer nizko ekspresijo, toda v zaporedju gena se nahaja sekvenca za signalni peptid. Zaradi tega razloga je bil gen izbran za funkcijsko analizo, saj mora patogen v času okužbe virulentne dejavnike izločati v svoje okolje (Rep in sod., 2002), zato so sekretorni proteini dobri kandidati pri odkrivanju virulentnih dejavnikov. Pri genu *Vna11g4.791* prihaja do nekonsistentnosti med obema delecijskima mutantoma, saj se $\Delta Vna11g4.791\text{-}1$ statistično značilno ne razlikuje v virulenci od divjega tipa, medtem ko ima $\Delta Vna11g4.791\text{-}2$ mejno statistično značilno nižjo povprečno rAUDPC vrednost od divjega tipa. Do neponovljivosti med mutantoma lahko prihaja zaradi razlik, ki nastanejo pri procesu genske transformacije. *A. tumefaciens* lahko namreč poleg tarčne vgradnje T-DNA v genom gostitelja vgradi eno ali več dodatnih kopij DNA vključka (Michielse in sod., 2005). Če pride do naključne vgradnje v regijo, kjer se nahaja kakšen izmed genov, ki so pomembni za vitalne funkcije organizma, lahko to vpliva na spremenjen fenotip organizma (Mullins in sod., 2001) in posledično tudi na virulenco. Zanimivo je, da mutanta ne kažeta razlik v stopnji konidiacije (ocena 4) in tudi ne v frekvenci obolenja rastlin (100 %), torej verjetno do razlike v virulenci med mutantoma prihaja zaradi drugih razlogov.

Mutantoma za gen *Vna9gUN.496* se je virulanca povečala, in sicer mutantu $\Delta Vna9gUN.496\text{-}2$ statistično značilno in mutantu $\Delta Vna9gUN.496\text{-}1$ mejno statistično značilno. Ocena sporulacije obeh mutantov je bila 4, uspešno sta okužila vse v poskusu uporabljene rastline. Predvideni protein gena *Vna9gUN.496* ima najbolj podoben protein v *V. dahliae* VdLs.17, toda pokritost med proteinoma znaša samo 25 % (identičnost 99%). Ker se v nobeni podatkovni bazi ne nahaja anotiran homolog, v tem trenutku ne moremo sklepati o razlogih, zakaj se mutantoma za gen *Vna9gUN.496* virulanca poveča, je pa gen dober kandidat za študije morebitne avirulentnosti in za iskanje vezavnih tarč v gostiteljski rastlini.

Vsem delecijskim mutantom za gene *Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792* in *Vna12gUN.279* se virulanca statistično značilno zniža v primerjavi z divjim tipom. Biološki ponovitvi mutantov za gena *Vna4gUN.245* in *Vna5g9* kažeta nekonsistentnost v povzročanju virulence. *Vna4gUN.245* ima visoko podobna proteina v *V. longisporum* in *V. alfalfae* VaMs.102, kar pomeni, da gen ni specifičen samo za izolat T2 *V. nonalfalfa*e. Oba mutantna z izbitim genom *Vna4gUN.245* sta imela manjšo konidiacijo (ocena 3) in tudi zmanjšano frekvenco obolenja (80 %), ki je pa še vedno visoka in ne pokaže, da bi bila zmanjšana konidiacija razlog za zmanjšano virulenco. Kratek protein in 2 cisteina v zgradbi sta znak, da je *Vna4gUN.245* dober kandidat za nadaljnje študije pri ugotavljanju načina delovanja v virulenci. Za regijo *Vna5g9* v genomu izolata T2 *V. nonalfalfa*e z bioinformacijskimi orodji ni bil predviden noben genski model, toda regija je bila za funkcijsko analizo izbrana na podlagi visoke ekspresije in zelo visokega števila cisteinov (13). Konidiacija mutantov je bila zmanjšana (ocena 2), toda to ni vplivalo na frekvenco obolenja (90 in 100 % za prvi in drugi mutant). *Vna5g9* ima podoben protein samo v *V. dahliae* VdLs.17, podobnost pa je majhna, kar kaže na vrstno specifičnost regije za izolat T2 *V. nonalfalfa*e.

Gen *Vna6g4.792* ima najdaljše zaporedje od vseh *in silico* izbranih regij (4266 bp). Regija je bila izbrana na osnovi visoke ekspresije, na njej se pa nahaja del modela chr4_116292YY.792, za katerega je predvidena proteinska domena, podobna domeni iz protein kinaz (angl. protein kinase-like domain). Čeprav bioinformacijska orodja ne

predvidevajo več genskih modelov na regiji, smo na podlagi ekspresije sklepali, da je regija pomembna za izolat T2 glive *V. nonalfalfa*e, kar smo s testi umetnega okuževanja tudi potrdili. Pomembno je opažanje, da sta oba delecijksa mutanta za *Vna6g4.792* izkazovala izenačenost v zmanjšani virulenci. Čeprav sta imela izrazito zmanjšano konidiacijsko (ocena 1), to ni vplivalo na sposobnost okuževanja testnih rastlin (frekvenci obolenj sta bili 100 in 90 %). Na delu *Vna6g4.792* regije, kjer se nahaja del modela *chr4_116292YY.792*, smo opazili veliko podobnih proteinov iz različnih glivnih vrst, najbolj podoben je hipotetičen protein v sneti *Ustilaginoidea virens*, ki okužuje riž.

Od vseh *in silico* določenih kandidatnih genov, za katere smo s testi umetnega okuževanja hmelja ugotovili udeleženost v virulenci *V. nonalfalfa*e, ima *Vna12gUN.279* največji vpliv na virulenco. Virulanca obeh delecijskih mutantov, ki sta bila v povzročanju simptomov izenačena med sabo, je bila močno zmanjšana v primerjavi z divjim tipom ($P < 0,001$). Zanimivo je, da je gen nizko izražen, glede na ekspresijo je bil šele na 81. mestu (od 105 določenih genov), prav tako pa ne vsebuje nobenega cisteina. Gen je bil za funkcionalno analizo izbran zaradi prisotnosti signalnega peptida. Dolžina regije je 2,8 kbp in vsebuje cel genski model *chr-unplaced.279*, ki kaže podobnost s fosfoetanolamin n-metiltransferazo 3. Predviden protein modela *chr-unplaced.279* na *Vna12gUN.279* regiji kaže podobnost na proteine iz številnih drugih glivnih vrst, najbolj na protein v *V. dahliae* VdLs.17, verjetno na račun podobnih proteinskih domen. Konidiacija obeh delecijskih mutantov je nekoliko manjša glede na divji tip (ocena 4), toda mutanta sta okuževala manj rastlin, frekvenca obolenja je bila za $\Delta Vna12gUN.279-1$ 70 % in za $\Delta Vna12gUN.279-2$ samo 40 %. Iz tega lahko sklepamo, da gen *Vna12gUN.279* ni samo virulentni dejavnik, ampak je vpletjen tudi v patogenezo, saj vpliva na sposobnost okuževanja izolata T2 *V. nonalfalfa*e. Gen *Vna12gUN.279* predstavlja zelo dobrega kandidata za nadaljnje študije.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Fitopatogene glive uporabljajo virulentne dejavnike za premagovanje obrambnega sistema gostitelja in za vzpostavitev interakcije, ki glivi omogoča preživetje v gostitelju. Glive iz rodu *Verticillium* so v določenem delu razvojnega kroga paraziti, ki živijo v rastlini in ji s svojim delovanjem škodujejo, po odmrtvu gostitelja pa so saprofiti in se hranijo z njegovim odmrlim tkivom vse do tvorbe trajnih organov, ki jim omogočajo preživetje v neugodnih okoljskih pogojih in v razmerah brez hranil.

V Sloveniji je hmelj (*Humulus lupulus*) primarni gostitelj glive *V. nonalfafae*. Gliva v rastlino vstopi skozi korenine in se nato preko prevodnega sistema širi po rastlini. *V. nonalfafae* pri kolonizaciji rastline izloča različne virulentne dejavniki, ki povzročijo pojav bolezenskih znamenj, kot so rumenenje in venenje listov, rjavenja prevodnega sistema in sušenje celotne rastline. Bolezen se imenuje verticilijska uvelost hmelja in predstavlja resno grožnjo slovenski pridelavi hmelja. Za okužbo je najbolj nevaren letalni patotip PV1 (genotip PG2). Blagi patotip M (genotip PG1) povzroča milejšo obliko bolezni in s tem manjšo ekonomsko škodo.

V nalogi smo s funkcionalno analizo proučevali vlogo izbranih kandidatnih genov v virulenci *V. nonalfafae*. Kandidatni geni so bili izbrani na podlagi predhodnih proteomskeh, transkriptomskih in genomske raziskav, kjer je bil proučevan odziv gostitelja hmelja na okužbo z glivo oz. razlike med genomoma blagega in letalnega patotipa glive *V. nonalfafae*. Z metodama tarčnega izbijanja genov, doseženega z ATMT gensko transformacijo, in testi umetnega okuževanja primarne gostiteljske rastline smo opazovali vpliv kandidatnih virulentnih genov na virulenco glive *V. nonalfafae*.

ATMT (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) je metoda genske transformacije, ki se uporablja za transformacijo številnih vrst iz vseh skupin gliv. Prednost metode je na eni strani v uporabnosti, saj se lahko kot izvorni glivni material uporablja micelij ali spore in tako priprava protoplastov ni potrebna, na drugi strani pa ATMT mehanizem zagotavlja vgradnjo nizkega števila kopij vključka v genom, kar je zaželeno pri mutacijski analizi pri proučevanju različnih lastnosti, med drugim tudi mehanizmov patogenosti fitopatogenih gliv. *V. nonalfafae* je glivna vrsta, ki je tudi dovetna za tovrstno transformacijo. V našem protokolu smo za uspešno transformacijo optimizirali različne parametre, kot so količina glivnega antibiotika v seleksijskem gojišču, čas kokultivacije glivnih spor in bakterijskih celic, koncentracija glivnih spor za transformacijo ter koncentracija glukoze v indukcijskem gojišču. Uspešnost transformacije je bila 50 do 100 zraslih kolonij na 10^6 transformiranih spor, kar je primerljivo s podatki iz literature. Uspešnost komplemantacijske transformacije je bila zelo raznolika, opazili smo nekaj 10 do nekaj 100 transformantov na 10^6 spor.

Za *V. nonalfafae* je značilna gostiteljska specifičnost, kar smo opazili v testih umetnega okuževanja različnih rastlinskih vrst, s čimer smo želeli pridobiti testno rastlino za umetno okuževanje, ki bi bila v tehničnem smislu bolj primerna od sicer primarnega gostitelja

hmelja. Paradižnik se je izkazal za neobčutljivo vrsto, saj letalni patotip PV1 (genotip PG2) ne prizadene niti odporne niti neodporne linije paradižnika. Tudi testi umetnega okuževanja paradižnika z letalnim patotipom PV1 (genotip PG2) na Nizozemskem so pokazalo podobne rezultate, in sicer so ugotovili, da se slovenski PV1 patotip *V. nonalfafae* obnaša kot rasa 2 glive *V. dahliae*, ki povzroča na paradižniku le blago obliko simptomov. Pri umetnem okuževanju tobakovca *N. benthamiana*, jajčevca in rička smo ugotovili, da tako letalni kot tudi blagi patotip povzročata hudo obliko obolenja na vseh treh testnih rastlinskih vrstah. To ni v skladu z opažanjem pojava hudih oz. blagih simptomov, ki jih letalni oz. blagi patotip povzročata na primarni gostiteljski rastlini hmelju. Zato smo kot testno rastlino v testih umetnega okuževanja uporabili samo hmelj.

V. nonalfafae je vaskularni fitopatogen, zato predstavlja ksilemski sok okuženih rastlin bogat vir sekretornih molekul, ki jih patogen izloča v času okužbe za potrebe kolonizacije in premagovanje obrambnih reakcij gostitelja. Proteomska primerjava ksilemskih proteinov, izoliranih iz okuženih in neokuženih rastlin neodpornega kultivarja hmelja 'Celeia', je razkrila tri glivne proteine, ki jih je gliva obsežno izločala v ksilemski sok neodpornega kultivarja v času okužbe. Encim alfa-arabinofuranozidaza (VnaAbf4.216) je encim za razgrajevanje rastlinskih celičnih sten in ga izločajo tudi druge fitopatogene vrste gliv. Ker se v genomu *V. nonalfafae* nahajajo štiri kopije gena za VnaAbf4.216, encima nismo uporabili za funkcionalno analizo.

V isti *in planta* študiji sta bila v ksilemskem proteomu neodpornega kultivarja določena še encim lignin-preoksidaza VnaPRX1.1277 in majhni sekretorni protein VnaSSP4.2. S funkcionalno analizo genov za oba proteina smo ugotovili, da sta VnaPRX1.1277 in VnaSSP4.2 virulentna dejavnika v glivi *V. nonalfafae*, ki bistveno prispevata k vzpostavitvi normalne ravni povzročanja bolezenskih znakov na okuženih rastlinah. Poleg tega smo za proteina ugotovili, da se izražanje njunih genov s časom okužbe *in planta* povečuje, kar je lastnost virulentnih dejavnikov tudi v drugih glivah. Za VnaPRX1.1277 sklepamo, da ima dvojno vlogo, in sicer varuje glivo pred rastlinskim vodikovim peroksidom, ki nastaja kot posledica oksidativnega izbruha pri delovanju splošnega obrambnega odziva, hkrati pa encim porablja H₂O₂ za razgrajevanje lignina v rastlinskih celičnih stenah za namene lateralnega širjenja po gostitelju.

VnaSSP4.2 je podoben znanim efektorskim proteinom iz drugih gliv, saj je majhen protein, vsebuje dva cisteinska aminokislinska ostanka, ne vsebuje nobene znane proteinske domene, vsebuje signalni peptid in ga gliva v velikih količinah izloča *in planta*, nima znanih homologov izven rodu, prav tako pa funkcija proteina zaenkrat še ni znana. VnaSSP4.2 je glede na velikost, bazičnost in število cisteinskih ostankov podoben efektorju Six3 (Avr2) iz *F. oxysporum*. Po aminokislinski zgradbi si proteina nista podobna.

Iz druge predhodne *in planta* študije, ki je potekala na nivoju proučevanja transkriptoma s PV1 (genotip PG2) okuženih rastlin neodpornega kultivarja hmelja 'Celeia' in odpornega kultivarja 'Wye Target', je bilo med vsemi rastlinskimi cDNA zaporedji določenih tudi več glivnih zaporedij, ki so bile homologne genomskim sekvencam izolata T2 glive *V. nonalfafae*. Za funkcionalno analizo smo izbrali dve sekvenci, in sicer gen za lektin, ki vsebuje domeno za vezavo hitina (VnaCBD8.213) in gen za ohranjen hipotetičen protein z

neznano funkcijo (*VnaHYPO7.546*). Zaradi visoke *in planta* ekspresije, na podlagi katere sta bila gena sploh zaznana v transkriptomu hmelja, sta oba gena predstavljala dobra kandidata za preverjanje vpletenosti v virulenco glive.

Še posebej zanimiv je protein VnaCBD8.213, ki vsebuje proteinsko domeno CBM18, ki lahko veže hitin. Protein VnaCBD8.213 bi lahko bil udeležen v zaščito glive pred rastlinskimi obrambnimi mehanizmi na način, da bi se vezal na hitin v celičnih stenah glive, s čimer bi preprečil rastlinskim hitinazam razgrajevanje celičnih sten glive. V testih umetnega okuževanja z delecijskima mutantoma za gen *VnaCBD8.213* smo ugotovili, da gen ni vpletен v virulenco. Zaradi obilice drugih proteinov s hitin vezavnimi domenami v genomu *V. nonalfalfa* izolata T2 predpostavljam, da verjetno drugi proteini prevzamejo vlogo VnaCBD8.213, zaradi česar njegova odsotnost v mutantih ni opazna pri virulenci mutanta. Kljub temu, da v naši analizi vpletenosti gena *VnaCBD8.213* v virulenco *V. nonalfalfa* nismo potrdili, gen zaradi svojih lastnosti in visoke *in planta* ekspresije ostaja potencialni virulentni dejavnik, zanimiv za nadaljnje študije.

Za *VnaHYPO7.546* smo ugotovili, da delecijski mutanti povzročajo hitrejši propad okuženih rastlin v primerjavi z divjim tipom. To pomeni, da ima protein negativen vpliv na virulenco. Takšni vplivi so sicer znani iz literature, mehanizmi ozadja nastanka tega pojava pa so pojasnjeni samo pri funkcijskih analizah avirulentnih dejavnikov.

Vpliv *in planta* določenih kandidatnih virulentnih genov na virulenco ni bil nepričakovani, saj mora gliva v času okužbe uporabiti različne pristope za uspešno kolonizacijo, kar zajema povečano ekspresijo virulentnih genov in izločanje virulentnih proteinov, pomembnih za preživetje patogena v gostitelju.

Drugi način izbora kandidatnih virulentnih genov je temeljil na *in silico* pristopu, in sicer na podlagi primerjave genoma letalnega patotipa PV1 z blagim patotipom M glive *V. nonalfalfa*. Na ta način je bila določena za PV1 patotip specifična regija, na njej pa 105 predvidenih genskih modelov. Na podlagi RNA-seq podatkov, številu cisteinov v predvidenih proteinih genskih modelov, dolžini regij in prisotnosti signalne domene smo za funkcijsko analizo izbrali 12 najbolje uvrščenih genskih modelov oz. regij. Za gene *Vna1gUN*, *Vna2gUN.246*, *Vna3g4.790* in *Vna7gUN* zaradi neznanih razlogov nismo uspeli pridobiti mutantov z izbitimi kandidatnimi geni. Testi umetnega okuževanja hmelja z delecijskimi mutanti za preostalih 8 regij pa so pokazali različne rezultate. Gen *Vna9gUN.496* ima negativen vpliv na virulenco, geni *Vna8gUN.246*, *Vna10g4.803* in *Vna11g4.791* pa v virulenco niso vpleteni. Za ostale štiri gene (*Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792* in *Vna12gUN.279*) smo s testi umetnega okuževanja hmelja potrdili, da signifikantno vplivajo na virulenco letalnega patotipa *V. nonalfalfa*. Omenjeni geni prispevajo k temu, da lahko divji tip *V. nonalfalfa* (izolat T2) povzroča običajne simptome obolenja, saj so imeli delecijski mutanti statistično značilno znižano virulenco.

V doktorskem delu smo pokazali, da se na za PV1 patotip specifični regiji nahajajo geni, ki so pomembni za visoko virulenco letalnega patotipa in prispevajo k večji agresivnosti v primerjavi z blagim patotipom. Predpostavljam, da so v nalogi potrjeni geni in verjetno tudi kateri drugi zaenkrat še nepotrjeni geni iz te regije razlog za razliko v stopnji virulence med obema patotipoma.

6.2 SUMMARY

Phytopathogenic fungi secret virulence factors in order to suppress the plant defence system and to establish interactions that enable the persistence of the pathogen within the plant. *Verticillium* species live as parasites in one part of the life cycle and cause damage to their host. After the host plant is dead, they establish saprophytic growth and feed on its dead tissue. Fungi then develop a resting structure to survive adverse weather conditions and the starvation period.

In Slovenia, hop (*Humulus lupulus*) is the primary host of the fungus *V. nonalfalfa*. The fungus enters the plant through the roots and uses the vascular system to spread throughout the plant. *V. nonalfalfa* secrets various virulence factors during plant colonization, leading to the emergence of disease symptoms such as yellowing and wilting of leaves, browning of the vascular system and wilting of the entire plant. The disease is called Verticillium wilt and it poses a serious threat to the Slovenian production of hops. Lethal pathotype PV1 of *V. nonalfalfa* is the causal agent of severe disease symptoms. Mild pathotype M causes only mild symptoms and infection is not considered to be a major economic problem in hop production.

In this study we used functional analysis to examine the role of selected candidate genes in the virulence of *V. nonalfalfa*. Candidate genes were selected by previous proteomic and transcriptomic research into fungus - hop interactions and by comparative genomics of lethal and mild pathotypes. Targeted gene deletion by the ATMT method and phytopathogenicity essay were used to study the effect of candidate virulence genes in the virulence of the fungus *V. nonalfalfa*.

ATMT (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) is method of genetic transformation that is used for the transformation of many species from all groups of fungi. The advantage of the method is on the one hand its usability, since mycelium or spores can be used as starting transformation material and the preparation of protoplasts is not necessary. On the other hand, the ATMT mechanism ensures the integration of a low number of copies of the insert in the genome, which is desirable for mutation analysis in the study of various features, including the mechanisms of pathogenicity of phytopathogenic fungi. *V. nonalfalfa* can be transformed by the ATMT method. Various parameters were optimized in our protocol of ATMT transformation, including the amount of fungal antibiotic in the selection medium, time for co-cultivation of fungal spores and bacterial cells, the concentration of the fungal spores used for transformation and the glucose concentration in the induction medium. The transformation efficiency was 50 to 100 transformants per 10^6 transformed spores, which is comparable with data from the literature. The complementation transformation efficiency was some 10 to some 100 transformants per 10^6 transformed spores.

V. nonalfalfa exhibit host specificity, which was also confirmed in our phytopathogenicity essay, in which we artificially infected various host plants in order to obtain a more suitable host plant than hop for the phytopathogenicity essay. Tomato proved to be insensitive to infection, even with lethal pathotype PV1, which did not affect either

susceptible or resistant tomato plant lines. What is more, phytopathogenicity essay of lethal pathotype PV1 on tomato in another experiment in The Netherlands showed similar results, whereby PV1 pathotype behaves similar to race 2 *V. dahliae*, causing only mild symptoms on tomato. With artificial infection of tobacco *N. benthamiana*, eggplant and camelina, we found that both lethal and mild pathotypes caused severe symptoms on infected plants. This is not in accordance with the observation that the mild pathotype causes mild symptoms and the lethal pathotype causes severe symptoms on the primary host. We therefore used hop plants of the susceptible hop cultivar for artificial infection with knock-out and complementation mutants.

V. nonalfalfa is a phytopathogen that lives and spreads through vascular tissue. Xylem sap is therefore a rich source of molecules secreted by the pathogen during infection that promote fungal colonization and depress plant defence reactions. Proteomic comparison of xylem proteins, isolated from infected and control plants of the susceptible cultivar 'Celeia', revealed three highly abundant fungal proteins that are secreted in the xylem during fungal infection. The enzyme alfa-N-arabinofuranosidase (VnaAbf4.216) is involved in degradation of the plant cell wall and it is also secreted by many other phytopathogenic fungi. There are four copies of the gene in the *V. nonalfalfa* genome. It was therefore not chosen for functional analysis.

Lignin-peroxidase (VnaPRX1.1277) and small secreted protein (VnaSSP4.2.) were also detected in the same proteomic analysis of *in planta* expressed fungal proteins. The functional analysis of genes of both proteins revealed that VnaPRX1.1277 and VnaSSP4.2 are indeed virulence factors in *V. nonalfalfa*, since they significantly contribute to the establishment of a normal level of symptoms on infected plants. In addition, *in planta* expression of both genes steadily increased through time points, which is also characteristic of virulence factors from other fungi. VnaPRX1.1277 might have a dual role: to protect the fungus from plant hydrogen peroxide, which is produced as a result of oxidative burst in innate plant immunity, while at the same time consuming plant H₂O₂ to break down the lignin in plant cell walls, for the purposes of lateral spread of the host.

VnaSSP4.2 is very similar to the known effector proteins from other fungi, as it is a small protein, containing two cysteines, does not contain any known protein domains, has a signal peptide domain, is *in planta* secreted in large amounts, has no known homologs outside the genus and the function of the protein is yet not known. In terms of size, alkalinity and the number of cysteine residues, VnaSSP4.2 is similar to effector protein Six3 (Avr2) from *F. oxysporum*. However, there is no similarity between proteins according to the amino acid structure.

In another *in planta* study, in which gene expression of control and PV1 infected susceptible 'Celeia' and resistant 'Wye Target' hop cultivars was analysed and compared, fungal cDNA sequences were detected among all the abundant plant cDNA sequences. Fungal cDNA sequences turned out to be homologous to genes of isolate T2 *V. nonalfalfa*. We selected two sequences for functional analysis, : a gene for a lectin that contains a domain for the binding of chitin (VnaCBD8.213) and the gene of a conserved hypothetical protein with unknown function (VnaHYPO7.546). Due to the high *in planta*

expression of both sequences, which enabled their detection at the transcriptome level, both genes are good candidates for verification of their influence on fungus virulence.

Particularly interesting was the protein VnaCBD8.213, containing protein domain CBM18, which can bind chitin. VnaCBD8.213 protein may be involved in protection of the fungi against plant defence mechanisms by binding to chitin in the cell walls of the fungi, thereby preventing the degradation of the fungal cell wall by plant chitinases. In a phytopathogenicity essay of *VnaCBD8.213* deletion mutants, we found that the gene is not involved in virulence. Due to the abundance of other proteins with a chitin binding domain in the genome of *V. nonalfalfa* isolate T2, we assume that other proteins probably take on the role of VnaCBD8.213, which makes its absence in the mutants not noticeable for the mutant's virulence. Although our functional analysis of *VnaCBD8.213* did not confirm its involvement in the virulence of *V. nonalfalfa*, the gene remains a potential virulence factor because of its structural characteristics and high *in planta* expression and thus interesting for further studies.

For VnaHYPO7.546, we found that knock-out mutants caused more rapid collapse of the infected plants than did the wild type. This means that the protein has a negative impact on virulence. Increased virulence of deletion mutants is known from the literature but the mechanism of this phenomenon has only been explained in functional analysis of avirulent factors.

The impact on fungus virulence by candidate virulence genes, acquired through *in planta* approaches was not unexpected because the fungus is forced to use various strategies for successful colonization, including enhanced expression of virulent genes essential for the survival of the pathogen in the host.

The second method of selection of candidate virulence genes was an *in silico* approach based on a comparison of the genomes of lethal PV1 pathotype with mild pathotype M *V. nonalfalfa*. The PV1 pathotype specific region, containing over 100 predicted gene models was thus determined. Based on RNA-seq data, the number of cysteines in the predicted proteins of gene models, the length of the regions and the presence of signal domain, we chose the 12 best candidates for functional analysis. We were unable to obtain knock-out mutants for genes *Vna1gUN*, *Vna2gUN.246*, *Vna3g4.790* in *Vna7gUN*, for unknown reasons. Knock-out mutants of the other eight candidate genes were successfully obtained and used for phytopathogenicity essay, which showed various results. While gene *Vna9gUN.496* had a negative impact on virulence, genes *Vna8gUN.246*, *Vna10g4.803* and *Vna11g4.791* were not implicated in fungal virulence. Phytopathogenicity essay of knock-out mutants of the other four genes (*Vna4gUN.245*, *Vna5g9*, *Vna6g4.792* and *Vna12gUN.279*) revealed that they have a significant impact on the virulence of the lethal pathotype *V. nonalfalfa*. These genes contribute to the wild type fungus causing normal symptoms, since knock-out mutants exhibited attenuated virulence on hop plants.

We showed in this doctoral work that the PV1 pathotype specific region contains genes that are important for high virulence of the lethal pathotype and contribute to increased aggressiveness in comparison to mild pathotypes. We assume that virulence genes, the implication of which in fungal virulence was confirmed in this study, and probably some

other still unknown genes from this pathotype specific region, are reasons for the difference in the degree of virulence between the two pathotypes.

7 VIRI

- Abramovitch R.B., Kim Y.J., Chen S., Dickman M.B., Martin G.B. 2003. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *The EMBO Journal*, 22: 60-69
- Agrios G.N. 1997. *Plant Pathology*. 4rd ed. San Diego, Academic Press: 635 str.
- Aimi T., Taguchi H., Tanaka Y., Kitamoto Y., Morinaga T. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the white root rot ascomycete *Rosellinia necatrix*. *Mycoscience*, 46: 27-31
- Albert M. 2013. Peptides as triggers of plant defence. *Journal of Experimental Botany*, 64: 5269–2579
- Ali S., Laurie J.D., Lanning R., Cervantes-Chavez J.A., Gaudet D., Bakkeren G. 2014. An immunity-triggering effector from the barley smut fungus *Ustilago hordei* resides in an Ustilaginaceae-specific cluster bearing signs of transposable element-assisted evolution. *PLoS Pathogens*, 10: e1004223, doi: 10.1371/journal.ppat.1004223: 19 str.
- Alkher H., el Hadrami A., Rashid K.Y., Adam L.R., Daayf F. 2009. Cross-pathogenicity of *Verticillium dahliae* between potato and sunflower. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 505-519
- An Z., Wang C., Liu X., Bennett J.W. 2010. China's fungal genomics initiative: a whitepaper. *Mycology*, 1: 1-8
- Andersen P.C., Brodbeck B.V., Mizell R.F. 1995. Diurnal vitiations in tension, osmolarity, and the composition of nitrogen and carbon assimilates in xylem fluid of *Prunus persica*, *Vitis hybrid*, and *Pyrus communis*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120: 600–606
- de Backer M.D., Raponi M., Arndt G.M. 2002. RNAmediated gene silencing in non-pathogenic and pathogenic fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 323–329
- Barbara D.J., Clewes E. 2003. Plant pathogenic *Verticillium* species: How many of them are there? *Molecular Plant Pathology*, 4: 297–305
- Beckman C.H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 101-110
- Berestetskiy A.O. 2008. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 453–465
- Bhat R.G., Subbarao K.V. 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 89: 1218-1225
- Bidochka M.J., St Leger R.J., Stuart A., Gowenlock K. 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology*, 145: 955–963
- van der Biezen E.A., Jones J.D.G. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 454–456
- Block A., Li G., Fu Z.Q., Alfano J.R. 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 396-403
- Boller T., Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 379–406

- Bolton M.D., van Esse H.P., Vossen J.H., de Jonge R., Stergiopoulos I., Stulemeijer I.J., ... Thomma B.P.H.J. 2008. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology*, 69: 119-136
- Boyd L.A., Ridout C., O'Sullivan D.M., Leach J.E., Leung H. 2013. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, 29: 233-240
- Braus G.H. 2014. *Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots. *New Phytologist*, 11: 565–581
- Brown J.S., Holden D.W. 1998. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 390–394
- Bundock P., Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooykaas P.J. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14: 3206–3214
- van den Burg H.A., Harrison S.J., Joosten M., Vervoort J., de Wit P. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 1420–1430
- Burton J.J., Silk S. 1997. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*, 87: 664-669
- Cairns T.C., Studholme D.J., Talbot N.J., Haynes K. 2016. New and improved techniques for the study of pathogenic fungi. *Trends in Microbiology*, 24: 35-50
- Campbell C.L., Madden L.V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York, John Wiley & Sons Inc.: 532 str.
- CBS. 2016. Utrecht, CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre.
<http://www.cbs.knaw.nl/> (februar 2016)
- Chi M.H., Park S.Y., Kim S., Lee Y.H. 2009. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host. *PLoS Pathogens*, 5: e1000401, doi: 10.1371/journal.ppat.1000401: 16 str.
- Chisholm S.T., Dahlbeck D., Krishnamurthy N., Day B., Sjolander K., Staskawicz B.J. 2005. Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 2087-2092
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803–814
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186: 757–761
- Cl'erivet A., D'eon V., Alami I., Lopez F., Geiger J.P., Nicole M. 2000. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus × acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Trees*, 15: 25–31
- Clarkson J.M., Heale J.B. 1985. Pathogenicity and colonization studies on wild-type and auxotrophic isolates of *Verticillium albo-atrum* from hop. *Plant Pathology*, 34: 119-128
- Collemare J., Lebrun M.H. 2011. Fungal secondary metabolites: ancient toxins and novel effectors in plant–microbe interactions. V: Effectors in Plant–Microbe Interactions. 1st ed. Martin F., Kamoun S. (eds.). Oxford, John Wiley & Sons Inc.: 377–400

- Conesa A., Götz S., García-Gómez J.M., Terol J., Talón M., Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674–3676
- Cook D.E., Mesarich C.H., Thomma B.P.H.P. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 541-563
- Correll J.C., Gordon T.R., McCain A.H. 1988. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*, 78: 1017-1021
- Cregeen S., Radisek S., Mandelc S., Turk B., Stajner N., Jakse J., Javornik B. 2014. Different gene expressions of resistant and susceptible hop cultivars in response to infection with a highly aggressive strain of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33: 689-704
- Cui H., Kenichi T., Parker J.E. 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 487-511
- Daayf F., Nicole M., Boher B., Pando-Bahuon A., Geiger J.P. 1997. Early defense reactions of cotton (*Gossypium* sp.) to *Verticillium dahliae* Kleb. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 125–136
- Daayf F. 2015. Verticillium wilts in crop plants: pathogen invasion and host defence responses. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37: 8-20
- Dean R.A., Talbot N.J., Ebbot D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., ... Birren B.W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434: 980–986
- Dempsey D.M.A., Vlot A.C., Wildermuth M.C., Klessig D.F. 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, 9: e0156, doi: 10.1199/tab.0156: 25 str.
- Derksen H., Rampitsch C., Daayf F. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science*, 207: 79-87
- Djamei A., Schipper K., Rabe F., Ghosh A., Vincon V., ... Kahmann R.. 2011. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478: 395–398
- Dobinson K.F., Grant S.J., Kang S. 2004. Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Current Genetics*, 45: 104–110
- Dodds P.N., Rathjen J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11: 539–548
- Doehlemann G., Wahl R., Vranae M., de Vries R.P., Kamper J., Kahmann R. 2008. Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *Journal of Plant Physiology*, 165: 29–40
- Doehlemann G., Schipper K., Kahmann R. 2012. The effectors of smut fungi. V: Effectors in Plant-Microbe Interactions, 1st ed. Martin F., Kamoun S. (eds.). Oxford, John Wiley & Sons Inc.: 77-99
- Doehlemann G., Hemetsberger C. 2013. Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist*, 198: 1001-1016
- Dong X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 316–323
- D'Souza C.A., Lee B.N., Adams T.H. 2001. Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 158: 1027-1036

- Duan Y.P., Castaneda A., Zhao G., Erdos G., Gabriel D.W. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 556-560
- Duressa D., Anchieta A., Chen D., Klimes A., Garcia-Pedrajas M.D., Dobinson K.F., Klosterman S.J. 2013. RNA-seq analyses of gene expression in the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *BMC Genomics*, 14: 607, doi: 10.1186/1471-2164-14-607: 18 str.
- Durrands P.K., Cooper, R.M. 1988a. Selection and characterization of pectinase-deficient mutants of the vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32: 343–362
- Durrands P.K., Cooper R.M. 1988b. The role of pectinases in vascular wilt disease as determined by defined mutants of *Verticillium albo-atrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32: 363–371
- Durrenberger F., Wong K., Kronstad J.W. 1998. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 5684–5689
- van Dyck E., Stasiak A.Z., Stasiak A., West S.C. 1999. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature*, 398: 728–731
- Eckert M., Maguire K., Urban M., Foster S., Fitt B., Lucas J., Hammond-Kosack K. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. *FEMS Microbiology Letters*, 253: 67-74
- Ellis J.G., Rafiqi M., Gan P., Chakrabarti A., Dodds P.N. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 399-405
- Ellis T., Adie T., Baldwin G.S. 2011. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integrative Biology*, 3: 109–118
- Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P., von Tiedemann A. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 259–272
- Faino L., de Jonge R., Thomma B.P.H.J. 2012. The transcriptome of *Verticillium dahliae*-infected *Nicotiana benthamiana* determined by deep RNA sequencing. *Plant Signaling & Behavior*, 9: 1065-1069
- Faino L., Thomma B.P.H.J. 2014. Get your high-quality low-cost genome sequence. *Trends in Plant Science*, 19: 288–291
- Faino L., Seidl M.F., Datema E., van den Berg G.C., Janssen A., Wittenberg A.H., Thomma B.P.H.J. 2015. Single-molecule real-time sequencing combined with optical mapping yields completely finished fungal genome. *MBio*, 6: e00936-15, doi: 10.1128/mBio.00936-915: 11 str.
- Fawal N., Li Q., Savelli B., Brette M., Passaia G., Fabre M., Mathe C., Dunand C. 2013. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Research*, 41: D441-D444
- Fernández-Fueyo E., Ruiz-Dueñas F.J., Miki Y., Martínez M.J., Hammel K.E., Martínez A.T. 2012. Lignin-degrading peroxidases from genome of selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 16903-16916

- Flajsman M., Mandelc S., Radisek S., Stajner N., Jakse J., Kosmelj K., Javornik B. 2016. Identification of novel virulence-associated proteins secreted to xylem by *Verticillium nonalfafae* during colonization of hop plants. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v tisku
<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0016-R>
- Floerl S., Druebert C., Majcherczyk A., Karlovsky P., Kües U., Polle A. 2008. Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology*, 8: 1, doi: 10.1186/1471-2229-8-129: 15 str.
- Floerl S., Majcherczyk A., Possienke M., Feussner K., Tappe H., Gatz C., Feussner I., Kües U., Polle A. 2012. *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 7: e31435, doi: 10.1371/journal.pone.0031435: 14 str.
- Flor H.H. 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32: 653–669
- Flor H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275–296
- Fradin E.F., Thomma B.P.H.J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7: 71–86
- Fradin E.F., Zhang Z., Ayala J.C.J., Castroverde C.D.M., Nazar R.N., Liu C.M., Thomma B.P.H.J. 2009. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *ve1*. *Plant Physiology*, 150: 320–332
- Fradin E.F., Abd-El-Haliem A., Masini L., van den Berg G.C.M., Joosten M.H.A.J., Thomma B.P.H.J. 2011. Interfamily transfer of tomato *Ve1* mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156: 2255–2265
- Frandsen R.J.N., Andersson J.A., Kristensen M.B., Giese H. 2008. Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. *BMC Molecular Biology*, 9: 70-81, doi: 10.1186/1471-2199-9-70: 11 str.
- Frandsen R.J.N. 2011. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 8: 247–262
- Fu Z.Q., Dong X. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 839–863
- Gamboa-Melendez H., Judelson H.S. 2015. Development of a bipartite ecdysone-responsive gene switch for the oomycete *Phytophthora infestans* and its use to manipulate transcription during axenic culture and plant infection. *Molecular Plant Pathology*, 16: 83–91
- Gan P., Ikeda K., Irieda H., Narusaka M., O'Connell R.J., Narusaka Y., Takano Y., Kubo Y., Shirasu K. 2013. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytologist*, 197: 1236–1249
- Gao F., Zhou B.J., Li G.Y., Jia P.S., Li H., Zhao Y.L., Zhao P., Xia G.X., Guo H.S. 2010. A glutamic acid-rich protein identified in *Verticillium dahliae* from an insertional mutagenesis affects microsclerotial formation and pathogenicity. *PLoS One*, 5: e15319, doi: 10.1371/journal.pone.0015319: 10 str.
- Garre V., Tenberge K.B., Eising R. 1998. Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: putative role in pathogenicity and suppression of host defense. *Phytopathology*, 88: 744–753

- Gawehns F., Houterman P. 2014. The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2 mediated cell death. *Molecular Plant*, 27: 336–348
- Gawehns F., Houterman P.M., Ichou A.F., Michielse C.B., Hijdra M., Cornelissen B.J.C., Rep M., Takken F.L.W. 2014. The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2 mediated cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27: 336-348
- Gayoso C., Pomar F., Novo-Uzal E., Merino F., de Ilarduya M.O. 2010. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biology*, 10: 232, doi: 10.1186/1471-2229-10-232: 19 str.
- Gehrung C.A., Irving H.R. 2003. Natriuretic peptides-a class of heterologous molecules in plants. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 1318-1322
- Gent D. 2012. New outbreaks of *Verticillium* wilt on hop in Oregon caused by nonlethal *Verticillium albo-atrum*. *Plant Health Progress*, doi: 10.1094/php-2012-0521-01-rs: 9 str.
- Gijzen M., Nürnberg T. 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry*, 67: 1800-1807
- Giraldo M.C., Valent B. 2013. Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 800–814
- Gómez-Lim M.A., Magaña Ortíz D., Fernández F., Loske A.M. 2015. Transformation of fungi using shock waves. V: Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1. van den Berg M.A., Maruthachalam K. (eds.). Gewerbestrasse (Switzerland), Springer International Publishing: 209-219
- Gorfer M., Klaubauf S., Bandian D., Strauss J., 2007. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. *Mycological Research*, 111: 850-855
- Gregory P.J., Johnson S.N., Newton A.C., Ingram J.S. 2009. Integrating pests and pathogens into the climate change/food security debate. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2827–2838
- Grimaldi B., Michiel A., Filetici P., Ottonello S., Ballario P. 2005. *Agrobacterium*-mediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. *Current Genetics*, 48: 69-74
- Gururania M.A., Venkatesh J., Upadhyaya C.P., Nookaraju A., Pandey S.K., Park S.W. 2012. Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78: 51–65
- de Groot M.J., Bundock P., Hooykaas P.J., Beijersbergen A.G. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16: 839–842
- el Hadrami A., Adam L.R., Daayf F. 2011. Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing anti-microbial metabolites. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24: 328–335
- el Hadrami A., Islam M.R., Adam L.R., Daayf F. 2015. A cupin domain-containing protein with a quercetinase activity (VdQase) regulates *Verticillium dahliae*'s pathogenicity and contributes to counteracting host defenses. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-18

- Hane J.K., Anderson J.P., Williams A.H., Sperschneider J., Singh K.B. 2014. Genome sequencing and comparative genomics of the broad host-range pathogen *Rhizoctonia solani* AG8. PLoS Genetics, 10: e1004281, doi: 10.1371/journal.ppat.1002137: 19 str.
- Hann D., Boller T. 2012. Microbila effectors and their role in plant defense suppression. V: Effectors in Plant-Microbe Interactions, 1st ed. Martin F., Kamoun S. (eds.). Oxford, John Wiley & Sons Inc.: 33-52
- Hannon G.J. 2002. RNA interference. Nature, 418: 244–251
- Harris R.V. 1927. A wilt disease of hops. East malling research station. Annual Report for 1925, II Suplement: 92-93
- Hastie A.C., Heale J. B. 1984. Genetics of *Verticillium*. Phytopathologia Mediterranea, 23: 130-162
- He X.J., Li X.L., Li, Y.Z. 2015. Disruption of *Cerevisin* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation affects microsclerotia formation and virulence of *Verticillium dahliae*. Plant Pathology, 64: 1157-1167
- Heale J.B. 1985. *Verticillium* wilt of alfalfa, background and current research. Canadian Journal of Plant Pathology, 7: 191-198
- Heale J.B. 1988. *Verticillium* spp., the cause of vascular wilts in many species. Advances in Plant Pathology, 291-312
- Heale J.B. 2000. Diversification and speciation in *Verticillium* - an overview. V: Advances in *Verticillium*, Research and Disease Management. Tjamos E.C., Rowe R.C., Heale J.B., Fravel D.R. (eds.). St. Paul, APS Press: 1-14
- Heath M.C. 2000. Non-host resistance and nonspecific plant defenses. Current Opinion in Plant Biology, 3: 315–319
- Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends in Plant Science, 10: 446-451
- Hogenhout S.A., van der Hoorn R.A.L., Terauchi R., Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22: 115–122
- van der Hoorn R.A.L., Kamoun S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. Plant Cell, 20: 2009–2017
- Hoppenau C.E., Tran V.T., Kusch H., Asshauer K.P., Landesfeind M., Meinicke P., Popova B., Braus-Stromeyer S.A., Braus G.H. 2014. *Verticillium dahliae* Vdthi4, involved in thiazole biosynthesis, stress response and DNA repair functions, is required for vascular disease induction in tomato. Environmental and Experimental Botany, 108: 14–22
- Horbach R., Navarro-Quesada A.R., Knogge W., Deising H.B. 2011. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. Journal of Plant Physiology, 168: 51–62
- Houterman P.M., Speijer D., Dekker H.L., de Koster C.G., Cornelissen B.J.C., Rep M. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. Molecular Plant Pathology, 8: 215-221
- Houterman P.M., Cornelissen B.J., Rep M. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. PLoS Pathogens, 4: e1000061, doi: 10.1371/journal.ppat.1000061: 6 str.
- Houterman P.M., Ma L., van Ooijen G., de Vroomen M.J., Cornelissen B.J.C., Takken F.L.W., Rep M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus

- Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal*, 58: 970–978
- Inderbitzin P., Bostock R.M., Davis R.M., Usami T., Platt H.W., Subbarao K.V. 2011a. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS One* 6: e28341, doi: 10.1371/journal.pone.0028341: 22 str.
- Inderbitzin P., Davis R.M., Bostock R.M., Subbarao K.V. 2011b. The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS One*, 6: e18260, doi: 10.1371/journal.pone.0018260: 13 str.
- Inderbitzin P., Subbarao K.V. 2014. *Verticillium* systematics and evolution: How confusion impedes verticillium wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*, 104: 564–574
- Jackson S.L. 1995. Microinjection of fungal cells: a powerful experimental technique. *Canadian Journal of Botany*, 73: 435–443
- Jamir Y., Guo M., Oh H.S., Petnicki-Ocwieja T., Chen S., Tang X., Dickman M.B., Collmer A., Alfano J.R. 2004. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *The Plant Journal*, 37: 554–565
- Javornik Cregeen S. 2010. Diferencialno izražanje genov hmelja po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 91 str.
- Jiang D., Zhu W., Wang Y., Sun C., Zhang K.Q., Yang J. 2013. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnology Advances*, 31: 1562–1574
- Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323–329
- de Jonge R., Thomma B.P.H.J. 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology*, 17: 151–157
- de Jonge R., van Esse H.P., Kombrink A., Shinya T., Desaki Y., ... Thomma B.P.H.J. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, 329: 953–955
- de Jonge R., Bolton M.D., Thomma B.P.H.J. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 400–406
- de Jonge R. 2012. In silico identification and characterization of effector catalogs. V: *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols*. Bolton M.D., Thomma B.P.H.J. (eds.). New York, Humana Press Inc.: 415–425
- de Jonge R., Van Esse P.H., Maruthachalam K., Bolton M.D., Santhanam P., Saber M.K., Zhang Z., Usami T., Lievens B., Subbarao K.V., Thomma B.P.H.J. 2012. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 5110–5115
- de Jonge R., Bolton M.D., Kombrink A., van den Berg G.C.M., Yadeta K.A., Thomma B.P.H.J. 2013. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Research*, 23: 1271–1282
- Kapila J., de Rycke R., van Montagu M., Angenon G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122: 101–108
- Kapoor K., Rehan M., Kaushiki A., Pasrija R., Lynn A.M., Prasad R. 2009. Rational mutational analysis of a multidrug MFS transporter CaMdr1p of *Candida albicans* by

- employing a membrane environment based computational approach. PLoS Computational Biology, 5: e1000624, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000624: 11 str.
- Karapapa V.K., Bainbridge B.W., Heale J.B. 1997. Morphological and molecular characterisation of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. Mycological Research, 101: 1281–1294
- Kawaide H. 2006. Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70: 583-590
- Kawchuk L., Hachey J., Lynch D.R., Klcsar F., van Rooijen G., Waterer D.R., Robertson A., Kokko E., Byers R., Howard R.J., Fischer R., Prüfer D. 2001. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 6511–6515
- Kayser T. 1992. Protoplastenfusion, sowie elektrophoretische Chromosomentrennung und Genkartierung bei filamentösen Pilzen: *Penicillium janthinellum*, *Absidia glauca* und *Cochliobolus heterostrophus*. Dissertation thesis. Berlin, Humboldt University of Berlin: 92 str.
- Kazan K., Lyons R. 2014. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. The Plant Cell, 26: 2285–2309
- Kershaw M.J., Talbot N.J., 2009. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 15967-15972
- Khrunyk Y., Münch K., Schipper K., Lupas A.N., Kahmann R. 2010. The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. New Phytologist, 187: 957-968
- Kim E., Kim S., Kim D.H., Choi B.S., Choi I.Y., Kim J.S. 2012. Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. Genome Research, 22: 1327–1333
- Klimes A., Dobinson K.F. 2006. A hydrophobin gene, *VDH1*, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. Fungal Genetics and Biology, 43: 283–294
- Klimes A., Amyotte S.G., Grant S., Kang S., Dobinson K.F. 2008. Microsclerotia development in *Verticillium dahliae*: regulation and differential expression of the hydrophobin gene *VDH1*. Fungal Genetics and Biology, 45: 1525–1532
- Klimes A., Dobinson K.F., Thomma B.P.H.J., Klosterman S.J. 2015. Genomics spurs rapid advances in our understanding of the biology of vascular wilt pathogens in the genus *Verticillium*. Annual Review of Phytopathology, 53: 9.1–9.18
- Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E., Subbarao K.V. 2009. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. Annual Review of Phytopathology, 47: 39–62
- Klosterman S.J., Subbarao K.V., Kang S., Veronese P., Gold S.E., ... Li-Jun M. 2011. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. PLoS Pathogens, 7: e1002137, doi: 10.1371/journal.ppat.1002137: 19 str.
- Knight C.J., Bailey A.M., Foster G.D. 2009. Agrobacterium-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Verticillium albo-atrum*. Journal of Plant Pathology, 91: 745–750
- Kombrink A. 2012. Heterologous production of fungal effectors in *Pichia pastoris*. V: Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols. Bolton M.D., Thomma B.P.H.J. (eds.). New York, Humana Press Inc.: 209-217

- Kombrink A., Thomma B.P.H.J. 2013. LysM effectors: secreted proteins supporting fungal life. PLoS Pathogens, 9: e1003769, doi: 10.1371/journal.ppat.1003769: 4 str.
- Kombrink A. 2014. Functional analysis of LysM effectors secreted by fungal plant pathogens. Doctoral dissertation. Wageningen, Wageningen University: 120 str.
- Korolev N., Pérez-Artés E., Mercado-Blanco J., Bejarano-Alcázar J., Rodríguez-Jurado D., Jiménez-Díaz R.M., Katan T., Katan J. 2008. Vegetative compatibility of cotton-defoliating *Verticillium dahliae* in Israel and its pathogenicity to various crop plants. European Journal of Plant Pathology, 122: 603-617
- Koste A.Y. 2012. Verticillium wilt resistance in *Arabidopsis* and tomato: identification and functional characterization. Doctoral dissertation. Wageningen, Wageningen University: 148 str.
- Kronstad J., De Maria A., Funnell D., Laidlaw R.D., Lee N., De Sá M.M., Ramesh M. 1998. Signaling via cAMP in fungi: Interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. Archives of Microbiology, 170: 395–404
- Kubicek C.P., Starr T.L., Glass N.L. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology, 52: 427–451
- Kück U., Hoff B. 2010. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 86: 51-62
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Isolation of high molecular weight DNA from plant tissues. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 59: 63-66
- Kuspa A. 2006. Restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis. V: Methods in Molecular Biology, Volume 346: Dictyostelium Discoideum Protocols. Eichinger L., Rivero F. (eds.). Totowa, Humana Press Inc.: 201-209
- Lamb C., Dixon R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Biology, 48: 251-275
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. 2009. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. Current Opinion in Plant Biology, 12: 451-458
- Leslie J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology, 31: 127–150
- Letno poročilo Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) za leto 2013. 2014. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 63 str.
- Leung R.K., Whittaker P.A. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. Pharmacology & Therapeutics, 107: 222-239
- Liu S.Y., Chen J.Y., Wang J.L., Li L., Xiao H.L., Adam S.M., Dai X.F. 2013. Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae*. Gene, 529: 307–316
- Liu T., Song T., Zhang X., Yuan H., Su L., Li W., Xu J., Liu S., Chen L., Chen T., Zhang M., Gu L., Zhang B., Dou D. 2014. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. Nature Communications, 5: 4686
- Liu W., Liu J., Ning Y., Ding B., Wang X., Wang Z., Wang G.L. 2013. Recent progress in understanding PAMP-and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant, 6: 605-620
- Lopez-Millan A.F., Morales F., Abadia A., Abadia J. 2000. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. Plant Physiology, 124: 873–884

- Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Li S., Widholm J.M., Hartman G.L. 2006. Lignin degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*, 90: 77-82
- Luo X., Xie C., Dong J., Yang X., Sui A. 2014. Interactions between *Verticillium dahliae* and its host: vegetative growth, pathogenicity, plant immunity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 6921–6932
- Ma L., Cornelissen B.J.C., Takken F.L.W. 2013. A nuclear localization for Avr2 from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. *Frontiers in Plant Science*, 4: 94
- Ma L.J., van der Does H.C., Borkovich K.A., Coleman J.J., Daboussi M.J., ... Rep M. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464: 367–373
- Macho A.P., Zipfel C. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, 54: 263–272
- Mandelc S. 2010. Proteomska analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) in diferencialno izraženih proteinov v hmelju po okužbi s patotipom PG2 *Verticillium albo-atrum*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 98 str.
- Mandelc S., Javornik B. 2015. The secretome of vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum* in simulated xylem fluid. *Proteomics*, 15: 787–797
- Marraffini L.A., Sontheimer E.J. 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11: 181–190
- Maruthachalam K., Klosterman S.J., Kang S., Hayes R.J., Subbarao K.V. 2011. Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis. *Molecular Biotechnology*, 49: 209–221
- Mayer A.M., Staples R.C., Gil-ad N.L. 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, 58: 33-41
- McDonald B.A., Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349–379
- McGeary F.M., Hastie A.C. 1982. Hybridisation of *Verticillium albo-atrum* strains from tomato and lucerne. *Physiological Plant Pathology*, 21: 437-444
- Medentsev A.G., Arinbasarova A.I., Aimenko V.K. 2001. Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress. *Mikrobiologija*, 70: 34-38
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126: 969-980
- Mercado-Blanco J., Rodríguez-Jurado D., Péres-Artés E., Jiménez-Díaz R.M. 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 1-13
- Michielse C.B., Hooykaas P.J.J. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 48: 1–17
- Michielse C.B., van Wijk R., Reijnen L., Manders E.M., Boas S., Olivain C., Alabouvette C., Rep M. 2009. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PloS Pathogens*, 5: e1000637, doi: 10.1371/journal.ppat.1000637: 14 str.
- Min X.J. 2010. Evaluation of computational methods for secreted protein prediction in different eukaryotes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 3: 143–147

- Mir A.A., Park S.Y., Sadat M.A., Kim S., Choi J., Jeon J., Lee Y.H. 2015. Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Science Report*, 5: 11831
- Misas-Villamil J.C., van der Hoorn R.A. 2008. Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 380–388
- Mishra N.C., Tatum E.L. 1973. Non-Mendelian inheritance of DNA-mediated inositol independence in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 3875–3879
- Mitchell T.K., Dean R.A. 1995. The cAMP-dependent protein-kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 7: 1869–1878
- Möbius N., Hertweck C. 2009. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 390–398
- Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 266–277
- Moore J.W., Loake G.J., Spoel S.H. 2011. Transcription dynamics in plant immunity. *The Plant Cell Online*, 23: 2809–2820
- Mullins E.D., Chen X., Romaine P., Raina R., Geiser D.M., Kang S. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 91: 173–180
- Nakayashiki H., Kadotani N., Mayama S. 2006. Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *Journal of Molecular Evolution*, 63: 127–135
- Neve R.A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- Nguyen Q.B., Itoh K., van Vu B., Tosa Y., Nakayashiki H. 2011. Simultaneous silencing of endo-beta-1,4 xylosidase genes reveals their roles in the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology*, 81: 1008–1019
- Nickel W. 2010. Pathways of unconventional protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 621–626
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10: 1–6
- Ninomiya Y., Suzuki K., Ishii C., Inoue H. 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 12248–12253
- Njoroge S.M.C., Vallad G.E., Park S.Y., Kang S., Koike S.T., Bolda M., Burman P., Polonik W., Subbarao K.V. 2011. Phenological and phytochemical changes correlate with differential interactions of *Verticillium dahliae* with broccoli and cauliflower. *Phytopathology*, 101: 523–534
- Novo M., Pomar F., Gayoso C., Merino F. 2006. Cellulase activity in isolates of *Verticillium dahliae* differing in aggressiveness. *Plant Disease*, 90: 155–160
- Nürnberg T., Brunner F. 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 318–324
- O'Connell R.J., Thon M.R., Hacquard S., Amyotte S.G., Kleemann J., ... Altmüller J. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44: 1060–1065

- O’Neal E. 2014. Biological control of *Ailanthus altissima*: transmission, formulation, and risk assessment of *Verticillium nonalfalfae*. Doctoral dissertation. Pennsylvania, The Pennsylvania State University: 168 str.
- Obruca S., Marova I., Matouskova P., Haronikova A., Lichnova A. 2012. Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552. *Folia Microbiologica*, 57: 221-227
- Odenbach D., Breth B., Thines E., Weber R.W.S., Anke H., Foster A.J. 2007. The transcription factor Con7p is a central regulator of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology*, 64: 293–307
- Oerke E.C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31–43
- Okmen B., Doehlemann G. 2014. Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 20: 19–25
- Okoli C.A.N., Carder J.H., Barbara D.J. 1994. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and the relationships of some host adapted isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology*, 43: 33–40
- Oliver R.P., Friesen T.L., Faris J.D., Solomon P.S. 2012. *Stagonospora nodorum*: from pathology to genomics and host resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 23–43
- Oliver R.P., Hewit H.G. 2014. Fungicides in Crop Protection, 2nd ed. Oxford, Gutenberg Press: 183 str.
- Olmedo-Monfil V., Cortés-Penagos C., Herrera-Estrella A. 2004. Three decades of fungal transformation. V: Reviews and Protocols. 2nd ed. Balbás P., Lorence A. (eds.). Totowa, Humana Press Inc: 297-313
- Ospina-Giraldo M.D., Mullins E., Kang S. 2003. Loss of function of the *Fusarium oxysporum* *SNF1* gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Current Genetics*, 44: 49–57
- Ottmann C., Luberacki B., Kufner I., Koch W., Brunner F., Weyand M., Mattinen L., Pirhonen M., Anderluh G., Seitz H.U., Nurnberger T., Oecking C. 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 10359-10364
- Park C.H., Chen S., Shirsekar G., Zhou B., Khang C.H., ... Valent B. 2012. The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets theRNGE3 ubiquitin ligaseAPIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *Plant Cell*, 24: 4748–4762
- Pazzaglia L., Cappuge G., Manao G., Camic G., Santini A., Scala A. 1999. Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 24959–24964
- Pegg G.F., Brady B.L. 2002. *Verticillium wilts*. New York, CABI Publishing: 552 str.
- Peplow A.W., Tag A.G., Garifullina G.F., Beremand M.N. 2003. Identification of new genes positively regulated by Tri19 and regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2731–2736
- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 421-426
- Pomar F., Novo M., Bernal M.A., Merino F., Barcelo A.R. 2004. Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the

- maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. New Phytologist, 163: 111–123
- Io Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., Zuccaro A., Reissmann S., Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. Annual Review of Plant Biology, 66: 513–545
- Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell, 152: 1173–1183
- Qutob D., Kemmerling B., Brunner F., Kufner I., Engelhardt S., ... Glawischnig E. 2006. Phytoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. Plant Cell, 18: 3721–3744
- Radisek S., Jakse J., Simoncic A., Javornik B. 2003. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. Plant Disease, 87: 633–638
- Radisek S., Jakse J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. European Journal of Plant Pathology, 116: 301–314
- Radišek S., Javornik B. 2011. Taksonomija in variabilnost fitopatogenih vrst gliv iz rodu *Verticillium*. Hmeljarski bilten, 18: 41–55
- Raffaele S., Kamoun S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. Nature Reviews Microbiology, 10: 417–430
- Rafiqi M., Ellis J.G., Ludowici V.A., Hardham A.R., Dodds P.N. 2012. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. Current Opinion in Plant Biology, 15: 477–482
- Rauyaree P., Ospina-Giraldo M.D., Kang S., Bhat R.G., Subbarao K.V., Grant S.J., Dobinson K.F. 2005. Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. Current Genetics, 48: 109–116
- Rebbeck J., Malone M.A., Short D.P.G., Kasson M.T., O’Neal E.S., Davis D.D. 2013. First report of *Verticillium* wilt caused by *Verticillium nonalfalfa*e on tree-of-heaven (*Ailanthus altissima*) in Ohio. Plant Disease, 97: 999–999
- Reggiori F., Klionsky D.J. 2002. Autophagy in the eukaryotic cell. Eukaryotic Cell, 1: 11–21
- Rep M., Dekker H.L., Vossen J.H., de Boe A.D., Houterman P.M., Speijer D., Back J.W., de Koster C.G., Cornelissen B.J. 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. Plant Physiology, 130: 904–917
- Rep M., van der Does H.C., Meijer M., van Wijk R., Houterman P.M., Dekker H.L., de Koster C.G., Cornelissen B.J.C. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. Molecular Microbiology, 53: 1373–1383
- Rep M., Kistler H.C. 2010. The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. Current Opinion in Plant Biology, 13: 420–426
- Richards T.A., Dacks J.B., Jenkinson J.M., Thornton C.R., Talbot N.J. 2006. Evolution of filamentous plant pathogens: gene exchange across eukaryotic kingdoms. Current Biology, 16: 1857–1864
- Richards T.A. 2011. Genome evolution: horizontal movements in the fungi. Current Biology, 21: R166–R168

- Riggle P.J., Kumamoto C.A. 1998. Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme-mediated integration. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 395–399
- Rivera A.L., Magaña-Ortíz D., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. 2014. Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*, 11: 184–203
- Robb J., Moukhamedov R., Hu X., Platt H., Natar R.N. 1993. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assay. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43: 423–436
- Robb J. 2007. *Verticillium* tolerance: resistance, susceptibility, or mutualism? *Botany*, 85: 903–910
- Rodriguez M.C.S., Petersen M., Mundy J. 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 621–649
- Rogers C.W., Challen M.P., Green J.R., Whipps J.M. 2004. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiology Letters*, 241: 207–214
- Rouxel T., Balesdent M.H. 2010. Avirulence genes. V: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, Wiley&Sons, doi: 10.1002/9780470015902.a0021267: 13 str.
- Rouxel T., Grandaubert J., Hane J.K., Hoede C., van de Wouw A.P., Couloux A., ... Cozijnse A.J. 2011. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations. *Nature Communications*, 2: 202, doi: 10.1038/ncomms1189: 10 str.
- Rovenich H., Boshoven J.C., Thomma B.P.H.J. 2014. Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 20: 96–103
- Rowe R.C. 1995. Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica*, 23: 31–38
- Rozema J., Björn L.O., Bornman J.F., Gaberscik A., Häder D.P., Trost T., Lebert M. 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 66: 2–12
- Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132: 365–386
- Ruiz-Diez B. 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 189–195
- Ruzvidzo O., Donaldson L., Valentine A., Gehring C.A. 2011. The *Arabidopsis thaliana* natriuretic peptide AtPNP-A is a systemic regulator of leaf dark respiration and signals via the phloem. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1710–1714
- Sandrock R.W., Vanetten H.D. 1998. Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin α-tomatine. *Phytopathology*, 88: 137–143
- Santhanam P., van Esse H.P., Albert I., Faino L., Nürnberger T., Thomma B.P.H.J. 2013. Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-Like protein family. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26: 278–286
- Santhanam P., Thomma B.P.H.J. 2013. *Verticillium dahliae* *Sge1* differentially regulates expression of candidate effector genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26: 249–256
- Saunders D.G.O., Win J., Cano L.M., Szabo L.J., Kamoun S., Raffaele S. 2012. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate

- effectors of rust fungi. PLoS One, 7: e29847, doi: 10.1371/journal.pone.0029847: 14 str.
- Schardl C.L., Craven K.D. 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. Molecular Ecology, 12: 2861–2873
- Scherer S., Davis R.W. 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76: 4951–4955
- Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli U., Boller T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. Nature, 324: 365-367
- Scientific Opinion on the pest categorisation of *Verticillium albo-atrum* sensu stricto Reinke and Berthold, *V. alfalfae* Inderb., HW Platt, RM Bostock, RM Davis & KV Subbarao, sp. nov., and *V. nonalfalfa*e Inderb., HW Platt, RM Bostock, RM Davis & KV Subbarao, sp. nov. 2014. The EFSA Journal, 12: 3927, doi: /10.2903/j.efsa.2014.3927: 40 str.
- Seidl M.F., Thomma B.P.H.J. 2014. Sex or no sex: evolutionary adaptation occurs regardless. Bioessays, 36: 335–345
- Sewell G.W.F., Wilson J. F. 1984. The nature and distribution of *Verticillium albo-atrum* strains highly pathogenic to the hop. Plant Pathology, 33: 39-51
- Shah J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. Current Opinion in Plant Biology, 12: 459-464
- Shan L., He P., Li J., Heese A., Peck S.C., Nurnberger T., Martin G.B., Sheen J. 2008. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. Cell Host & Microbe, 4: 17-27
- Simko I., Piepho H.P. 2012. The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. Phytopathology, 102: 381–389
- Singh S., Braus-Stromeyer S.A., Timpner C., Tran V.T., Lohaus G., Reusche M., Knüfer J., Teichmann T., von Tiedemann A., Braus G.H. 2010. Silencing of *Vlaro2* for chorismate synthase revealed that the phytopathogen *Verticillium longisporum* induces the cross-pathway control in the xylem. Applied Microbiology and Biotechnology, 85: 1961–1976
- Singh S., Braus-Stromeyer S.A., Timpner C., Valerius O., von Tiedemann A., Karlovsky P., Druebert C., Polle A., Braus G.H. 2012. The plant host *Brassica napus* induces in the pathogen *Verticillium longisporum* the expression of functional catalase peroxidase which is required for the late phase of disease. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25: 569-581
- Smit F., Dubery I.A. 1997. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. Phytochemistry, 44: 811–815
- Soanes D.M., Alam I., Cornell M., Wong H.M., Hedeler C., Paton N.W., Rattray M., Hubbard S., Oliver S.G., Talbot N.J. 2008. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. PLoS One, 3: e2300, doi: 10.1371/journal.pone.0002300: 15 str.
- Sock J., Hoppe H.H. 1999. Pathogenicity of sirodesmin-deficient mutants of phoma lingam. Journal of Phytopathology, 147: 169-173
- Song Y., Zhang Z., Seidl M., Majer A., Jakse J., Javornik B., Thomma B.P.H.J. 2016. Broad taxonomic characterization of *Verticillium* wilt resistance genes reveals ancient origin of the tomato Ve1 immune receptor. Molecular Plant Pathology, v tisku

- <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12390>
- Stergiopoulos I., de Wit P.J. 2009. Fungal effector proteins. Annual Review of Phytopathology, 47: 233–263
- Stergiopoulos I., van den Burg H.A., Okmen B., Beenens H.G., van Liere S., Kema G.H.J., de Wit P. 2010. Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107: 7610–7615
- Stergiopoulos I., Collemare J., Mehrabi R., De Wit P.J. 2013. Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic *Dothideomycete* fungi. FEMS Microbiology Reviews, 37: 67–93
- Stergiopoulos I., Cordovez V., Okmen B., Beenens H.G., Kema G.H., de Wit P.J. 2014. Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. Molecular Plant Pathology, 15: 447–460
- Stotz H.U., Mitrousa G.K., de Wit P.J., Fitt B.D. 2014. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. Trends in Plant Science, 19: 491–500
- Strange R.N., Scott P.R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology, 43: 83–116
- Strawn M.A., Marr S.K., Inoue K., Inada N., Zubieta C., Wildermuth M.C. 2007. *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. Journal of Biological Chemistry, 282: 5919–5933
- Stukenbrock E.H. 2013. Evolution, selection and isolation: a genomic view of speciation in fungal plant pathogens. New Phytologist, 199: 895–907
- Tachibana A. 2004. Genetic and physiological regulation of non-homologous end-joining in mammalian cells. Advances in Biophysics, 38: 21–44
- Talbot N.J. 1995. Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. Trends in Microbiology, 3: 9–16
- Talboys P.W. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. Proceedings of the Royal Society, 181: 319–333
- Templeton M.D., Rikkerink E.H.A., Beever R.E. 1994. Small, cysteine rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions, 7: 320–325
- Thomma B.P.H.J., Nürnberg T., Joosten M.H.A.J. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. The Plant Cell, 23: 4–15
- Tian L., Xu J., Zhou L., Guo W. 2014. VdMsb regulates virulence and microsclerotia production in the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. Gene, 550: 238–244
- Timberlake W.E., Marshall M.A. 1989. Genetic engineering of filamentous fungi. Science, 244: 1313–1317
- Timpner C., Braus-Stromeyer S.A., Tran V.T., Braus G.H. 2013. The Cpc1 regulator of the cross-pathway control of amino acid biosynthesis is required for pathogenicity of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 26: 1312–1324
- Tonukari N.J., Scott-Craig J.S., Walton J.D. 2000. The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. Plant Cell, 12: 237–247

- Tran V., Braus-Stromeyer S.A., Kusch H., Reusche M., Kaever A., Valerius O., Landesfeind M., Aßhauer K., Tech M., Hoff K., Pena-Centeno T., Stanke M., Lipka V., Braus G.H. 2014. *Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots. *New Phytologist*, 11: 565–581
- Tsang A., Butler G., Powłowski J., Panisko E.A., Baker S.E. 2009. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 153–160
- Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J., Katagiri F. 2009. Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genetics*, 5: e1000772, doi: 10.1371/journal.pgen.1000772: 16 str.
- Tyler B.M., Rouxel T. 2013. Effectors of fungi and oomycetes: their virulence and avirulence functions and translocation from pathogen to host cells. V: *Molecular Plant Immunity*, Sessa G. (ed.). Ames, Wiley-Blackwell: 283 str.
- Tzfira T., Citovsky V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 147–154
- Tzima A., Paplomatas E.J., Rauyaree P., Kang S. 2010. Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 406–415
- Tzima A.K., Paplomatas E.J., Rauyaree P., Ospina-Giraldo M.D., Kang S. 2011. *VdSNF1*, the sucrose nonfermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell-wall degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24: 129–142
- Tzima A.K., Paplomatas E.J., Tsitsigiannis D.I., Kang S. 2012. The G protein β subunit controls virulence and multiple growth- and development-related traits in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 271–283
- Uma B., Rani T.S., Podile A.R. 2011. Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*, 168: 2141–2152
- Usami T., Itoh M., Amemiya Y. 2009. Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic. *Journal of General Plant Pathology*, 75: 422–427
- Vallad G.E., Subbarao K.V. 2008. Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 98: 871–885
- van Vu B., Itoh K., Nguyen Q.B., Tosa Y., Nakayashiki H. 2012. Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25: 1135–1141
- Vyas V.K., Barrasa M.I., Fink G.R. 2015. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Science Advances*, 1: e1500248, doi: 10.1126/sciadv.1500248: 7 str.
- Walton J.D. 1994. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiology*, 104: 1113–1118
- Wang J.L., Chen J.Y., Liu S.Y., Li L., Dai X.F. 2012. Construction and pathogenicity tests of a mutated specific fragment SCF73 in *Verticillium dahliae*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 52: 1335–1343
- Wang J.Y., Cai Y., Gou J.Y., Mao Y.B., Xu Y.H., Jiang W.H., Chen X.Y. 2004. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4989–4995

- Weiler E.W., Kutchan T.M., Gorba T., Brodschelm W., Niesel U., Bublitz F. 1994. The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Letters*, 345: 9-13
- Weld R.J., Plummer K.M., Carpenter M.A., Ridgway H.J. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research*, 16: 31–44
- Whiteford J.R., Spanu P.D. 2002. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology*, 3: 391–400
- de Wit P.J., Brandwagt B.F., van den Burg H.A., Cai X., van der Hoorn R.A., de Jong C.F., ... Luderer R. 2002. The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 409–412
- Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322: 681-692
- Wolpert T.J., Dunkle L.D., Ciuffetti L.M. 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annual Review of Phytopathology*, 40: 251–285
- Wösten H.A. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*, 55: 625–646
- Wright H.T., Sandrasegaran G., Wright C.S. 1991. Evolution of a family of n-acetylglucosamine binding-proteins containing the disulfide-rich domain of wheat-germ-agglutinin. *Journal of Molecular Evolution*, 33: 283–294
- Wysong D.R., Christin L., Sugar A.M., Robbins P.W., Diamond R.D. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infection and Immunity*, 66: 1953-1961
- Xiang T., Zong N., Zou Y., Wu Y., Zhang J., Xing W., Li Y., Tang X., Zhu L., Chai J., Zhou J.M. 2008. *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology*, 18: 74-80
- Xiong D., Wang Y., Ma J., Klosterman S.J., Xiao S., Tian C. 2014. Deep mRNA sequencing reveals stagespecific transcriptome alterations during microsclerotia development in the smoke tree vascular wilt pathogen, *Verticillium dahliae*. *BMC Genomics*, 15: 324, doi: 10.1186/1471-2164-15-324: 19 str.
- Xu J.R., Hamer J.E. 1996. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes & Development*, 10: 2696–2706
- Xu J.R., Staiger C.J., Hamer J.E. 1998. Inactivation of the mitogenactivated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 12713–2718
- Xu J.R. 2000. Map kinases in fungal pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 137–152
- Xu L., Zhu L.F., Tu L.L., Liu L.L., Yuan D.J., Jin L., Long L., Zhang X.L. 2011. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNASeq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *Journal of Experimental Botany*, 62: 5607–5621
- Xu X.Q., Pan S.Q. 2000. An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Molecular Microbiology*, 35: 407-414
- Yadeta K.A., Thomma B.P.H.P. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1–12

- Yajima W., Kav N.N. 2006. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics*, 6: 5995-6007
- Yang L., Jue D.W., Li W., Zhang R.J., Chen M., Yang Q. 2013. Identification of MiRNA from eggplant (*Solanum melongena* L.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahliae* infection. *PLoS One*, 8: e72840, doi: 10.1371/journal.pone.0072840: 10 str.
- Yang X., Ben S., Sun Y., Fan X., Tian C., Wang Y. 2013. Genome-wide identification, phylogeny and expression profile of vesicle fusion components in *Verticillium dahliae*. *PLoS One*, 8: e68681, doi: 10.1371/journal.pone.0068681: 15 str.
- Yang Z.H., Dickman M.B. 1999. *Colletotrichum trifolii* mutants disrupted in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase are nonpathogenic. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 430–439
- Yao Z., Rashid K.Y., Adam L.R., Daayf F. 2011. *Verticillium dahliae*'s VdNEP acts both as a plant defense elicitor and a pathogenicity factor in the interaction with *Helianthus annuus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33: 375–388
- Yi M., Park J.H., Ahn J.H., Lee Y.H. 2008. *MoSNF1* regulates sporulation and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1172–1181
- Yike I. 2011. Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia*, 171: 299–323
- de Young B.J., Innes R.W. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology*, 7: 1243-1249
- Zare R., Gams W., Starink-Willemse M., Summerbell R.C. 2007. Gibellulopsis, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and Musicillium, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia*, 85: 463–489
- Zeise K., Von Tiedemann A. 2002. Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. *Journal of Phytopathology*, 150: 112-119
- Zhang X., Zhao H., Gao S., Wang W.C., Katiyar-Agarwal S., Huang H.D., Raikhel N., Jin H. 2011. *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a golgi-localized SNARE gene, *MEMB12*. *Molecular Cell*, 42: 356–366
- Zhang Z. 2013. Functional analysis of tomato immune receptor Ve1 and recognition of *Verticillium* effector Ave1. Doctoral dissertation. Wageningen, Wageningen University: 191 str.
- Zhang Z., Esse H.P., van Damme M., Fradin E.F., Liu C.M., Thomma B.P.H.J. 2013. Ve1-mediated resistance against *Verticillium* does not involve a hypersensitive response in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 14: 719-727
- Zhou B.J., Jia P.S., Gao F., Guo H.S. 2012. Molecular characterization and functional analysis of a necrosis- and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25: 964–975
- Zhou L., Zhao J., Guo W., Zhang T. 2013. Functional analysis of autophagy genes via *Agrobacterium* mediated transformation in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Journal of Genetics and Genomics*, 40: 421–431

ZAHVALA

V prvi vrsti se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Branki Javornik za priložnost, da sem lahko pod njenim mentorstvom opravljal raziskavo. Zahvaljujem se za napotke, usmeritve, pomoč, podporo in nenazadnje za izkazano zaupanje v moje delo.

Zahvaljujem se komisiji za zagovor za pregled naloge, za odzivnost in prilagodljivost glede rokov zaključka doktorskega usposabljanja.

Najlepše se zahvaljujem vsem sodelavcem Katedre za genetiko za kakršno koli pomoč pri delu, še bolj pa za vse lepe trenutke, ki smo jih preživeli skupaj. Zahvaljujem se tudi sodelavcem na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, s katerimi smo sodelovali pri testih okuževanja hmelja, še posebej dr. Sebastjanu Radišku za vse koristne nasvete.

Za pomoč pri statistični analizi se zahvaljujem prof. dr. Katarini Košmelj za idejno vodenje ter Vasji Progarju za pomoč pri izvedbi statistične analize.

Zahvaljujem sem prof. dr. Bartu Thommi iz Univerze v Wageningenu za semena paradižnika, plazmid pBT081 ter vse nasvete v zvezi s funkcijsko analizo. Zahvaljujem se tudi njegovemu raziskovalcu Jordiju Boshovenu za vse praktične nasvete.

Za slovnični pregled naloge se zahvaljujem Nini.

Velika zahvala gre moji družini, ki mi je vsa leta študija stala ob strani in me podpirala v mojih odločitvah. Mami, ati, hvala za vso pomoč. Helena, hvala za podporo.

Draga Sara, hvala za »prenašanje« moje odsotnosti predvsem v zadnjih mesecih pred zagovorom.

PRILOGA A

Začetni oligonukleotidi (ZO), ki so bili uporabljeni v doktorskem delu. V opombah je naveden namen uporabe ZO.

Ime ZO	Nukleotidno zaporedje ZO v smeri 5' proti 3'	Opombe
Kloniranje knock-out plazmidov		
RF1_for	AAATTTGTGCTACCGCCTGGAC	Uporaba v različnih kombinacijah
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	Uporaba v različnih kombinacijah
PRX_O1for PRX_O2rev	GGTCTTAAUAATCACGAGGCCAACGATAG GGCATTAUTCGTATCGATGATGCGAGAA	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>VnaPRX1.1277</i>
PRX_A3for PRX_A4rev	GGACTTAAUACTGAATGTGCCCTGAAC GGGTTAAUATAGAGAGACGGCGAACGAA	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>VnaPRX1.1277</i>
SSP_O1for SSP_O2rev	GGTCTTAAUAACGATCGAAAAGCAATT GGCATTAUGGCTTGTAAACCTGAAACACG	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>VnaSSP4.2</i>
SSP_A3for SSP_A4rev	GGACTTAAUAGCTTCATTCCATGGCCTTT GGGTTAAUACTGCACCCCTGTCACT	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>VnaSSP4.2</i>
CBD_O1for CBD_O2rev	GGTCTTAAUTGGAACCTCTTCGCAATCC GGCATTAUGAGTGTGTCGACTAGGGCTTGG	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>VnaCBD8.213</i>
CBD_A3for CBD_A4rev	GGACTTAAUCGGCTGTGTTACATCACGTT GGGTTAAUGTCGTTCTCACCTCGCAAT	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>VnaCBD8.213</i>
HYPO_O1for HYPO_O2rev	GGTCTTAAUGCGTTGATGGCCTTAGAGAG GGCATTAUAGGGAAAGATAACCGCGTCA	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>VnaHYPO7.546</i>
HYPO_A3for HYPO_A4rev	GGACTTAAUGGAAAGGGCAGCATTCCTTC GGGTTAAUCCGACTTGACTGGGGTGT	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>VnaHYPO7.546</i>
g1_O1for g1_O2rev	GGTCTTAAUAGGAAACACTTGGAGGAAGC GGCATTAUGTCCCACACAGCACAGAGG	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>Vna1gUN</i>
g1_A3for g1_A4rev	GGACTTAAUCAAACATCAGACAGCCATCG GGGTTAAUAGGAGGCTCTGGGTGAGATA	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>Vna1gUN</i>
g2_O1for g2_O2rev	GGTCTTAAUTGCCTGGATCAACTTACGTG GGCATTAUATGTATCGACGTGGAGGAC	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>Vna2gUN.246</i>
g2_A3for g2_A4rev	GGACTTAAUGGTACATACGGAGCGCTGAT GGGTTAAUGTATCAACCCCTGTCCATGC	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>Vna2gUN.246</i>
g3_O1for g3_O2rev	GGTCTTAAUTCAC TG CAGAAGATGGCAA GGCATTAUCGACTGTCTCCCTGGAGAC	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>Vna3g4.790</i>
g3_A3for g3_A4rev	GGACTTAAUGTGACAATGCTTCACGGAGA GGGTTAAUGAAAGCCTACTAGCGGAAGC	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>Vna3g4.790</i>
g4_O1for g4_O2rev	GGTCTTAAUTGAAACCTGCCCTTCTGTC GGCATTAUCCCTTCTCTTCCGACCT	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>Vna4gUN.245</i>
g4_A3for g4_A4rev	GGACTTAAUCATTACCTCCGCTGCAAAT GGGTTAAUCGTTCTGGATGAGAACCT	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>Vna4gUN.245</i>
g5_O1for g5_O2rev	GGTCTTAAUTTTAAC TTTACTACTCTTCC GGCATTAUCTCTGTCTGCCGAAGTCC	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>Vna5g9</i>
g5_A3for g5_A4rev	GGTCTTAAUGAGCATTAGCGACTGAGAACG GGCATTAUCATCCGGTCTGGTCTACAC	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>Vna5g9</i>
g6_O1for g6_O2rev	GGTCTTAAUCTCCAGAGCCTGGTCTATCG GGCATTAUUAAGGCTCGGGCTGTGATAC	Pomnoževanje HRS1 za gen <i>Vna6g4.792</i>
g6_A3for g6_A4rev	GGACTTAAUCACTATGCCCTGCTGGTCGT GGGTTAAUGTGATAGCAGTGTGGCTGGA	Pomnoževanje HRS2 za gen <i>Vna6g4.792</i>

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Ime ZO	Nukleotidno zaporedje ZO v smeri 5' proti 3'	Opombe
Kloniranje knock-out plazmidov		
g7_O1for	GGCTTAAUATGAATGCCCGAAGAGT	Pomnoževanje HRS1 za
g7_O2rev	GGCATTAUGCACACTTCGTACGACCAAC	gen <i>Vna7gUN</i>
g7_A3for	GGACTTAAUATCTGAAAGCGACGACAA	Pomnoževanje HRS2 za
g7_A4rev	GGGTTAAUCTGTCATTGCGCTGTGTA	gen <i>Vna7gUN</i>
g8_O1for	GGCTTAAUTAAGACACGGTGACCCACA	Pomnoževanje HRS1 za
g8_O2rev	GGCATTAUGGGAACGAGAAGGGACTTG	gen <i>Vna8gUN.246</i>
g8_A3for	GGACTTAAUATTGCTGACCCTGAGACT	Pomnoževanje HRS2 za
g8_A4rev	GGGTTAAUGCCTCAGAACATTCCAT	gen <i>Vna8gUN.246</i>
g9_O1for	GGCTTAAUCGGAGTAGGATCCATATCCTGTG	Pomnoževanje HRS1 za
g9_O2rev	GGCATTAUCCGGCAGTGTCTTACCTGGTT	gen <i>Vna9gUN.496</i>
g9_A3for	GGACTTAAUACCATGACCGTCGTCAG	Pomnoževanje HRS2 za
g9_A4rev	GGGTTAAUACCTCATCTGCAGCAAAGAC	gen <i>Vna9gUN.496</i>
g10_O1for	GGCTTAAUCAACGAGGGAGAGAACAG	Pomnoževanje HRS1 za
g10_O2rev	GGCATTAUCAGCACTTCTCATGGCTCA	gen <i>Vna10g4.803</i>
g10_A3for	GGACTTAAUTCGCCACAACACTACAACA	Pomnoževanje HRS2 za
g10_A4rev	GGGTTAAUAAGCGGATTATGGCAACAG	gen <i>Vna10g4.803</i>
g11_O1for	GGCTTAAUGGGTGCTTGTAAGCCAAAAA	Pomnoževanje HRS1 za
g11_O2rev	GGCATTAUCCGGAGATGCCTCTCCTTGG	gen <i>Vna11g4.791</i>
g11_A3for	GGACTTAAUGCAGAGGCTCTGATCACCT	Pomnoževanje HRS2 za
g11_A4rev	GGGTTAAUACGCACATTGAGGAAACC	gen <i>Vna11g4.791</i>
g12_O1for	GGCTTAAUAGTTGCTAACGCCCTAGC	Pomnoževanje HRS1 za
g12_O2rev	GGCATTAUTCACGCCCTTAGGAATTATCC	gen <i>Vna12gUN.279</i>
g12_A3for	GGACTTAAUTGGATTGAGGTTCCGACAT	Pomnoževanje HRS2 za
g12_A4rev	GGGTTAAUTACGCCATCATCCAAGACAG	gen <i>Vna12gUN.279</i>
Potrjevanje delecijskih mutantov		
PRXgen_for	TGTCCAACTTGCTGAACGAG	1. par ZO za
PRXgen_rev	GGCCATGCTGATACTTGT	<i>VnaPRX1.1277</i>
PRX_RHRS_for	CCCTCTGTCGCATTCAAAC	2. par ZO za
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	<i>VnaPRX1.1277</i>
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za
PRX_LHRS_rev	TCAACAGGCCCTGCTTAGGAT	<i>VnaPRX1.1277</i>
SSPgen_for	AGACGTTCACTCTGCCACT	1. par ZO za
SSPgen_rev	GGATAGGCTCCACGACAAGA	<i>VnaSSP4.2</i>
SSP_RHRS_for	CTTAGCCAGCCCCCTAGCTT	2. par ZO za
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	<i>VnaSSP4.2</i>
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za
SSP_LHRS_rev	AACCTGCCAGAACACATC	<i>VnaSSP4.2</i>
CBDgen_for	ACAACTTGCTGCCGTCT	1. par ZO za
CBDgen_rev	GGACAGATCAAGCCGTTAGC	<i>VnaCBD8.213</i>
CBD_RHRS_for	GACCACTTGTGCCGTAT	2. par ZO za
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	<i>VnaCBD8.213</i>
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za
CBD_LHRS_rev	GTCAGATACCGAGCCGTGTT	<i>VnaCBD8.213</i>
HYPOgen_for	AGCCGATTGAGGTTCTGTC	1. par ZO za
HYPgen_rev	CGGAGGTTGTCACGACATA	<i>VnaHYPO7.546</i>
HYPO_RHRS_for	CTCCCTCAATATCGCTCTCG	2. par ZO za
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	<i>VnaHYPO7.546</i>
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za
HYPO_LHRS_rev	ATTGCCAGACGAATTGGAAG	<i>VnaHYPO7.546</i>

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Ime ZO	Nukleotidno zaporedje ZO v smeri 5' proti 3'	Opombe
Potrjevanje delecijskih mutantov		
g1gen_for	CTGCCGATGAAGGTGGTATT	1. par ZO za <i>Vna1gUN</i>
g1gen_rev	AGGACATGAAAAGGGTCGTG	
g1_RHRS_for	ACGAGGCTTGTGTTCTCT	2. par ZO za <i>Vna1gUN</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna1gUN</i>
g1_LHRS_rev	TCGGTATCCACCTCGATGAT	
g2gen_for	CGAGTCCTTCTCGAGTCACC	1. par ZO za <i>Vna2gUN.246</i>
g2gen_rev	AGATTGCGTGGTCCATAG	
g2_RHRS_for	GTCTTCTTGCACCGAACCATTCTTG	2. par ZO za <i>Vna2gUN.246</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna2gUN.246</i>
g2_LHRS_rev	GGTCCATGGATGAGGAAGTT	
g4gen_for	GTATCTCTCCGTCGCGTCTC	1. par ZO za <i>Vna4gUN.245</i>
g4gen_rev	TCGTTTCAAGGCAACTCTT	
g4_RHRS_for	CGCTGAGTTGGAGCTCTGTA	2. par ZO za <i>Vna4gUN.245</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna4gUN.245</i>
g4_LHRS_rev	TTACATGTCGGCCTTCCTC	
g5gen_for	GAGTTGCCGTTGTTGGTT	1. par ZO za <i>Vna5g9</i>
g5gen_rev	CAACTCACTTGCCTTCACGA	
g5_RHRS_for	GACCCCTCGTCTACCGATTA	2. par ZO za <i>Vna5g9</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna5g9</i>
g5_LHRS_rev	CCTCCACTTTCGTCTTCAA	
g6gen_for	CCCGCTTCATGTTCAAGAG	1. par ZO za <i>Vna6g4.792</i>
g6gen_rev	TCCATAACATCGGCCTTTTC	
g6_RHRS_for	GGGCTTCACAGGACACATCT	2. par ZO za <i>Vna6g4.792</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna6g4.792</i>
g6_LHRS_rev	ATAGAGCACCTGCGAACAT	
g7gen_for	TACCCCTCTCCCTCTGAT	1. par ZO za <i>Vna7gUN</i>
g7gen_rev	TCAGCCGTATTGCAGTCAG	
S g7_RHRS_for	AGCATGCTGGTGTGTC	2. par ZO za <i>Vna7gUN</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna7gUN</i>
g7_LHRS_rev	AAGTAGGTAACCGGGCGAACG	
g8gen_for	ACGGATATTCGTGGCAGATAG	1. par ZO za <i>Vna8gUN.246</i>
g8gen_rev	GGGTGTGCTCACGATAACCT	
g8_RHRS_for	GATGTCCTGTTCTGCCTGT	2. par ZO za <i>Vna8gUN.246</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna8gUN.246</i>
g8_LHRS_rev	AGACCTGTCGACCAGCTTG	
g9gen_for	AGCGTAGGACCATGACATCC	1. par ZO za <i>Vna9gUN.496</i>
g9gen_rev	CCTCATCCCACAGGACAAGT	
g9_RHRS_for	GCCTACAGCAACGAGGAGAG	2. par ZO za <i>Vna9gUN.496</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna9gUN.496</i>
g9_LHRS_rev	ATTCCCTATAGTCGCTATCCTC	

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Ime ZO	Nukleotidno zaporedje ZO v smeri 5' proti 3'	Opombe
Potrjevanje delecijskih mutantov		
g10gen_for	CAGGAAATTCCGGCAGATAA	1. par ZO za <i>Vna10g4.803</i>
g10gen_rev	GGTGGACCTCTGAACGTGT	
g10_RHRS_for	GTTACGGCAGAGAGGGATCA	2. par ZO za <i>Vna10g4.803</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna10g4.803</i>
g10_LHRS_rev	GGTGGTACGCATCGACTTC	
g11gen_for	CGGGCTGCTATCTAGTCGTC	1. par ZO za <i>Vna11g4.791</i>
g11gen_rev	GAAAGACACGCCCTCGAGTTC	
g11_RHRS_for	TGTAAAAGGGAAACCCCGTA	2. par ZO za <i>Vna11g4.791</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna11g4.791</i>
g11_LHRS_rev	CCAGTAAGGGCTGGTTCA	
g12gen_for	GCAGAGCAGGAGGATACTGC	1. par ZO za <i>Vna12gUN.279</i>
g12gen_rev	GAATGCTGCCAGAACGTGTCA	
g12_RHRS_for	TTAAGTGGTATATGACTTTATCTAGAATCG	2. par ZO za <i>Vna12gUN.279</i>
RF2_rev	TCTCCTTGCATGCACCATTCTTG	
RF1_for	AAATTTGTGCTCACCGCCTGGAC	3. par ZO za <i>Vna12gUN.279</i>
g12_LHRS_rev	GCTTCACCCCTGACGAGATA	
Hyg_for	AGCTGCGCCGATGGTTCTACAA	6. par ZO za pomnoževanje gena <i>hph</i> iz higromicinske kasete
Hyg_rev	GCGCGTCTGCTGCTCCATACAA	
Poverjanje ekspresije <i>VnaPRX1.1277</i> in <i>VnaSSP4.2</i>		
PRX1.1277_exp_for	CGTTGGCAGAGACCTCAAGAA	Ekspresija gena <i>VnaPRX1.1277</i>
PRX1.1277_exp_rev	CTGTGAGGGTCTGCGCTAT	
SSP4.2_exp_for	CTACGCTTACCGTTGCCATCA	Ekspresija gena <i>VnaSSP4.2</i>
SSP4.2_exp_rev	TAGGCTCCACGACAAGATCGA	
TOP_for	GCATGGTTTCGGATCCAT	Ekspresija ref. gena topoizomeraza
TOP_rev	TACCTCGCGGAAATCCTCAA	
SF_for	GCGCTCGAGACGATCAACCT	Ekspresija ref. gena splicing faktor
SF_rev	AGGTACGAGCCGTCGTTCTG	
ZO za komplementacijo		
ZEO_kasetaSpeI_for	ATCGAGACTAGTCACAGGAAACAGCTATGACATGA	Pomnoževanje zeomicinske kasete iz plazmida pBT081
ZEO_kasetaApaI_rev	ATCGAGGGGCCGGCTTGAGAGTTCAAGGAAGAA	
plHUEsp1_for	AAGGGAGTCACGAAGCTAAATC	Pomnoževanje levega stičišča med ogrodjem pRF-HUE plazmida in zeomicinsko kaseto
plHUEsp1_rev	ACAGATTTGGGAGCTCGGTA	
plHUEsp2_for	CTTGACATGCTCCTCTCTT	Pomnoževanje desnega stičišča med ogrodjem pRF-HUE plazmida in zeomicinsko kaseto
plHUEsp2_rev	GTCAGCCAATGCAAACAGA	
gpdA_for	TCCTCCCCATCCCTTATTCC	Pomnoževanje konca gpdA promotorja vključno z levim UCS zaporedjem
RF1_rev	ACACGCCTGGGTCAATGAT	
PRX1.1277_comp_for	GGACTTAAUCCAGGCTTCGAATCATATC	Pomnoževanje gena <i>VnaPRX1.1277</i> za namene priprave kompl. plazmida
PRX1.1277_comp_rev	GGGTTAAUAAGTGCTAAGCTAGCCTCTTAATCA	

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Ime ZO	Nukleotidno zaporedje ZO v smeri 5' proti 3'	Opombe
ZO za komplementacijo		
SSP4.2_comp_for SSP4.2_comp_rev	GGACTTAAUAACAAACCACCCAAAATCTCA GGGTTTAAUGACCCATCAACAGTGCTACG	Pomnoževanje gena <i>VnaSSP4.2</i> za namene priprave kompl. plazmida
ZEO_for ZEO_rev	CAAGTTGACCAGTGCGTTC GAAGTCGTCTCCACGAAGT	2. par ZO za pomnoževanje notranjega dela <i>ble</i> gena iz zeomicinske kasete

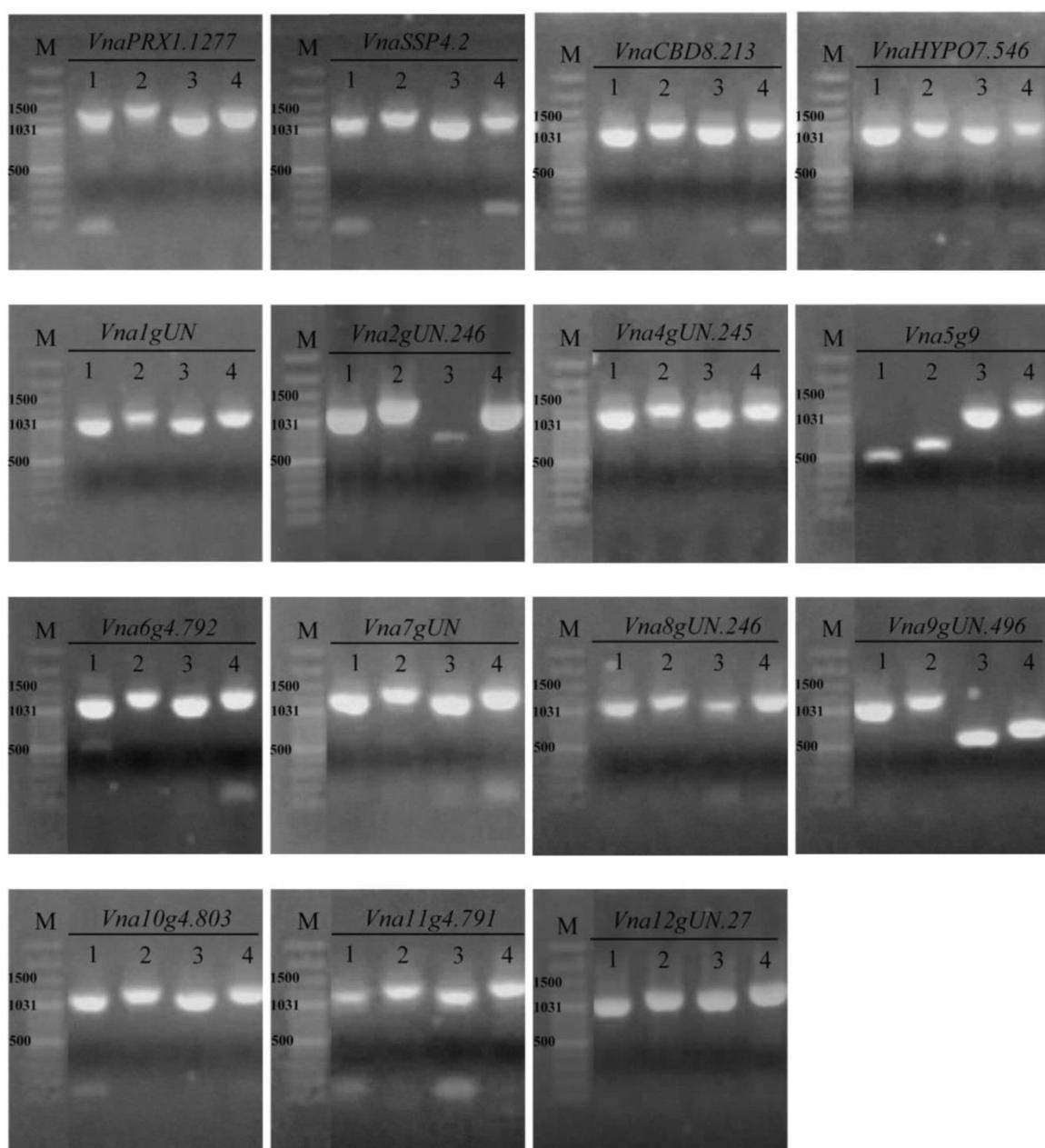
PRILOGA B

Dolžine predvidenih PCR produktov pri preverjanju knock-out plazmidov in slike gelske elektroforeze preverjanja posamezenga knock-out plazmida. Na sliki gelov so prikazani dolžinski standard in fragmenti posameznih specifičnih ZO za knock-out plazmid za posamezen gen.

Gen	Dolžina produkta ZO			
	O1/O2	O1/RF2	A3/A4	RF1/A4
<i>VnaPRX1.1277</i>	1324	1450	1216	1343
<i>VnaSSP4.2</i>	1180	1300	1138	1266
<i>VnaCBD8.213</i>	1076	1200	1137	1268
<i>VnaHYPO7.546</i>	1113	1235	1136	1267
<i>Vna1gUN</i>	1018	1140	1005	1135
<i>Vna2gUN.246</i>	1171	1293	1097	1226
<i>Vna4gUN.245</i>	1130	1252	1108	1237
<i>Vna5g9</i>	486	608	1092	1221
<i>Vna6g4.792</i>	1074	1198	1085	1214
<i>Vna7gUN</i>	1121	1243	1084	1213
<i>Vna8gUN.246</i>	1120	1242	1123	1252
<i>Vna9gUN.496</i>	1084	1203	581	710
<i>Vna10g4.803</i>	1076	1198	1078	1207
<i>Vna11g4.791</i>	1089	1211	1101	1230
<i>Vna12gUN.279</i>	994	1116	1127	1256

Pomen oznak:

- M – dolžinski standard (bp);
- 1 - produkt O1/O2 para ZO;
- 2 - produkt O1/RF2 para ZO;
- 3 - produkt A3/A4 para ZO;
- 4 - produkt RF1/A4 para ZO;
- zapis imena gena nad številkami označuje knock-out plazmid za dotični gen.



PRILOGA C

Geli s PCR fragmenti za enega delecijskega mutanta za vsak kandidatni gen. Odsotnost ali prisotnost pričakovanih PCR produktov na gelu potrjuje izbitje kandidatnega gena.

Gen	Oznaka PCR fragmenta na gelu	Dolžina PCR fragmenta
<i>VnaPRX1.1277</i>		
1. par ZO	1	506
2. par ZO	2	1767
3. par ZO	3	1624
4. par ZO	4	1324
5. par ZO	5	1216
6. par ZO	6	588
<i>VnaSSP4.2</i>		
1. par ZO	1	222
2. par ZO	2	1471
3. par ZO	3	1817
4. par ZO	4	1180
5. par ZO	5	1138
6. par ZO	6	588
<i>VnaCBD8.213</i>		
1. par ZO	1	538
2. par ZO	2	1649
3. par ZO	3	1910
4. par ZO	4	1076
5. par ZO	5	1137
6. par ZO	6	588
<i>VnaHYP07.546</i>		
1. par ZO	1	661
2. par ZO	2	1698
3. par ZO	3	1948
4. par ZO	4	1113
5. par ZO	5	1136
6. par ZO	6	588
<i>Vna4gUN.245</i>		
1. par ZO	1	656
2. par ZO	2	1525
3. par ZO	3	1730
4. par ZO	4	1130
5. par ZO	5	1108
6. par ZO	6	588
<i>Vna5g9</i>		
1. par ZO	1	504
2. par ZO	2	657
3. par ZO	3	1602
4. par ZO	4	486
5. par ZO	5	1092
6. par ZO	6	588

Gen	Oznaka PCR fragmenta na gelu	Dolžina PCR fragmenta
<i>Vna6g4.792</i>		
1. par ZO	1	1997
2. par ZO	2	1738
3. par ZO	3	1575
4. par ZO	4	1074
5. par ZO	5	1085
6. par ZO	6	588
Gen	Oznaka PCR fragmenta na gelu	Dolžina PCR fragmenta
<i>Vna8gUN.246</i>		
1. par ZO	1	1550
2. par ZO	2	1640
3. par ZO	3	1664
4. par ZO	4	1120
5. par ZO	5	1120
6. par ZO	6	588
Gen	Oznaka PCR fragmenta na gelu	Dolžina PCR fragmenta
<i>Vna9gUN.496</i>		
1. par ZO	1	1278
2. par ZO	2	1475
3. par ZO	3	745
4. par ZO	4	1084
5. par ZO	5	581
6. par ZO	6	588
Gen	Oznaka PCR fragmenta na gelu	Dolžina PCR fragmenta
<i>Vna10g4.803</i>		
1. par ZO	1	1682
2. par ZO	2	1553
3. par ZO	3	1491
4. par ZO	4	1076
5. par ZO	5	1078
6. par ZO	6	588
Gen	Oznaka PCR fragmenta na gelu	Dolžina PCR fragmenta
<i>Vna11g4.791</i>		
1. par ZO	1	1482
2. par ZO	2	1401
3. par ZO	3	1664
4. par ZO	4	1089
5. par ZO	5	1101
6. par ZO	6	588
gen	Oznaka PCR fragmenta na gelu	Dolžina PCR fragmenta
<i>Vna12gUN.279</i>		
1. par ZO	1	1500
2. par ZO	2	1261
3. par ZO	3	1491
4. par ZO	4	994
5. par ZO	5	1127
6. par ZO	6	588

ERRATA

Stran z napako	Vrstica z napako	Namesto	Naj bo
5	3	filaid	fialid
5	3	filaid	fialid
5	28	filaid	fialid
6	2	filaide	fialide
6	16	filaidami	fialidami
6	16	filaid	fialid
8	18	filaid	fialid
8	18	filaide	fialide
8	19	filaide	fialide

Marko FLAJŠMAN