

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC TERČELJ

**TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA ENDOFITSKIH GLIV S  
POMOČJO NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA JEDRNE  
RIBOSOMSKE DNA**  
**TAXONOMIC IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC FUNGI USING  
NUCLEOTID SEQUENCE OF NUCLEIC RIBOSOMAL DNA**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljajal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Matjaža Ravnikarja, mag. farm..

Določanje nukleotidnega zaporedja je izvedlo podjetje GATC Biotech, Köln, Nemčija.

## Zahvala

V prvi vrsti se želim zahvaliti mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. za priložnost opravljati sklepno dejanje študija pod njegovim mentorstvom in asist. dr. Matjažu Ravnikarju, mag. farm. za vso pomoč ter nasvete in usmeritve pri izvedbi laboratorijskega dela kot tudi samega pisanja. Hvala še ostalim članom Katedre za farmacevtsko biologijo ter vsem kolegom iz biotehnološkega laboratorija za družbo in pomoč pri laboratorijskem delu diplome. Nenazadnje se želim zahvaliti tudi moji družini za vso podporo, vzpodbudo in razumevanje ter vsem kolegom za nepozabne trenutke tekom študija. Posebna zahvala gre Jerneju in Maticu za pomoč pri uporabi urejevalnika besedil LaTeX.

## IZJAVA

Izjavljam, da:

- sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta in somentorstvom asist. dr. Matjaža Ravnikarja.

Podpis avtorja:

# Kazalo

**Povzetek**

**Abstract**

**Seznam okrajšav**

<b>1</b>	<b>Uvod</b>	<b>1</b>
1.1	Glive . . . . .	1
1.2	Endofiti . . . . .	2
1.3	Sekundarni metaboliti - protimikrobne učinkovine iz endofitskih gliv .	3
1.4	Taksonomsko določanje gliv . . . . .	6
1.5	Primerni regiji jedrne ribosomske DNA za vrstno določanje gliv - regiji ITS in IGS . . . . .	7
1.6	Določanje nukleotidnega zaporedja . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Namen dela</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Materiali in metode</b>	<b>11</b>
3.1	Aparature . . . . .	11
3.2	Reagenti . . . . .	11
3.3	Laboratorijski pribor in material . . . . .	14
3.4	Gojišče . . . . .	14
3.5	Biološki material . . . . .	15
3.6	Izolacija genomske DNA . . . . .	15
3.7	Čiščenje genomske DNA s preobarjanjem . . . . .	18
3.8	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) . . . . .	18

## KAZALO

3.9	Gelska elektroforeza . . . . .	21
3.10	Določanje koncentracije gDNA s spektrofotometrom NanoDrop 1000 . . . . .	23
3.11	Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja . . . . .	24
3.12	Priprava trajnih kultur . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Rezultati</b>	<b>27</b>
4.1	Začetni izbor gliv . . . . .	27
4.2	Gojenje gliv na trdnem gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA) . . . . .	27
4.3	Izolacija gDNA, PCR, agarozna gelska elektroforeza, čiščenje DNA in določanje nukleotidnega zaporedja . . . . .	30
4.4	Primerjava ujemanj nukleotidnih zaporedij . . . . .	32
<b>5</b>	<b>Razprava</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Sklep</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>Priloge</b>	<b>42</b>
	<b>Literatura</b>	<b>42</b>



# Slike

1	Metoda določanja MIK in MBK. . . . .	5
2	Primer elektroferograma. . . . .	9
3	Lokacija naleganja oligonukleotidnih začetnikov ITS1 in ITS4 na genih jedrne rDNA [38]. . . . .	17
4	Potek PCR reakcije. . . . .	19
5	Shema ločevanja DNA fragmentov z gelsko elektroforezo [34]. . . . .	22
6	Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja [43]. . . . .	24
7	Shema poteka dela; zeleno obarvana polja predstavljajo naše delo, ostalo je delo predhodnih raziskav v okviru FFA. . . . .	28
8	Glivne kulture na gojiščih PDA. . . . .	29
9	Spektrofotometrično določanje čistosti DNA; nečist vzorec št. 33 ( <i>Lophodermium pinastri</i> ) pred čiščenjem. $A_{260}/A_{280} = 1,54$ . . . . .	31
10	Spektrofotometrično določanje čistosti DNA; čist vzorec št. 33 ( <i>Lophodermium pinastri</i> ) po čiščenju. $A_{260}/A_{280} = 1,79$ . . . . .	31
11	Agarozna elektroforeza PCR produktov - ločitev posameznih fragmentov (1 in 9= označevalec velikosti 50 BP in 1k BP, 2=pozitivna kontrola, afriška vijolica - <i>Saintpaulia ionantha</i> H. Wendl., 3 in 4=sev 35 in 35C - <i>L. seditiosum</i> , 5=sev 38 - <i>P. herbarum</i> , 6 in 7=sev 2 in 33 - <i>L. pinastri</i> , 8= <i>L. pinastri</i> - zgornja lisa, velika cca. 500 BP, spodnja lisa cca 250 BP, verjetno produkt nespecifičnega pomnoževanja). . . . .	33
12	Genetsko drevo - primerjava sekvenc sevov št 2 in 33 z najsorodnejšimi vrstami. . . . .	34

## SLIKE

13	Primerjava sekvenc različnih sevov št. 2 in 33, oba pripadata vrsti <i>L. pinastri</i> . . . . .	35
14	vzorec št. 38, <i>Phoma herbarum</i> , $A_{260}/A_{280} = 1,62$ . . . . .	38
15	Nukleotidno zaporedje seva 38 - <i>Phoma herbarum</i> . . . . .	43
16	Nukleotidno zaporedje seva 2 - <i>Lophodermium pinastri</i> . . . . .	44
17	Nukleotidno zaporedje seva 33 - <i>Lophodernium pinastri</i> . . . . .	45
18	Nukleotidno zaporedje seva 35 - <i>Lophodernium seditiosum</i> . . . . .	46
19	Nukleotidno zaporedje seva 35C - <i>Lophodernium seditiosum</i> . . . . .	47

# Povzetek

Odpornost določenih sevov mikrobov na antibiotike se nenehno povečuje, s tem pa potreba po novih, učinkovitejših in izpopolnjenih protimikrobnih zdravilih. Glive, še posebej endofitske, so obetaven vir novih protimikrobnih učinkovin. Iz rastlinskih vzorcev je bilo predhodno izoliranih triinsedemdeset sevov endofitskih gliv, večino iz iglic iglavcev. Izvlečke vseh sevov so preizkusili na protimikrobno učinkovitost z uporabo mikrodilucijskega testa. Sevi, ki so izkazali učinkovitost proti testni gram-negativni bakteriji *Escherichia coli* (sev ER2738), smo nadalje preučevali. Izolirali smo genomsko DNA iz petih protimikrobno aktivnih sevov ter jo dodatno očistili pred pomnoževanjem vrstno značilnih DNA regij (ITS regije) s pomočjo verižne reakcije s polimerazo. Pomnožene fragmente smo nadalje ločili na agaroznem gelu v okviru gelske elektroforeze. Čistost izolirane in nato pomnožene DNA smo preverjali spektrofotometrično, vsakemu DNA fragmentu smo določili nukleotidno zaporedje. Le-ta so nam omogočila primerjavo s sekvencami vrst, ki so že vnešene v zbirko podatkov GenBank. Primerjavo med našimi, analiziranimi sekvencami in najbližjimi sekvencami iz baze podatkov nam je olajšal program NBLAST in s tem identifikacijo glivnih sevov do nivoja vrste z visoko gotovostjo. Ujemanje nukleotidnih zaporedij je bilo namreč 99%. Predhodno so bile iste glive določene morfološko in rezultati so se ujemali. S tem smo navzkrižno potrdili dobljene rezultate. Dva seva protimikrobno aktivnih endofitskih gliv pripadata vrsti *Lophodermium pinastri*, dva sta *Lophodermium seditiosum* ter en sev vrsti *Phoma herbarum*. Vseh pet neobjavljenih nukleotidnih zaporedij je bilo uvrščenih v gensko bazo podatkov GenBank pod zaporednimi številkami KC608049, KC608050, KC608051, KC608052 and KC608053. Vse omenjene vrste veljajo za zajedalske, tako da jih prištevamo k endofitom zgolj glede na kraj najdbe. Dano diplomsko delo predstavlja zanimiv pristop pri iskanju

novih protimikrobnih učinkovin, kjer izhajamo iz naravnega vira, ki ga identificiramo šele, ko v njem najdemo biološko aktivnost - od iglice do potencialne učinkovine.

### **Ključne besede**

Endofitske, glive, *Lophodermium seditiosum*, *Lophodermium pinastri*, *Phoma herbarum*, antimikrobno, določanje nukleotidnega zaporedja, regija ITS, iglice, GenBank

# Abstract

Drug resistance of some strains of microbes is constantly increasing, so is the need for new, more effective and innovative antimicrobial drugs. Fungi and in particular endophytes are a promising source of new antimicrobial compounds. Seventy-three strains of endophytic fungi were isolated from plant samples, mainly from needles of conifers. Extracts of cultured endophytic strains were tested for antimicrobial properties using microdilution test. Strains that exhibited antimicrobial properties on test *Escherichia coli* (strain ER2738) were further examined. Genomic DNA from five active fungal strains was isolated and additionally purified before further amplification using polymerase chain reaction of species-specific DNA regions (ITS regions). Amplified fragments have been separated via agar gel electrophoresis. Purity of isolated and amplified DNA was checked spectrophotometrically. DNA sequencing was performed by GATC Biotech only to purified fragments of DNA. The sequences we got have been compared to those available in the database GenBank. We used software NBLAST, which makes alignment easier to compare. Sequences allowed us to determine the identity of the samples as precise as the exact species level, since the alignment of sequences was as high as 99%. That is how we confirmed previously determined fungi species using morphologic properties. Active endophytic fungi turned out to be two strains of *Lophodermium pinastri*, two strains of *Lophodermium seditiosum* and one strain of *Phoma herbarum*. All five unpublished sequences have been submitted to the GenBank database under the accession numbers: KC608049, KC608050, KC608051, KC608052 and KC608053. All of these strains are known as parasitic and can be treated as endophytes only according to the location of discovery. This master thesis demonstrates an interesting bottom-up approach for discovery of new antimicrobial compounds - from needle to a potential

drug.

## **Keywords**

Endophytic, fungi, *Lophodermium seditiosum*, *Lophodermium pinastri*, *Phoma herbarum*, antimicrobial, DNA sequencing, ITS, needles, GenBank

# Seznam okrajšav

BP - bazni par

ddNTP - dideoksinukleozid trifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)

gDNA – genomski deoksiribonukleinska kislina (genomic deoxyribonucleic acid)

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High-Performance Liquid Chromatography)

IGS - neprepisani (medgenski) vmesnik ribosomske DNA (Intergenic Spacer ali non-transcribed spacer)

ITS – notranji prepisani vmesnik ribosomske DNA (Internal Transcribed Spacer)

LAF – aseptična komora z laminarnim pretokom zraka (laminar air flow)

LAMP - izotermalno pomnoževanje, posredovano z zanko za določanje nukleinskih kislin (Loop-mediated isothermal AMPLification)

mRNA - informacijska ribonukleinska kislina (messenger RNA)

MBK – minimalna baktericidna koncentracija

MCM7 - gen, ki kodira minikromosom vzdrževalni protein (gene encoding a Mini-Chromosome Maintenance protein 7)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MS – masna spektrometrija (Mass Spectrometry)

MRSA - proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

NCCLS – nacionalni komite za klinične laboratorijske standarde (the national committee for clinical laboratory standards)

NMR – jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

PDA – trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo (potato dextrose agar)

qc - prekrivanje nukleotidnega zaporedja (query cover)

rpm - obrati na minuto (rounds per minute)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kislina (ribosomal ribonucleic acid)

RT-PCR - obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (reverse transcriptase PCR)

SSU - majhna podenota gena za jedro rDNA (small subunit rDNA gene)

RPB1 - največja podenota RNA polimeraze II (largest subunit of RNA polymerase II)

RPB2 - druga največja podenota RNA polimeraze II (second largest subunit of RNA polymerase II)

TAE pufer - pufer, ki vsebuje tris, očetna kislina, EDTA

VRE - proti vankomicinu odporni enterokoki (Vancomycin-resistant enterococcus)



# Poglavje 1

## Uvod

### 1.1 Glive

#### 1.1.1 Osnovne značilnosti

Glive (*Eumycota*) živijo na kopnem, v sladkih vodah, redkeje v morju. So heterotrofni organizmi, ki živijo saprofitsko, parazitsko in simbiotsko [1]. Imajo lastnosti tako rastlin kot živali, zato predstavljajo svoje kraljestvo. Heterotrofi niso samo glede energetske preskrbe in presnove ogljika (prehranjujejo se s črpanjem hranil iz okolice), ampak tudi glede prehrane z dušikovimi spojinami in drugimi hranili. Imajo celično steno, ki ščiti celice pred spremembami osmotskega pritiska, jim daje obliko in določa antigenske lastnosti. Nižje oblike imajo celulozno, razvitejše pa hitinsko celično steno. Znotraj le-te je dvoslojna celična membrana, sestavljena pretežno iz fosfolipidov ki obdaja citoplazmo z organeli. Rezervne snovi so glikogen, maščobe in še nekatere druge spojine (manitol), nikoli škrob. Edinstvena sestavina membrane pri glivah je ergosterol in zimosterol. Ker omenjenih sterolov v celični membrani sesalcev ne najdemo, to lastnost izkoriščamo pri zdravljenju glivičnih okužb z antimikotiki, npr. alilamini (terbinafin), azoli (ketokonazol), polienskimi antibiotiki (amfotericin B) ali ehinokandini (micafungin). Njihove celice so brez plastidov in klorofila. Vsaka celica ima vsaj eno jedro, nekatere glive izdelujejo tudi kapsulo, ki ima poleg vezavne vloge tudi virulenčno vlogo, saj onemogoča gostiteljevemu imunskemu sistemu, da bi glivo prepoznal ter jo fagocitiral. Se ne gibljejo, razmnožujejo se s pomočjo spor. Razraščajo se v obliki cilindričnih celic oz. hif. Preplet le-teh

imenujemo micelij. Del, ki se vrašča v hranilno podlago imenujemo vegetativni micelij, del ki raste nad hranilno podlago pa imenujemo reproduktivni ali zračni micelij. Na njem se razvijejo sporangije - posebne strukture za razmnoževanje s sporami, ki so morfološko tako vrstno specifične, da v določenih primerih zadoščajo za identifikacijo. Spore zagotavljajo preživetje v neugodnih razmerah ter razširitev na novo področje, da gliva pridobi nova hranila. Sporulacija je zapleten proces z mnogimi oblikami. Ob izobilju hranil in primernih fizikalno kemičnih dejavnikov (temperatura, vlažnost in čistost zraka, vsebnost CO<sub>2</sub>, pH medija, svetloba, treslaji) glive pospešeno vegetativno rastejo. Po obliki rasti delimo glive na kvasovke, plesni in dimorfne glive.

Kvasovke so enocelične glive, ki se razmnožujejo z brstenjem ali pa tvorijo psevdohife, ki so skupki prostorsko nerazdeljenih enoceličnih organizmov z ločenimi citoplazmami. Vlknate glive ali plesni so večcelični organizmi, tvorijo hife, micelij je pogosto puhastega videza. Dimorfne glive glede na okoljske pogoje rastejo kot plesni ali kvasovke. Mnogo gliv ima razvit spolni in nespolni način razmnoževanja. Te imenujemo *Fungi perfecti*, nadalje ločimo tri debla: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*. Pretežno nespolno razmnoževanje je značilno za mitosporne glive oz. *Fungi imperfecti*, katerih nespolne spore imenujemo konidiji, ki nastajajo kot mitosporne vedno eksogeno, le izjemoma prevzamejo vlogo spolnega razmnoževanja, ko delujejo kot prenašalci moško potentih jeder (gamet) [1].

V rastlinski sistem jih uvrščamo zaradi tradicije, nedvomno pa gre za zelo samostojno skupino, ki jo – kot glive – prav lahko uvrščamo enakovredno rastlinam in živalim [1]. Kljub temu, da večina izmed 1,5 milijona poznanih gliv spada v kraljestvo gliv, uvrščamo nekatere tudi v kraljestvi stramenopil (*Chromista*) in praživali (*Protozoa*).

## 1.2 Endofiti

Izraz endofit je kot prvi uporabil De Bary in se je uporabljal za “vse organizme, ki se pojavljajo v rastlinskih tkivih.” [2]. V literaturi najdemo različne, a kljub temu sorodne definicije, ki jih na široko povzemata Carroll in Petrini: “Endofiti so mikroorganizmi, ki naseljujejo živa, notranja tkiva rastlin, ne da bi pri tem povzročali

kakršnekoli vidne poškodbe gostitelja.“ [3], [4]

Obširne mikološke raziskave o endofitih in njihovi vlogi, pridobljenih iz listavcev kot tudi iglavcev segajo že v 70. in 80. leta prejšnjega stoletja, ko sta bila izredno aktivna ravno Carroll [3] in Petrini [4] ali pa kar oba skupaj [5], [6].

### 1.3 Sekundarni metaboliti - protimikrobne učinkovine iz endofitskih gliv

Številni avtorji so že raziskovali in preučevali endofite kot morebiten vir novih učinkovin [7], [8]. Dreyfuss in Chapela sta predpostavljala, da so ravno endofitske glive glavni vir novih, uporabnih metabolitov [9]. Schulz in sodelavci so izolirali okoli 6500 endofitskih gliv in preizkusili njihovo biološko učinkovitost. Analizirali so 135 sekundarnih metabolitov in za 69 izmed teh ugotovili, da predstavljajo nove biološko aktivne spojine [10], [11]. Sekundarni metaboliti so spojine z nizko molekulsko maso in niso potrebne za rast in razvoj v čisti kulturi, a sodelujejo pri vrsti metabolnih interakcij med glivo in njenim gostiteljem - pri signaliziranju, obrambi in uravnavanju sožitja [12]. Farmacevtsko zanimivi so zaradi zaščitnega učinka na rastline v katerih se nahajajo - saj jih varujejo pred rastlinojedi, škodljivci in ostalimi patogenimi mikroorganizmi. Izbor izoliranih učinkovin je pester, kemijsko so raznolika skupina, razdelimo jih na  $\beta$ -laktamske antibiotike (cefalosporin, penicilin), ciklične oligopeptide (ciklosporin), indolne alkaloidne (psilocibin, ergotamin) in preostale rastlinske regulatorje rasti (citokinin, avksin) [13].

Ena od prelomnic je bilo odkritje endofitske glive *Taxomyces andreanae* iz lubja pacifiške tise leta 1993, ki izdeluje protitumorno učinkovino paklitaksel. [14]. Paklitaksel (generično ime Taksol) je protitumorska učinkovina, delujoča še posebej proti karcinomu jajčnikov in dojk. Danes najpogosteje uporabljena metoda je polsinteza iz predhodnikov paklitaksela - natančneje 10-deacetil bakatina III (10-DAB), ki se nahaja tudi v iglicah ostalih tis (npr. evropske). V preteklosti so za ekstrakcijo 1 g paklitaksela iz lubja pacifiške tise (*Taxus brevifolia*) potrebovali 27 kg lubja [11]. Kljub temu, da je totalna sinteza poznana (40 korakov, 2% izkoristek) ni ekonomsko, ne ekološko sprejemljiva.

Ker tropski deževni gozdovi predstavljajo zajeten del svetovne biotske raznolikosti ni presenetljivo, da so iz kostariških listavcev izolirali neznano endofitsko glivo, katere sekundarni metaboliti so izkazali protimikrobno učinkovitost proti več patogenom. Določili so tudi strukturo petnajstim strukturno različnim diterpenom, imenovanim guanacastepeni A-O, in sicer po območju odkritja - Guanacaste na pacifiški obali Kostarike [15]. Guanacastepen A je učinkovit proti grampozitivnim bakterijam MRSA (proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*) in VRE *faecium* [16], medtem ko je guanacastepen I izkazal učinkovitost proti *S. aureus* [17].

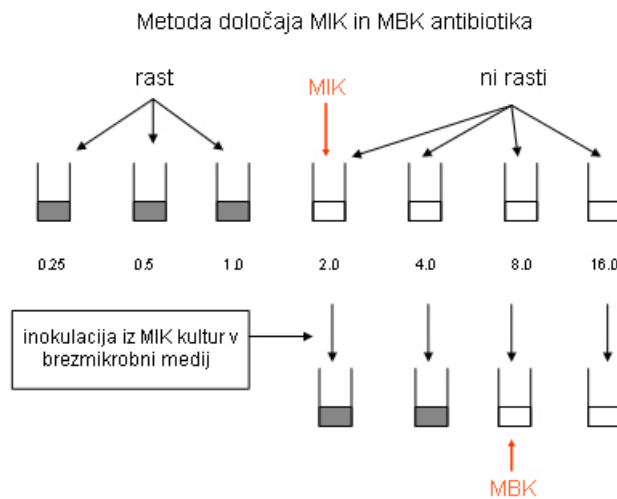
Veliko biološko aktivnih spojin, vključno z antimikotiki, so izolirali iz različnih gliv rodu *Xylaria*. Sordaricin in multiplolid A in B delujejo proti glivi *Candida albicans*. Griseofulvin, spirobenzofuranski protiglivični antibiotik pa deluje proti živalskim in humanim mikoizam [18]. Protimikrobno učinkovitost gliv in endofitov so v preteklosti na Fakulteti za farmacijo že raziskovali [19], [20], [21].

### 1.3.1 Preizkušanje protimikrobnih učinkovin in vitro

Postopek določanja občutljivosti za, ali odpornost mikroorganizmov proti protimikrobnim učinkovinam, imenujemo antibiogram (kadar je mikroorganizem bakterija). Antibiogram delamo vedno, kadar izoliramo klinično pomembno bakterijo iz različnih kliničnih vzorcev, z namenom ustreznega zdravljenja bolnikov [22]. Poznamo različne načine določanja občutljivosti mikroorganizmov za protimikrobne učinkovine. Da bi bili rezultati med posameznimi laboratoriji primerljivi, je potrebno, da postopke izvedemo po določenih mednarodno priznanih standardih, po katerih izvajamo teste tudi v Sloveniji. Za to skrbi Nacionalni odbor za klinično-laboratorijske standarde (NCCLS). NCCLS predpiše, kako izvajati teste in pripravi mednarodne smernice za tolmačenje rezultatov pri posameznih vrstah bakterij [22]. Različni bakterijski sevi so različno občutljivi na protimikrobne učinkovine, zato so podatki, ki jih dobimo pri preizkušanju protimikrobnih učinkovin in vitro zelo pomembni tako pri zdravljenju kot pri iskanju novih, še učinkovitejših protimikrobnih učinkovin. Občutljivost najpogosteje preizkušamo z uporabo disk difuzijskega testa (E-test), agar dilucijskega testa in bujon dilucijskega testa [19].

Disk difuzijski test se uporablja za kvalitativno ali semikvantitativno oceno ob-

čutljivosti določenega bakterijskega seva na protimikrobne učinkovine [19]. To je preprosta, hitra in poceni metoda za določanje občutljivosti na antibiotike. Uporablja se pri hitro rastočih bakterijah [22]. Pri tem testu merimo premer inhibicijskega območja okoli diska, prepojenega z raztopino učinkovine po inkubaciji na agarju, ki je premazan s suspenzijo izbranega bakterijskega seva [19]. Inhibicijsko območje nastane kot posledica difundiranja antibiotika iz diska v gojišče. Antibiotik zavre razmnoževanje nanj občutljivih bakterij [22]. E-test je ravno tako difuzijski test, vendar omogoča približno določitev MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) [23]. Kvantitativno vrednotimo občutljivost z uporabo agar dilucijskega ali bujon dilucijskega testa. Pri obeh metodah pripravimo serijo redčitev protimikrobne učinkovine v agarju oz. bujonu in po inkubaciji opazujemo bakterijske kolonije na agarju oz. zamotnitev tekočega gojišča zaradi rasti bakterij. Najnižja koncentracija učinkovine v agarju ali bujonu, ki onemogoči rast bakterij, je MIK. Najnižja koncentracija antibiotika, ki povzroči uničenje bakterij pa je minimalna baktericidna koncentracija (MBK). Shematsko je metoda predstavljena na sliki 1. Bujon dilucijsko metodo lahko tudi avtomatiziramo in motnost gojišča določamo denzitometrično [19].



Slika 1: Metoda določanja MIK in MBK.

Prednost bujon dilucijskega testa je možnost izvedbe tudi v majhnem merilu s prostornino inkubacijske zmesi okoli 100  $\mu\text{L}$ . Test se imenuje tudi mikrodilucijski test in je standardna referenčna metoda za preizkušanje občutljivosti aerobnih bakterij na protimikrobne učinkovine. Metoda omogoča kvantitativno opredelitev *in vitro* učinkovitosti spojine na izbranem bakterijskem sevu. Metodo uporabljamo kot robustno orodje za odkrivanje novih protimikrobnih učinkovin, saj se lahko enostavno prilagodi za preizkušanje učinkovitosti izvlečkov.

## 1.4 Taksonomsko določanje gliv

### 1.4.1 Morfološko

Tradicionalno je določanje vrste na osnovi morfoloških lastnosti iz čistih kultur. Opazovanje oblike, velikosti, roba, presevnosti, višine ter površine kolonije in barve sporangijev s prostim očesom in pod svetlobnim mikroskopom je bila v preteklosti edina možnost. Vendar le morfološke lastnosti velikokrat ne zadoščajo za natančno določitev. Potrebno je preučiti tudi fiziološke in biokemijske tehnike, kar vključuje razvoj gliv na standardnih medijih, določitev optimalnih rastnih pogojev, raziskave mehanizmov sporulacije in določitev spolnega razmnoževanja in konidiogeneze po standardnih postopkih, opisanih v mikoloških priročnikih [24]. Ima pa tovrstno določanje določene slabosti - med drugim je časovno potratno, naporno ter zahteva poglobljeno znanje klasične taksonomije. Veliko vrst je težko, nekatere pa nemogoče gojiti v *in vitro* pogojih [25]. Zato se je število novoodkritih vrst bliskovito povečalo, ko so razvili in izpopolnili naprednejše molekularne metode, ki prav tako omogočajo taksonomsko klasifikacijo.

### 1.4.2 Genetsko

Zanesljivejša, hitrejša in relativno poceni pot določanja vrste je genetska (molekularna). Prednosti pomnoževanja in določanja nukleotidnega zaporedja pred določanjem na osnovi morfoloških značilnosti so večja natančnost, občutljivost, robustnost, specifičnost (večje razlikovanje med tesno sorodnimi organizmi), hitrejša izvedba, možnost identifikacije vrst, ki ne uspevajo v kulturah *in vitro* [26], [27]. Pomembna

prednost je tudi tolmačenje rezultatov, saj zanj ni potrebno poglobljeno poznavanje taksonomije. Medtem ko je standard pri živalih regija COI (mitohondrijska Citokrom c oksidazna I podenota gena), pri rastlinah gena za *rbcL* (Ribuloza-bisfosfat karboksilaza) in *matK* (Maturaza K) uporabljamo pri glivah notranji prepisani vmesnik ribosomske DNA - ITS regijo (Internal Transcribed Spacer) [28]. 18S mala jedrna ribosomska podenota rRNA gena (SSU) se pogosto uporablja v filogenetiki, predvsem njen homolog (16S) kot vrstno specifični določevalec za bakterije [29]. Splošno vodilo je, da so za taksonomsko analizo primerni vsi odseki DNA, ki imajo dovolj različno nukleotidno zaporedje, da je mogoče razlikovanje med posameznimi vrstami. Obenem pa je zaželeno, da je začetek in konec regije čim bolj konzervativen. Le-ta lastnost omogoča pomnoževanje večih vrst z istimi oligonukleotidnimi začetniki, kar je ekonomično.

## 1.5 Primerni regiji jedrne ribosomske DNA za vrstno določanje gliv - regiji ITS in IGS

Najpogostejše uporabljena regija v kraljestvu gliv je ITS regija genov, ki kodirajo rRNA. Od leta 2012 je ITS regija tudi uradno priznana regija kot standard za določanje gliv [30]. rDNA regija je sestavljena iz več kopij (do 200 kopij na haploidni genom), ki so urejene v tandem. Podenote si sledijo: 18S v mali podenoti, 5,8S in 28S v veliki podenoti. Geni so med seboj ločeni z dvema ITS regijama - ITS1 med 18S in 5,8S ter ITS2 med 5,8S in 28S. Ti notranji vmesni segmenti so visoko variabilni in zato vrstno specifični. Geni za ribosomske podenote pa so nasprotno zelo ohranjeni in so skupni predstavnikom istih taksonomskih rodov ali celo debel. Ob poznavanju njihovega nukleotidnega zaporedja so odlična tarča za načrtovanje in prileganje nukleotidnih začetnikov, s katerimi lahko pomnožimo sosednji ITS regiji. To smo izkoristili pri izbiri začetnikov ITS\_F in ITS\_R, ki sta popolnoma komplementarna končnemu zaporedju 18S podenote (ITS F) in začetnemu zaporedju 28S podenote (ITS R). Vloga ITS regij še ni docela pojasnjena. Možne vloge so predvsem kontrolne - na aktivacijo promotorja pri prepisovanju iz DNA v RNA

vplivajo različni faktorji. Obe ITS regiji naj bi imeli mnoga funkcionalna vezavna mesta, ki te faktorje privlačijo [31]. Na 5' koncu celotnega ponavljajočega se zaporedja DNA je IGS regija (poznana tudi kot NTS regija - non-transcribed spacer). Velikost IGS regije je od 2 kBP (baznih parov) navzgor. Pogosto je regija visoko variabilna in posledično dobro prijemališče za razlikovanje med vrstami- podobno kot ITS regija. Večina nitastih gliv iz debla *Ascomycota* ima eno neprekinjeno IGS regijo (med koncem 28S in začetkom naslednje 18S podenote), dolgo med 2-5 kBP ali več. Pomnoževanje celotne IGS regije terja uporabo nukleotidnih začetnikov, ki prijemljejo na 3' koncu 28S gena (npr. LR12R) in 5' koncu 18S podenote gena rRNA (npr. invSR1R) [32]. Pri praktično vseh predstavnikih debla *Basidiomycota* in mnogih kvasovkah iz debla *Ascomycota* je tudi IGS regija razdeljena na dva dela (IGS1 in IGS2) z enojno kodirajočo regijo gena za 5S rRNA, katere položaj ni konstanten pri različnih vrstah [32]. IGS regija je predstavljala rezervni načrt v primeru neuspešnega pomnoževanja ITS regij.

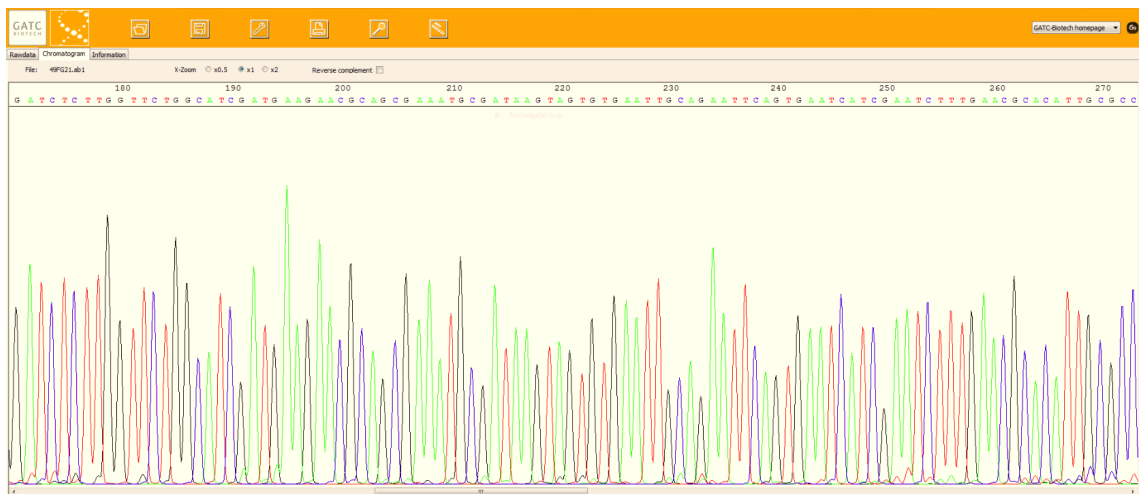
Po pomnoževanju ITS regij z metodo PCR imamo več možnosti, med najpogostejšimi sta restriksijska analiza ali takojšnje določanje nukleotidnega zaporedja ter primerjava z zaporedji v genski knjižnici GenBank s pomočjo NBLAST orodja [33]. ITS regiji najdemo v vseh evkariontih. Veliko število kopij rRNA genov v glivnem genomu omogoča občutljivo PCR pomnoževanje. Na voljo je veliko število ribosomskih nukleotidnih zaporedij v genskih bazah podatkov, kot je npr. GenBank, kjer lahko primerjamo dobljena zaporedja z že objavljenimi.

## 1.6 Določanje nukleotidnega zaporedja

DNA izoliramo iz celic preučevanega organizma ter jo nato pomnožimo s PCR ali jo vstavimo v vektor, kjer jo gostiteljska bakterija pomnoži. DNA denaturiramo, da se verigi ločita in na en konec preučevanega zaporedja matrične verige DNA prilegamo kratek oligonukleotid. DNA polimeraza podaljšuje oligonukleotid tako, da se nukleotidi dodajajo v zaporedju, ki je komplementarno matrični verigi. Občasno se na rastočo DNA verigo naključno pripne dideoksi nukleotid. Ker le-ta nima 3' hidroksilne skupine, ki je pomembna za tvorbo fosfodiesterske vezi med sosednjima nukleotidoma, se naslednji nukleotid ne more prilegati, s čimer je podaljševanje za-



ključeno. Tako dobimo verige vseh dolžin - od zelo kratkih do najdaljših. Vsak izmed štirih različnih dideoksinukleotidov je označen z drugim fluorescentnim barvilom, zato je vsaka končna veriga obarvana glede na končni dideoksinukleotid. Nato ločimo fragmente glede na dolžino z gelsko kapilarno elektroforezo. Posamezne fragmente identificiramo po naraščajoči velikosti, saj je zadrževanje v kapilari odvisno od velikosti in naboja - večji fragmenti se zadržujejo v kapilari dlje kot krajši. Ob izhodu iz kapilare laser presvetli vsako verigo posebej in detektor zazna s fluorescenco emitirano svetlobo. Računalnik nato analitsko obdela podatke, ki mu jih posreduje detektor. Le-ta prevede svetlobni signal (fluorescenco) v enega izmed štirih nukleotidov (A, C, G, T) glede na barvo označenega končnega dideoksinukleotida, ki oddaja svetlobo značilne valovne dolžine (fluorescira). Celotno nukleotidno zaporedje predstavljeno z vrhovi štirih različnih barv (ki vsaka predstavlja enega izmed štirih nukleotidov) imenujemo elektroferogram, prikazan na sliki 2 [34], [35].



Slika 2: Primer elektroferograma.

# Poglavje 2

## Namen dela

Namen našega diplomskega dela bo določitev vrste protibakterijsko učinkovitih sevov endofitskih gliv, pridobljenih iz iglic različnih iglavcev, črnega bezga in glavinca. Izvedli bomo naslednje dejavnosti:

- izbrali vzorce endofitskih gliv iz trajnih kultur, ki so v preteklih raziskavah FFA izkazale protibakterijsko učinkovitost
- iz izbranih trajnih kultur bomo izolirali genomsko DNA (gDNA)
- pripravili bomo sveže trajne kulture in jih primerno shranili za morebiten ponovni odvzem in gojenje
- v primeru, da količina ali čistota izolirane DNA ne bo zadoščala za direktno sekvenciranje, bomo pred sekvenciranjem pomnožili s PCR odsek gDNA, ki predstavljata genski zapis obeh ITS regiji in vmesno 5,8 rRNA regijo DNA s PCRjem in uporabo ustreznih primerjev
- pridobljene fragmente ločili s pomočjo gelske elektroforeze
- ustrezne fragmente dodatno očistili
- določili bomo nukleotidno zaporedje ITS regij z DNA sekvenciranjem (vzorci bomo poslali na analizo v Nemčijo)
- primerjali novo določena zaporedja z že znanimi zaporedji v genski banki (GenBank)
- določili vrsto endofitske glive

# Poglavje 3

## Materiali in metode

### 3.1 Aparature

### 3.2 Reagenti

#### 3.2.1 Pufri in raztopine

50x TAE puffer:

- 242 g Tris baze
- 57,1 mL ledocet
- 18,6 g EDTA
- do skupno 1 L destilirane vode
- 50-krat redčimo; delovna raztopina: 1x TAE puffer

#### 3.2.2 Materiali za izvedbo elektroforeze

6x Loading Dye solution:

- 0,09 % bromtimol modro
- 0,09 % ksilen cianol
- 60 % glicerol
- 60 mM EDTA

Tabela I: Aparature.

aparatura	proizvajalec
PCR-GeneAmp 2700 Thermal cycler	Life Technologies, Carlsbad, ZDA
centrifugirka Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf, Nemčija
stresalnik Vibromix 10	Tehtnica Železniki d.o.o., Slovenija
spektrofotometer NanoDrop 1000	NanoDrop Technologies, ZDA
analizna tehtnica KERN ALS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Nemčija
tehtnica PC 2000 Mettler	Greifensee, Švica
hladilnik, 4°C	Liebherr, Nemčija
avtoklav 2540 EL Systec	Wettenberg, Nemčija
LAF komora PIO LFVP 12	Iskra PIO d.o.o., Slovenija
ultrazvočna kadička SONIS 3	Iskra PIO d.o.o., Slovenija
homogenizator Polytron PT 1600E	Kinematica, Švica
vakuumski rotacijski uparjalnik	Büchi, Švica
rotavapor R-200	Büchi, Švica
zamrzovalnik, -23°C	Gorenje, Slovenija
plinski gorilnik Labogaz 206	Campingaz, Francija
digitalni fotoaparata Camedia C-5050 200MV	Olympus, Japonska
mikrovalovna pečica	LG, Južna Koreja

1,5% agarozni gel:

- 0,75 g agaroze
- 50 mL TAE pufra
- 2,5  $\mu$ L Sybr gold (c= 10 mg/L)

### 3.2.3 Reagenčni kompleti (kiti)

- DNeasy Plant Mini kit (Quiagen, Nemčija)
- Qiaex II Gel extraction kit (Quiagen, Nemčija)

Tabela II: Reagenti.

reagent	proizvajalec
agar	Sigma, Nemčija
agarozna	Sigma, Nemčija
beli vazelin	Lex, Slovenija
bromfenol modro	Fluka GmbH, Švica
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Promega, ZDA
tekoči parafin	Pharmachem, Slovenija
Tris baza	Promega, ZDA
glicerol	Fluka GmbH, Švica
glukoza	Fluka GmbH, Švica
krompirjev izvleček	Fluka GmbH, Švica
natrijev acetat (3 M, pH 5,0)	Applied Biosystems, ZDA
50 BP označevalec velikosti	Fermentas, Litva
1k BP označevalec velikosti	Fermentas, Litva
6 x Loading Dye solution (nanašalni pufer)	Fermentas, Litva
etanol 96%	Sigma, Nemčija
Sybr Gold	Invitrogen, ZDA
PCR mix	Fermentas, Litva
RNAza	Quiagen, Nemčija
destilirana voda	Promega, ZDA
breznukleazna voda	Promega, ZDA
tekoči parafin	Pharmachem, Slovenija

### 3.2.4 Začetni oligonukleotidi za PCR

Ime: ITS\_F

Zaporedje: 5'-AGAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG-3'

Proizvajalec: Eurofins MWG Operon, Nemčija

Ime: ITS\_R

Zaporedje: 5'-TTTTCCTCCGCTCATTGATATGCTT-3'

Proizvajalec: Eurofins MWG Operon, Nemčija

Ime: ITS-g\_F = ITS1

Zaporedje: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

Proizvajalec: Eurofins MWG Operon, Nemčija

Ime: ITS-g\_R = ITS4

Zaporedje: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Proizvajalec: Eurofins MWG Operon, Nemčija

### 3.3 Laboratorijski pribor in material

- Laboratorijska steklovina (erlenmajerice, čaše, menzure, pipete, epruvete, petrijevke, ...)
- Laboratorijske rokavice
- Membranski filtri Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ), Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts
- Nastavki za pipete, Eppendorf, Habmurg, Nemčija
- Mikrocentrifugirke, Eppendorf, Habmurg, Nemčija
- Mikropestile Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Objektna in krovna stekelca, Tlos, Zagreb, Hrvaška
- Pincete, skalpeli, laboratorijske zanke (eze)
- Plastične petrijevke
- Polavtomatske pipete Eppendorf, Hamburg, Nemčija (0,5 - 10  $\mu\text{L}$ , 2 - 20  $\mu\text{L}$ , 10 - 100  $\mu\text{L}$ , 100 - 1000  $\mu\text{L}$ )

### 3.4 Gojišče

Za gojenje smo uporabili trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA). Receptura v tabeli III.

Trdno gojišče (PDA) smo pripravili po naslednjem postopku: 15,6 g suhe zmesi gojišča z glukozo, agarjem in krompirjevim izvlečkom smo suspendirali v 400 mL destilirane vode in sterilizirali 20 minut pri 121°C ter nadtlaku vodne pare 1 bar. Raztopino smo po sterilizaciji ohladili na 80°C in jo v LAF komori razporedili po

Tabela III: Trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA).

suha mešanica 39 g	sestava suhe mešanice(g):
prečiščena voda do 1000 g	krompirjev izvleček 4,0
	glukoza 20,0
	agar 15,0

približno 20 mL v 20 sterilnih petrijevk s premerom 90 mm. Ko se je po približno 0,5 ure gojišče v zaprtih petrijevkah strdilo, smo petrijevke ovili s parafilmom. PDA plošče smo za 1 teden postavili v karanteno - tj. zastekleno omaro za gojenje gliv, v kateri so 1 cm visoki kovinski valji premera 5 cm (kamor postavimo gojišče), ki so na stiku s podlago premazani z belim vazelinom. Le-ta služi kot zaščita pred pršicami. V omaro smo postavili smo še dve stekleni čaši s po 300 mL destilirane vode za vzdrževanje vlažnosti v karanteni.

## 3.5 Biološki material

### 3.5.1 Glive

Vzorci endofitskih gliv smo dobili iz čistih kultur Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Podatke o vzorčenju rastlinskih delov gostiteljskih rastlin posameznih endofitskih gliv podaja Tabela IV.

## 3.6 Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA (gDNA) temelji na predpripravi vzorca (zamrzovanje, mletje, liofilizacija), razbitju celic (organska topila, alkalije, encimsko, mehansko), selektivnem obarjanju gDNA s kationskim detergentom CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid), odstranjevanju nečistoč ter ponovnem raztapljanju v vodnem mediju.

V našem primeru smo najprej s sterilizirano spatulo v LAF komori prenesli delček micelija iz trajne kulture v plastično 1,5 mL epruveto. Nato smo mehansko homo-

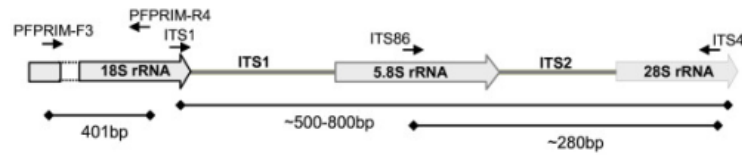
Tabela IV: Rastlinski deli gostiteljskih rastlin posameznih endofitskih gliv [20], [21].

avtor	številka vzorca	gostiteljska rastlina in njen del	družina	datum nabiranja
Žerjal, A.	2	Sambucus nigra črni bezeg, list	Sambucaceae - bezgovke	26.4.2007
Žerjal, A.	24B	Centaurea sp. - vrsta glavinca, steblo	Asteraceae - nebinovke	9.5.2007
Žerjal, A.	33	Pinus nigra Arnold - črni bor, iglice	Pinaceae - borovke	9.5.2007
Žerjal, A.	35C	Pinus nigra Arnold - črni bor, iglice	Pinaceae - borovke	9.5.2007
Zajc, S.	38	Pinus sylvestris - rdeči bor, kultivar Watereri, iglice	Pinaceae - borovke	30.6.2010

genizirali vzorec s pestilom v terilnici, dodali malo tekočega dušika za lažje razbitje celične stene ter za konec uporabili še homogenizator Polytron PT 1600E pri 350 Hz eno minuto. Ko smo potrdili, da je vzorec homogeniziran (ni bilo vidnih delčkov micelija), smo dodali ekstrakcijski pufer in nadaljevali postopek z DNeasy Plant Mini kitom po navodilih proizvajalca [36]. Za dodatno čiščenje gDNA smo uporabili Qiaex II Gel extraction kit ali postopek preobarjanja z etanolom in NaOAc, ki je podrobneje opisan v poglavju Čiščenje genomske DNA s preobarjanjem (3.7). Čistost smo preverjali s spektrofotometrom NanoDrop 1000. Metoda je zanesljiva, hitra in natančna v širokem razponu koncentracij (2-3700 ng/ $\mu$ L), ne potrebujemo kivet ali kapilar in kar je bilo v našem primeru ključnega pomena - za meritev smo porabili le 1  $\mu$ L vzorca. Uspešnost izolacije smo nadalje preverjali z gelsko elektroforezo, s katero smo uspešno ločili različne fragmente glivne DNA. Dobljene fragmente smo očistili s pomočjo Qiaex II Gel extraction kita po navodilih proizvajalca [37].



V okviru molekularno genetskih analiz smo analizirali del nukleotidnega zaporedja ITS1 - 5,8S rDNA - ITS2. (slika 3).



Slika 3: Lokacija naleganja oligonukleotidnih začetnikov ITS1 in ITS4 na genih jedrne rDNA [38].

### 3.6.1 Izolacija po navodilu proizvajalca z DNeasy Plant Mini kitom

- v epruvetko smo natehtali 100 mg zmletega vzorca (trdo gojišče, preraslo z glivo oziroma svež micelij) in odpipetirali 200  $\mu\text{L}$  prečiščene vode;
- v epruvetko smo dodali 400  $\mu\text{L}$  pufra AP1 in 4  $\mu\text{L}$  RNase (100 mg/mL);
- mešanico smo inkubirali 10 minut na 65°C in vmes 2-3 krat premešali z obračanjem epruvetke;
- dodali smo 130  $\mu\text{L}$  pufra AP2, zmešali in 5 minut inkubirali na ledu;
- centrifugirali smo 5 minut pri 10800 rpm (obratov na minuto);
- vzorec smo prenesli na QIAshredder kolono in centrifugirali 2 minuti pri 10800 rpm;
- supernatant smo odpipetirali v novo epruvetko tako, da nismo skalili oborine;
- dodali smo 1,5-kraten volumen pufra AP3/E in vzorec premešali s pipeto;
- 650  $\mu\text{L}$  tako pripravljenega vzorca smo nanесли na DNeasy mini spin kolono in centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm ter zavrgli filtrat;
- prejšnji korak smo ponovili s preostankom vzorca;
- kolono smo prestavili v novo epruvetko, dodali 500  $\mu\text{L}$  AW pufra, centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm, in zavrgli filtrat;
- na kolono smo spet odpipetirali 500  $\mu\text{L}$  AW pufra in centrifugirali 2 minuti pri 10800 rpm;
- kolono smo prestavili v novo epruvetko in nanjo odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  AE pufra, ki je bil predhodno segret na 65°C;

- inkubirali smo 5 minut na sobni temperaturi, nato centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm;

### 3.7 Čiščenje genomske DNA s preobarjanjem

- 70  $\mu\text{L}$  vzorca izolirane genomske DNA smo dodali 7  $\mu\text{L}$  NaOAc (pH=5) in 105  $\mu\text{L}$  96% etanola, ohlajenega na  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
- vzorec smo hladili 1 uro pri  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
- centrifugirali smo 10 minut pri 10800 rpm in zavrgli supernatant;
- po centrifugiranju nastalo peleto smo sprali s 70  $\mu\text{L}$  70% etanola, centrifugirali 10 minut pri 10800 rpm in zavrgli supernatant;
- zadnji korak smo še enkrat ponovili;
- peleto smo resuspendirali v 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode;

### 3.8 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

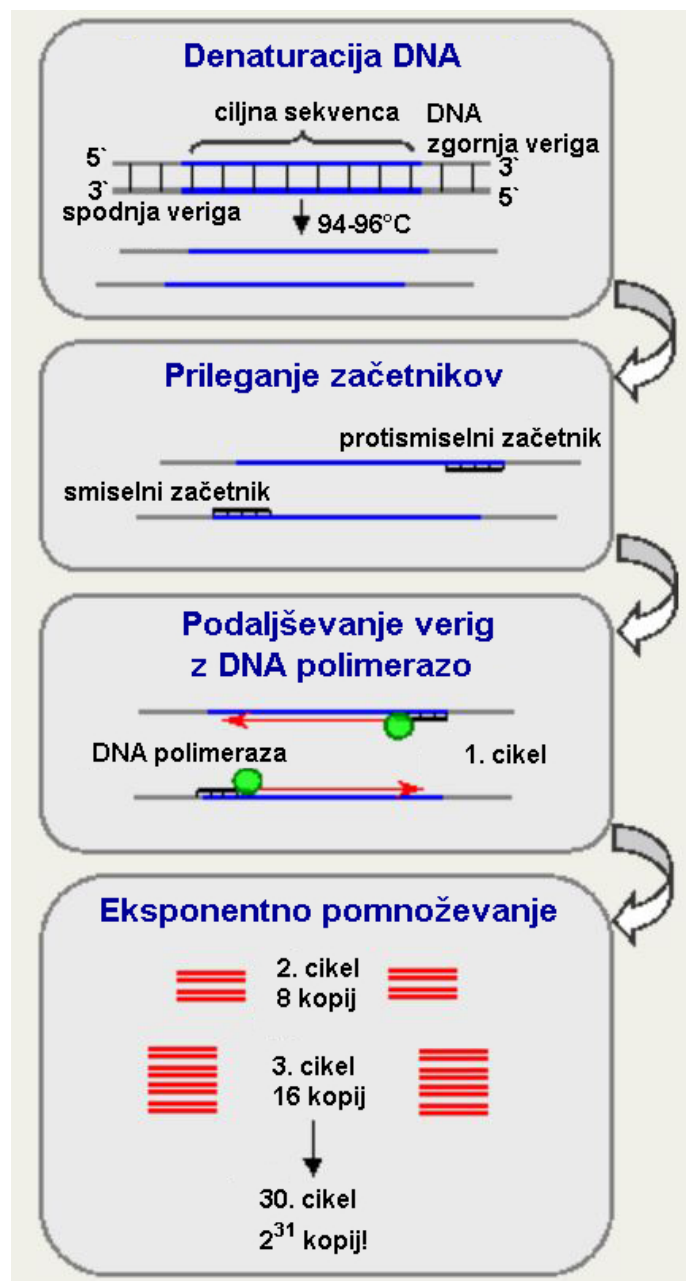
Verižna reakcija s polimerazo se uporablja za pomnoževanje segmentov DNA, shematsko je prikazana na sliki 4. Za uspešno pomnoževanje moramo poznati začetni in končni del nukleotidnega zaporedja izbranega odseka. Na osnovi tega zaporedja načrtujemo oligonukleotidna začetnika, ki sta komplementarna začetnemu in končnemu delu odseka.

Bistvena sestavina reakcije je termostabilna polimeraza, pridobljena iz termofilne eubakterije *Thermus aquaticus*. Obvezno mora reakcijska zmes vsebovati tudi proste nukleotide,  $\text{MgCl}_2$  in ustrezen pufer. Magnezijevi ioni omogočajo aktivnost polimeraze, povečajo sposobnost prileganja oligonukleotidnih začetnikov ter tvorijo topen kompleks s prostimi nukleotidi, kar igra pomembno vlogo pri njihovem vstavljanju v verigo, ki se podaljšuje. Reakcija je termično vodena - vsaka stopnja zahteva ustrezno temperaturo.

V prvem koraku se dvojna vijačnica matrice (vzorca) pod vplivom povišane temperature razklene ( $95^{\circ}\text{C}$ ), nato nanjo naležeta oligonukleotidna začetnika (začetni ali končni pri  $52-56^{\circ}\text{C}$ , odvisno od dolžine oligonukleotidov ter deleža G in C. Daljša

je veriga in višji kot je delež GC, višja je temperatura tališča in s tem posledično T naleganja). V tretji stopnji se veriga pod vplivom Taq polimeraze podvojuje (72°C). Tak cikel se ponovi 20-40-krat.

Za pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2 smo uporabili univerzalna evkariontska oligonukleotidna začetnika ITS-F in ITS-R ter glivno specifična oligonukleotidna začetnika ITS-g F, ki je v literaturi boljše poznan kot ITS1 in ITS-g R, v literaturi poznan kot ITS4. Smiselni oligonukleotidni zače-



Slika 4: Potek PCR reakcije.

tnik ITS F (zaporedje: 5'-AGAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG-3') nalega na 3' konec 28S rDNA. Protismiselni oligonukleotidni začetnik ITS R (zaporedje: 5'-TTTTTCCTCCGCTCATTGATATGCTT-3') pa nalega na 5' konec 18S rDNA [33]. Enako velja za glivno specifična oligonukleotidna začetnika ITS-g F (ITS1) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' in ITS-g R (ITS4) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

### **Priprava vzorcev za PCR**

Priprava 25  $\mu\text{L}$  mešanice za PCR (1 vzorec):

- PCRmix (100 mM) 12,5  $\mu\text{L}$
  - oligonukleotidni začetnik 1 (10  $\mu\text{M}$ ) 1,0  $\mu\text{L}$
  - oligonukleotidni začetnik 2 (10  $\mu\text{M}$ ) 1,0  $\mu\text{L}$
  - ddH<sub>2</sub>O 9,5  $\mu\text{L}$
  - DNA 1,0  $\mu\text{L}$
- Kot pozitivno kontrolo smo uporabili gDNA afriške vijolice (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)

#### **3.8.1 Program za pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo**

- 95 °C 180 sekund 1 cikel začetna denaturacija DNA
- 95 °C 30 sekund 30 ciklov odvijanje dvojne vijačnice
- 52-56 °C 30 sekund 30 ciklov prileganje oligonukleotidnih začetnikov
- 72 °C 60 sekund 30 ciklov pomnoževanje verige
- 4 °C  $\infty$  1 cikel ohlajanje

## 3.9 Gelska elektroforeza

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na razliki v hitrosti potovanja nabitih delcev na nosilcu v pufru, ki so izpostavljeni električnemu polju [39]. Po zaključeni verižni reakciji s polimerazo smo uspešnost pomnoževanja preverili z gelsko elektroforezo. Za ločevanje in določevanje DNA v naših vzorcih smo uporabili gelsko elektroforezo, kjer vzorci potujejo po agaroznem gelu pod vplivom električnega polja. Hitrost potovanja je odvisna od velikosti delcev oz. fragmentov. Večji delci potujejo hitreje, manjši počasneje. Metodo smo uporabili tako za ugotavljanje prisotnosti nukleinskih kislin (gDNA, PCR produkti) v vzorcih, kot za ocenjevanje velikosti posameznih fragmentov (slika 5).

Za določevanje PCR produktov smo uporabili 1,5% agarozni gel (ut/v).

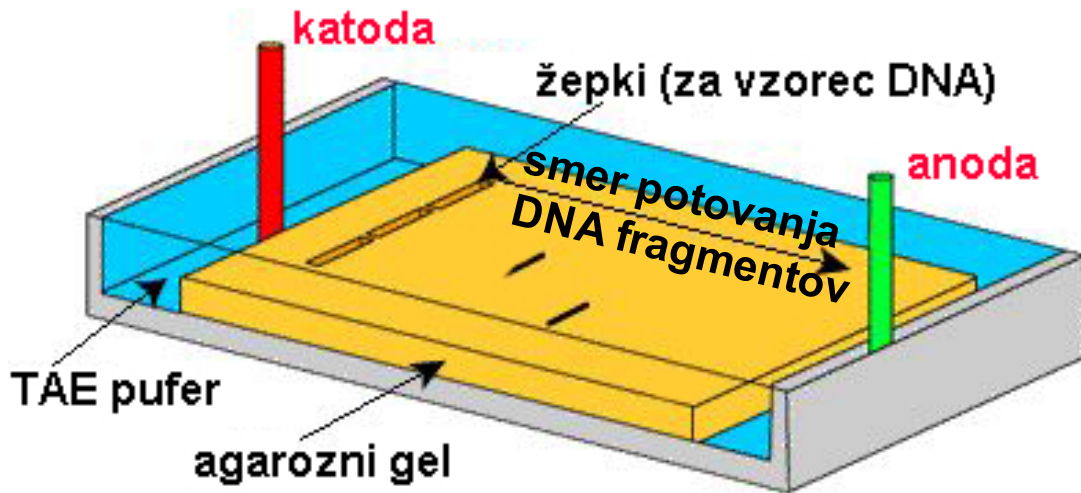
Ne glede na število preiskovanih vzorcev smo pripravljali gele enotne velikosti, s kapaciteto do 10 vzorcev (50 mL gela).

### Priprava agaroznega gela

- Ustrezni natehtani količini agaroze (0,750 g) v erlenmajerici smo dodali 0,5xTAE pufer do končnega volumna 50 mL;
- Segrevali smo v mikrovalovni pečici do vrelišča oziroma dokler se agaroz ni raztopila, vmes smo 2-3 krat premešali vsebino;
- Ko se je gel ohladil na temperaturo vlivanja (približno 50 °C), smo dodali 2,5  $\mu$ L barvila Sybr Gold koncentracije 10 mg/L (v/v koncentracija raztopine v gelu je bila 0,25%, saj smo empirično ugotovili, da omenjena koncentracija fluorescentnega barvila zadošča - kljub temu, da proizvajalec priporoča v/v koncentracijo 0,5%) in gel vlili v kadičko v položaju za vlivanje;
- Ko se je gel ohladil in strdil, smo iz gela odstranili glavničke in ga skupaj z nosilcem prenesli v elektroforezno kadičko. Kadičko smo napolnili z 0,5x pufrom TAE tako, da je bil gel popolnoma prekrit s pufrom [40].

### Priprava vzorcev za gelsko elektroforezo

V 1,5 mL plastični epruveti smo si pripravili vzorce po spodnji recepturi in jih s pipeto prenesli v luknjice na gelu. Luknjici ob robovih smo pustili prazne, v drugo



Slika 5: Shema ločevanja DNA fragmentov z gelsko elektroforezo [34].

luknjico iz leve smo nanegli lestvico (GeneRuler™ 50 BP Plus DNA lestvica), sledila je negativna kontrola in nato vzorci, zadnjo zapolnjeno luknjico je ponovno predstavljala lestvica (GeneRuler™ 1 kBP Plus DNA lestvica).

- V epruvetko smo odpipetirali 2  $\mu\text{L}$  6x nanašalnega pufera in 10  $\mu\text{L}$  vzorca;
- V posebno epruvetko smo odpipetirali 2  $\mu\text{L}$  6x nanašalnega pufera, 9  $\mu\text{L}$  destilirane vode in 1  $\mu\text{L}$  označevalca velikosti. Uporabili smo 1 kBP ter 50 BP označevalec velikosti;
- Vzorce smo premešali in odcentrifugirali;
- Tako pripravljene vzorce smo nanegli v žepke agaroznega gela;

### Pogoji in potek elektroforeze

Elektroforeza je potekala v naslednjih razmerah:

- Električna napetost 100 V
- Električni tok 37 mA
- Električna energija 3,7 W
- Temperatura 55 °C
- Čas reakcije 45 min

### 3.10 Določanje koncentracije gDNA s spektrofotometrom NanoDrop 1000

NanoDrop ND-1000 je spektrofotometer celotnega UV VIS spektra (220-750 nm) s katerim lahko merimo koncentracije v 1-2  $\mu\text{L}$  vzorcih z dobro natančnostjo in ponovljivostjo. Sposoben je meritev visoko koncentriranih vzorcev - 75x bolj koncentriranih od vzorcev, ki jih lahko izmerimo v standardni kiveti.

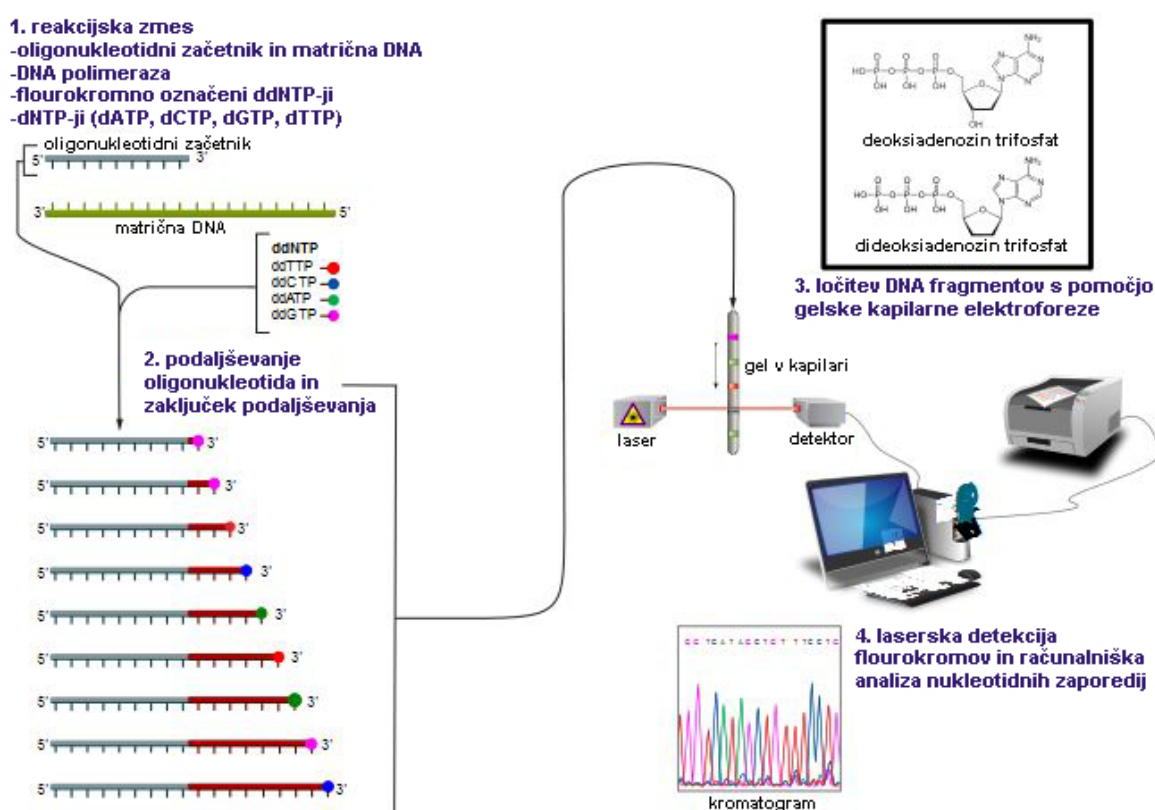
Odpipetirali smo 1 ali 2  $\mu\text{L}$  vzorca na konec optičnega vlakna - tj. sprejemnik (pazimo da kapljica, ki nastane, ne vsebuje mehurčkov zraka). Drug konec optičnega vlakna - tj. vir smo spustili do sprejemnika, kar je povzročilo, da je tekočina tvorila stolpec med vlaknoma. Pulzirajoča ksenonska žarnica je zasvetila in spektrofotometer je analiziral svetlobo, ki je presvetlil vzorec z linearno CCD (charge coupled device) rešetko. Računalnik je bil povezan s programsko opremo, ki nadzira NanoDrop in zbira ter skladišči podatke, ki smo jih nato shranili ali natisnili [42]. Čistost smo preverjali spektrofotometrično. Pozorni smo bili predvsem na razmerje absorbanc pri 260 nm in 280 nm. Razmerje 1,8 velja za čisto pri vzorcih, ki vsebujejo DNA, za čisto RNA je razmerje 2,0. Razlog za nižje vrednosti razmerja pomeni morebitno prisotnost proteinov ali ostalih nečistot, ki močno absorbirajo pri 280nm ali blizu te valovne dolžine.

NanoDrop ND-1000 je namenjen:

- Meritvam koncentracij in čistosti vzorcev nukleinskih kislin vse do 3700 ng/ $\mu\text{L}$  (dsDNA) brez redčitev
- Meritvam vzorcev nukleinskih kislin na mikromrežah, označenih s fluorescentnim barvilom
- Analizi očiščenih proteinov (A280) do 100 mg/mL (BSA)
- Bradford Assay analizi proteinov
- Meritvam celične gostote
- Splošni UV-Vis spektrofotometriji

### 3.11 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje pomnožka je določilo podjetje GATC Biotech (Köln, Nemčija) z DNA sekvenatorjem 3730xl, ki temelji na Sangerjevi (dideoksi) metodi določanja nukleotidnega zaporedja in gelski kapilarni elektroforezi (slika 6) [43]. 7,5  $\mu\text{L}$  očiščenega vzorca (koncentracije okrog 10 ng/ $\mu\text{L}$ ) in 2,5  $\mu\text{L}$  smiselnega oligonukleotidnega začetnika smo odpipetirali v plastično 1,5 mL epruveto, jo opremili s črtno kodo podjetja in jo po pošti poslali v Nemčijo. Po največ dveh dneh so bili rezultati dostopni na spletni strani podjetja.



Slika 6: Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja [43].

Nukleotidna zaporedja pomnožkov smo pregledali z računalniškim programom NCBI BLAST [44] in jih z uporabo spletnega orodja nucleotide basic local alignment search tool (NBLAST) [45], [46] primerjali s tistimi v National Center for Biotechnology [47]. Prikazali smo dolžino uporabljenega zaporedja DNA, vrsto z najvišjim odstotkom podobnosti ter ustrezne E vrednosti (verjetnost, da je ugotovljena stopnja podobnosti slučajna, kjer vrednost  $E=1$  predstavlja naključno podobnost, vrednosti



manjše od ena pa nakazujejo, da so zaporedja morebiti homologna. Manjša, kot je E vrednost, večja je verjetnost, da sta zaporedji homologni) [47].

### 3.12 Priprava trajnih kultur

Glive so na trdnih gojiščih izpostavljene potencialnim okužbam, zato smo se odločili, da jih precepimo na poševno PDA gojišče ter zalijemo s tekočim parafinom. Tako smo dobili stabilne trajne kulture, ki so osnova za nadaljne raziskave v prihodnosti. Poševno gojišče s PDA smo pripravili po naslednjem postopku: 11,7 g suhe zmesi gojišča z agarjem, krompirjevim izvlečkom in glukozo smo suspendirali v 300 mL vode in sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku 1 bar. Rastopino smo po sterilizaciji ohladili na 80°C in jo v sterilni LAF komori razporedili po približno 20 mL v 17 sterilnih epruvet z zamaškom, volumna 50 mL. Pri pripravi trajnih kultur smo uporabili poševno gojišče. Pripravili smo ga tako, da smo predhodno pripravili stojalo, stoječe na pultu pod kotom 30°, ki se ni premikalo. Le tako smo lahko zagotovili uspešno pripravo poševnih gojišč, saj se je tekoči agar v epruvetah strdil pod kotom, ki ga je določalo stojalo. Ker so bile epruvete blizu druga drugi, so se gojišča popolnoma strdila šele po treh urah.

Epruvete smo za 1 teden postavili v karanteno - tj. zastekleno omaro za gojenje gliv, znotraj katere so 1 cm visoki kovinski valji premera 5 cm, ki so na stiku s podlago premazani z belim vazelinom zaradi zaščite pred pršicami. Epruvete smo postavili na valje, v omaro smo dodali še dve posodi s po 300 mL vode za vzdrževanje vlažnosti. Po 1 tednu smo epruvete z gojišči pregledali, da bi ugotovili, ali so gojišča sterilna ali so na gojiščih zrasle morebitne kolonije. Vizuelno smo potrdili sterilnost gojišč. V LAF komori smo na poševna gojišča nacepili micelije gliv. Uporabljali smo sterilno mikrobiološko zanko - ezo. Epruvete smo rahlo zaprli z zamaški in jih postavili v komoro za gojenje gliv na kovinski pladenj, ki je bil na spodnji strani premazan z vazelinom in s posodo s 500 mL vode za vzdrževanje vlažnosti. Kot negativno kontrolo smo pustili dve gojišči prazni. Vse zamaške smo podobno rahlo zatesnili. Ko so glive prerasle površino gojišča, smo jih prelili 10 mm visoko s tekočim parafinom, ki smo ga prej dvakrat zapored sterilizirali - po 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar. Epruvete smo rahlo zaprli z zamaški in jih shranili pri

4-6°C. Obe negativni kontroli tudi po 1 mesecu inkubacije v karanteni nista kazali vidnih znakov okužb.

Po pregledu poševnih gojišč smo opazili, da so nacepljene glive le-ta prerasla v dveh tednih. Glivna gojišča smo prelili s tekočim parafinom, ki smo ga zaradi njegove viskoznosti dvakrat zapored avtoklavirali. S tem smo povečali verjetnost, da je bila sterilizacija uspešna. Parafin smo prelili na prerasla gojišča zato, da bi upočasnil delovanje presnovnih procesov in rast gliv, saj le-ta zmanjša dostopnost kisika. Ker bi prevelika količina tekočega parafina predstavljala nevarnost, da gliva ne bi dobila potrebne količine kisika, smo uporabili poševno gojišče. Tako je bil vsaj del micelija izpostavljen ustreznim pogojem, kar je zagotovilo uspešno preživetje glive. Po drugi strani ima parafin tudi zaščitno vlogo, saj preprečuje izhlapevanje vode iz gojišča in s tem izsušitev. Tudi to bi vodilo v propad glivne kulture. Gojišča z glivami je bilo pomembno shranjevati v hladni sobi pri 4-6°C, saj je pri nizkih temperaturah metabolizem gliv upočasnen. V takih pogojih lahko trajne kulture ostanejo stabilne tudi več deset let, vseeno pa je za zagotovitev živih kultur priporočljivo precepljati glive v intervalih 1-2 let [21].

# Poglavje 4

## Rezultati

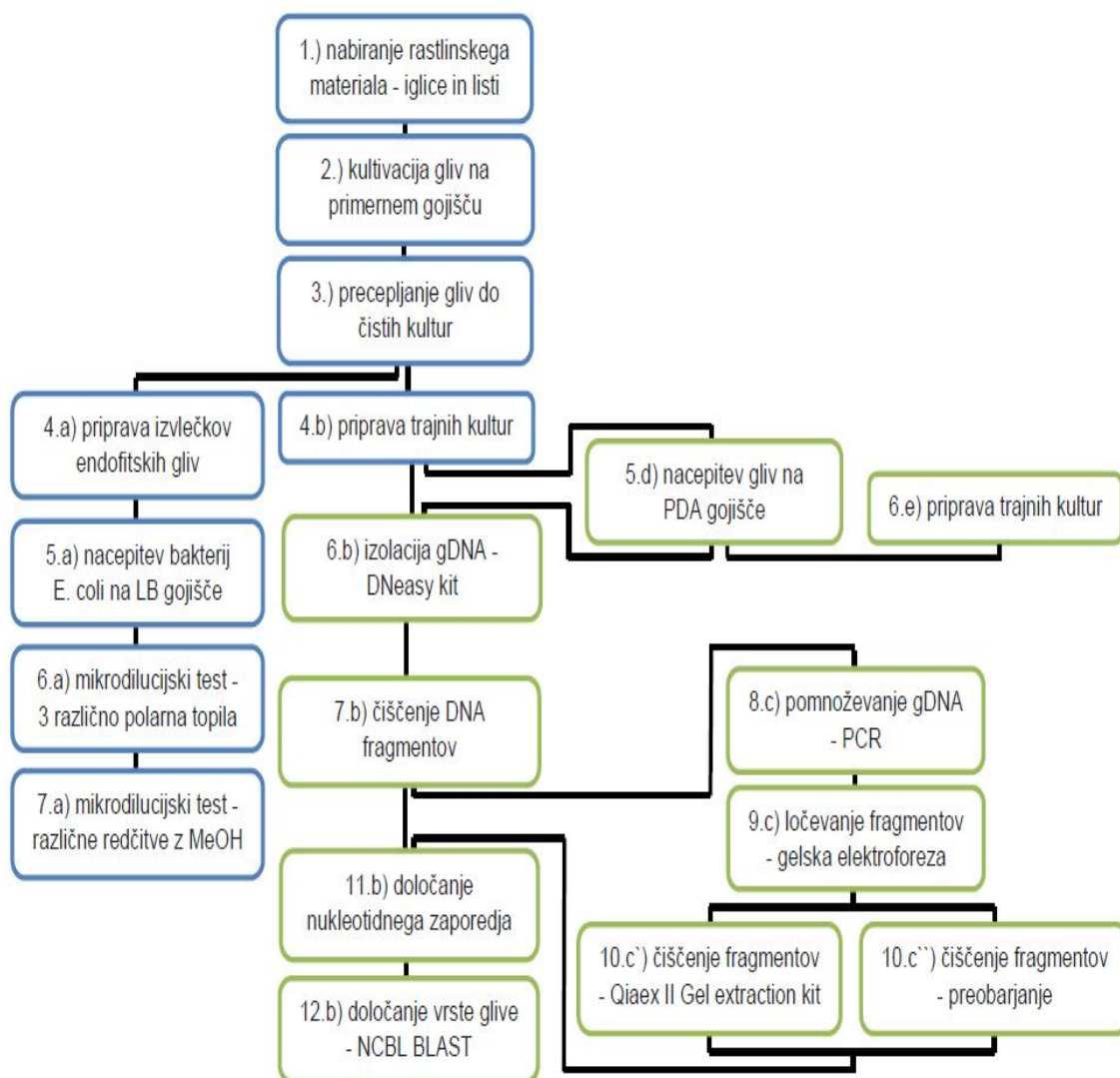
### 4.1 Začetni izbor gliv

Uporabili smo šest protimikrobno najučinkovitejših sevov gliv glede na rezultate dveh predhodnjih diplom na katedri za Farmaceutsko biologijo na Fakulteti za farmacijo [20], [21]. Shema poteka našega in predhodno opravljenega dela se nahaja na strani 28 (slika 7).

### 4.2 Gojenje gliv na trdnem gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA)

Ker so bile izhodne trajne kulture stare vsaj dve leti, smo se odločili, da najprej precepimo glive na sveža gojišča. Medtem ko so glive preraščale nova gojišča smo poizkusili iz starih trajnih kultur izolirati gDNA. V primeru neuspeha smo si pomagali s sveže razmnoženimi glivami.

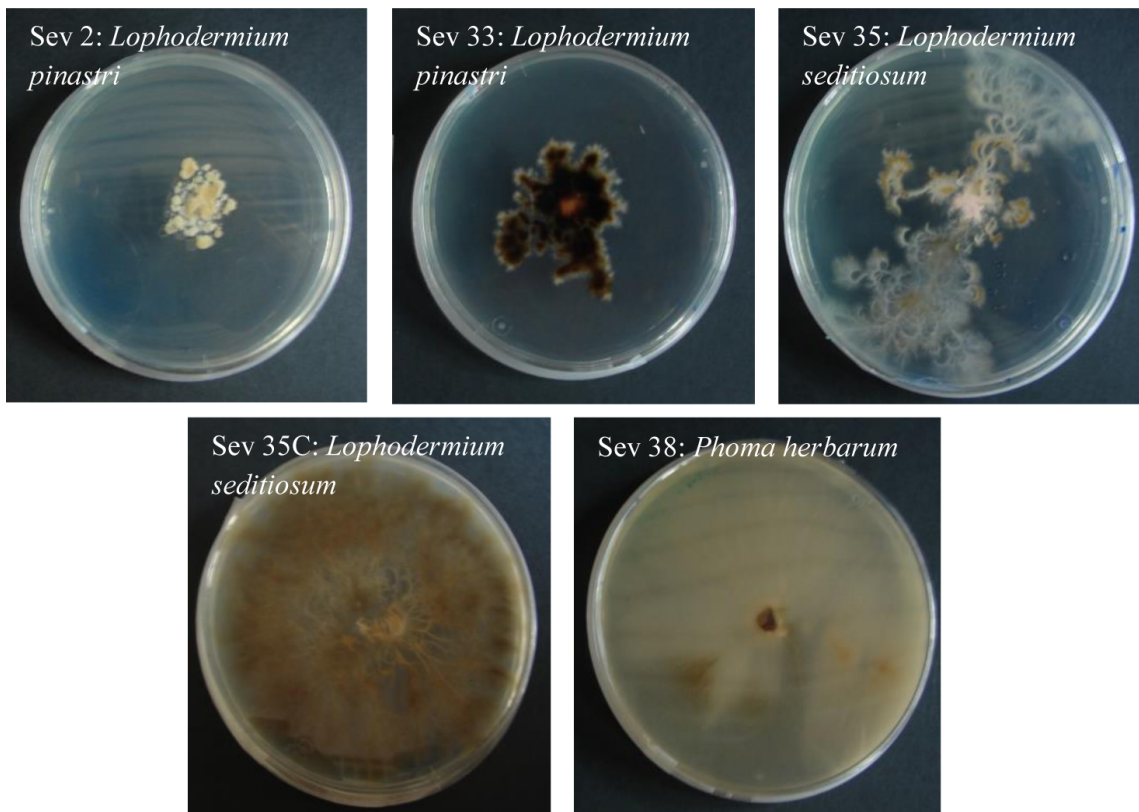
Po 1 tednu smo pripravljene PDA plošče pregledali in se prepričali, če so gojišča sterilna ali pa so na gojiščih zrasle morebitne kolonije oportunističnih bakterij ali drugih mikroorganizmov. Vse plošče so ostale nedotaknjene, zato smo jih prenesli v LAF komoro, ki smo jo predhodno razkužili s 70 % EtOH in jo za 30 minut izpostavili UV svetlobi. Nato smo na sterilne PDA plošče nacepili micelije naslednjih glivnih vzorcev: 2, 24B, 33, 35, 35C, 38. S sterilno plastično zanko smo odrezali košček glive skupaj z gojiščem v velikosti 0,5 cm x 0,5 cm. Za vsak nov vzorec



Slika 7: Shema poteka dela; zeleno obarvana polja predstavljajo naše delo, ostalo je delo predhodnih raziskav v okviru FFA.

smo vzeli na novo sterilizirano zanko, s čimer smo zmanjšali verjetnost navzkrižne kontaminacije. Vsako glivo smo nacepili na 3 PDA plošče. Dve PDA plošči smo pustili prazni za negativno kontrolo. Petrijevke smo ovili s parafilmom in jih postavili v omaro za gojenje gliv pri sobni temperaturi (22-25°C, 65% vlažnost). Po 2 tednih so glive prerastle gojišča vseh vzorcev razen vzorca št. 24B. Nacepljena gliva ni razvila novega micelija. Vzrokov za neuspešno gojenje je lahko več: neživa celična kultura, vzorca iz trajne kulture nismo dobro položili na gojišče, glivam niso ustrezali pogoji okolja, kot so temperatura, vlažnost, osvetlenost in sestava gojišča. Glede na dejstvo, da so bile v preteklosti identične glive gojene v podobnih pogojih,

lahko zadnjo možnost izključimo. Ostale z glivami prerasle petrijevke smo primerjali med seboj na sliki 8. Zanimivo je, da sta vzorca 2 in 33 (*Lophodermium pinastri*) kljub izredno sorodnemu nukleotidnemu zaporedju (98,5% sorodnost) razvila micelij drugačne barve - prvi je bel, drugi pa črn. Tudi oblika je drugačna, zato predpostavljamo, da vzorca 2 in 33 predstavljata različna seva iste vrste, torej *L. pinastri*. Do podobnega sklepa smo prišli ob primerjanju vzorcev 35 in 35C (*Lophodermium seditiosum*). Kljub temu, da sta si vzorca podobnejša (barva, oblika), pa se razlikujeta v gostoti in razraščeni micelija.

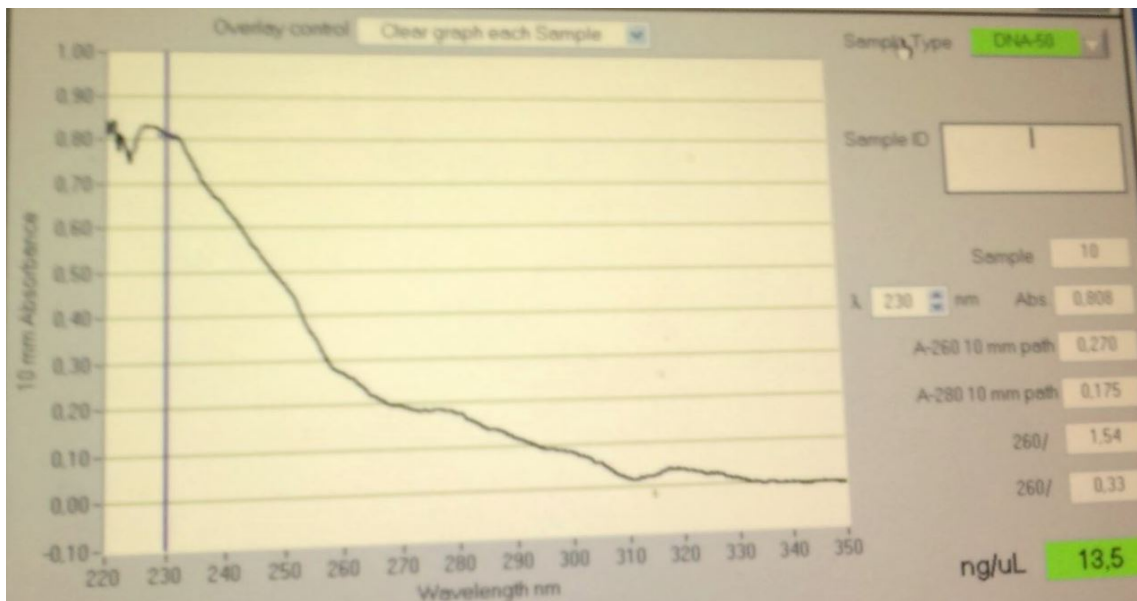


Slika 8: Glivne kulture na gojiščih PDA.

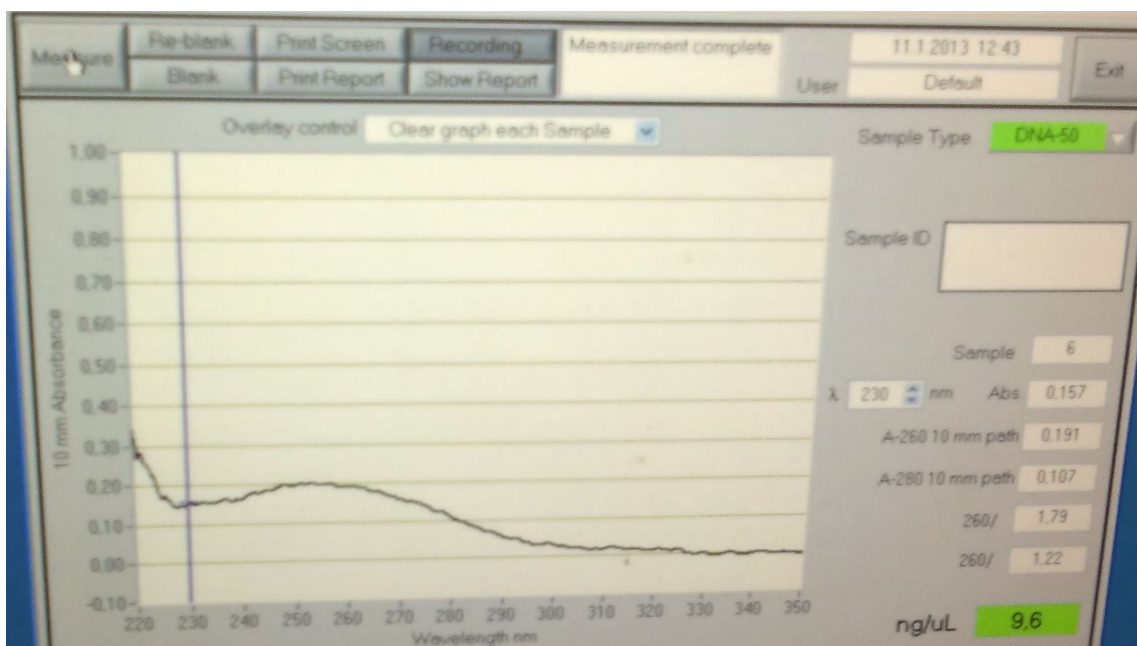
### 4.3 Izolacija gDNA, PCR, agarozna gelska elektroforeza, čiščenje DNA in določanje nukleotidnega zaporedja

Za pomnoževanje ITS regij smo iz posameznih dobro zmletih čistih kultur najprej izolirali gDNA, ki nam je služila kot matrica za PCR reakcijo. Izolacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca z DNeasy Plant Mini kitom, opisanim v poglavju 3.6.1. Ker količina DNA po izolaciji ni zadoščala za direktno sekvenciranje pri nobenem vzorcu, smo se odločili za pomnoževanje s PCR. Glavni izziv je bil izolirati gDNA, ki bi bila dovolj čista, saj je v nasprotnem primeru prihajalo do inhibicije pomnoževanja v naslednjem koraku procesa. Čistost smo preverjali spektrofotometrično. Največ težav s čistoto je bilo pri vzorcih št. 2 (*Lophodermium pinastri*), 24B in 38 (*Phoma herbarum*), kar se je popravilo po dodatnem čiščenju. Prvi pokazatelj čistote je bil maksimum pri 260 nm na grafu absorbance v odvisnosti od valovne dolžine. Če je bil ta pogoj izpolnjen, smo se želeli čimbolj približati idealnemu razmerju med kvocientom absorbanc pri 260 in 280 nm, ki je 1,8. Eksperimentalno smo ugotovili, da razmerje  $1,8 \pm 0,18$  predstavlja še zadosti čisto DNA za uspešno pomnoževanje in nato sekvenciranje ter posledično taksonomsko določanje vrste glive. Vzorce smo redčili z namenom znižanja koncentracije snovi, ki bi motile pomnoževanje. Po izolaciji ter dodatnim čiščenjem -a) s preobarjanjem -b) s Qiaex II Gel Extraction kitom (primeren za čiščenje DNA fragmentov od 40 do 50 kBP iz gelov in raztopin) smo dobili vzorce gDNA, ki smo jih uspešno pomnožili s pomočjo metode PCR. Obe metodi čiščenja sta bili primerljivi in rezultat se je izboljšal za okrog 15 %, kar je razvidno iz slike 9 in 10.

Kot nukleotidna začetnika pri reakciji PCR smo uporabili univerzalna evkariontska oligonukleotidna začetnika ITS-F in ITS-R ter glivno specifična oligonukleotidna začetnika ITS-g F in ITS-g R. Smiselni oligonukleotidni začetnik ITS F nalega na 3' konec 28S rDNA. Protismiselni oligonukleotidni začetnik ITS R pa nalega na 5' konec 18S rDNA. Enako velja za glivno specifična oligonukleotidna začetnika ITS-g F (ITS1) in ITS-g R (ITS4). Ker glivno specifična oligonukleotidna začetnika vsebujeta večji odstotek CG baznih parov kot univerzalna evkariontska primerja - je



Slika 9: Spektrofotometrično določanje čistosti DNA; nečist vzorec št. 33 (*Lophodermium pinastri*) pred čiščenjem.  $A_{260}/A_{280} = 1,54$ .



Slika 10: Spektrofotometrično določanje čistosti DNA; čist vzorec št. 33 (*Lophodermium pinastri*) po čiščenju.  $A_{260}/A_{280} = 1,79$ .

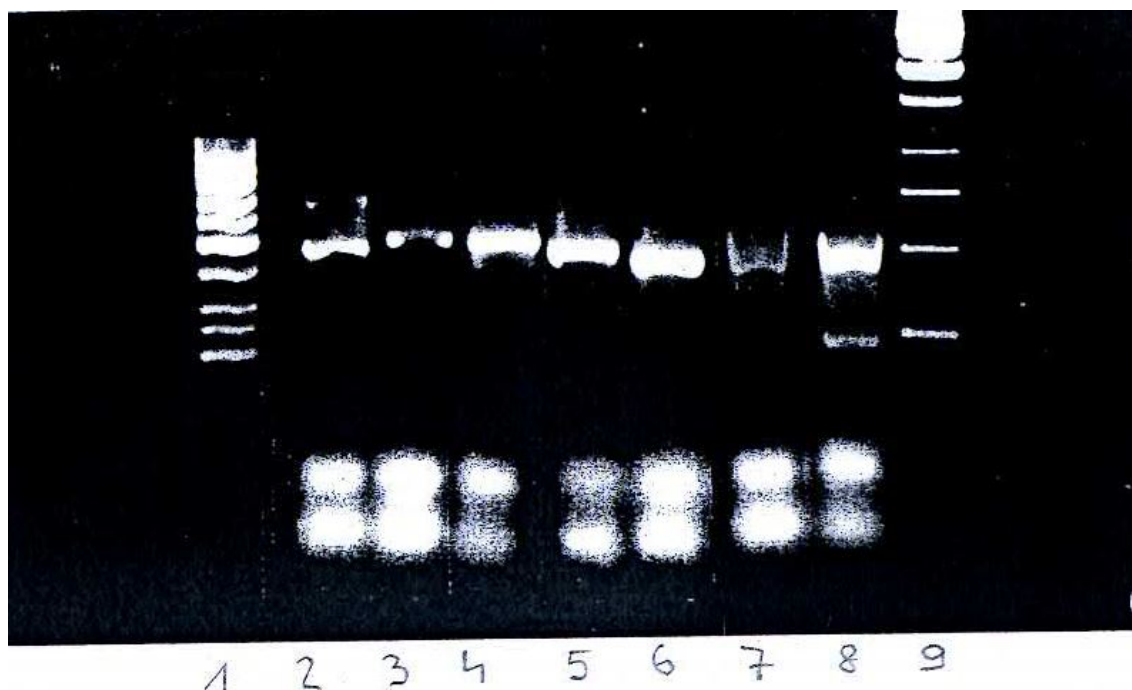
temperatura tališča ( $T_m$  - temperatura, pri kateri je 50% primer-target duplesov hibridiziranih) pri glivnih višja, s tem pa tudi višja temperatura prileganja med reakcijo PCR. Zato smo pri univerzalnih uporabili 52 °C, pri glivno specifičnih pa 56 °C. Omeniti velja, da smo v primeru, ko pomnoževanje ni bilo uspešno z univerzal-

nimi oligonukleotidnimi začetniki (vzorci št. 2, 24B, 38), uporabili glivno specifične, s katerimi smo uspešno pomnožili vse vzorce razen vzorca 24B, ki ga nismo uspeli niti pomnožiti, niti ponovno gojiti na PDA gojišču. Za ločitev različnih fragmentov (slika 11), dobljenih pri PCR, smo uporabili gelsko elektroforezo, in sicer 1,5% agarozni gel. Iz gela smo izrezali vse fragmente, velike okrog 500 BP, saj je to približna velikost pomnoženega odseka ITS-1 in ITS-2 regij, vključujoč 5,8S rRNA. Za čiščenje DNA iz agaroznih kvadrov smo uporabili Qiaex II Gel extraction kit. Kot po vsakem čiščenju do sedaj smo preverili uspešnost le-tega s sprektrofotometrom NanoDrop 1000. Čisti vzorci so bili primerni za direktno določanje nukleotidnega zaporedja. Kot čiste smo obravnavali vse vzorce, pri katerih je bil kvocient med absorbanco pri 260 in 280 nm po zadnjem čiščenju  $1,8 \pm 10\%$ . Poleg čistote je moral vzorec izpolnjevati še predpisan interval koncentracije, ki je znašal 10-50 ng/ $\mu$ L, in ga je predpisal izvajalec sekvenciranja GATC Biotech. Minimalen volumen vzorca za eno sekvenciranje je bil 2,5  $\mu$ L iz česar sledi, da je bila potrebna količina dednine najmanj 25 ng na sekvenciranje. Na analizo nukleotidnega zaporedja smo poslali čist vzorec z enakim smiselnim oligonukleotidnim začetnikom, kot smo ga uporabljali pri PCR reakciji.

## 4.4 Primerjava ujemanj nukleotidnih zaporedij

Dobljena nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki iz genske banke (National Center for Biotechnology Information) in ugotovili 98,5 % (*L. pinastri*), 98,1% (*L. seditiosum*), oziroma 99,6% (*P. herbarum*) ujemanje zaporedij s preostalimi sevi iste vrste, kar nam je izključilo možnost onesnaženja dednega materiala v katerikoli fazi raziskave in potrdilo istovetnost naših vzorcev. Možna kontaminacija dednega materiala predstavlja predvsem problem v primeru, da poleg glivne gDNA izoliramo tudi kakšno drugo DNA, ki je posledica neustreznega shranjevanja ali postopka izolacije. Podatkovno zbirko smo dopolnili s 5 zaporedji ITS regij gliv *P. herbarum* (GenBank; pristopna številka KC608053 - celotno zaporedje) in *L. pinastri* (GenBank; pristopna številka KC608049 - delno zaporedje, KC608050 - celotno) ter *L. seditiosum* (GenBank; pristopna številka KC608052 - delno zaporedje in KC608051 - celotno). Vsa objavljena zaporedja se nahajajo v 7. poglavju - Priloge.





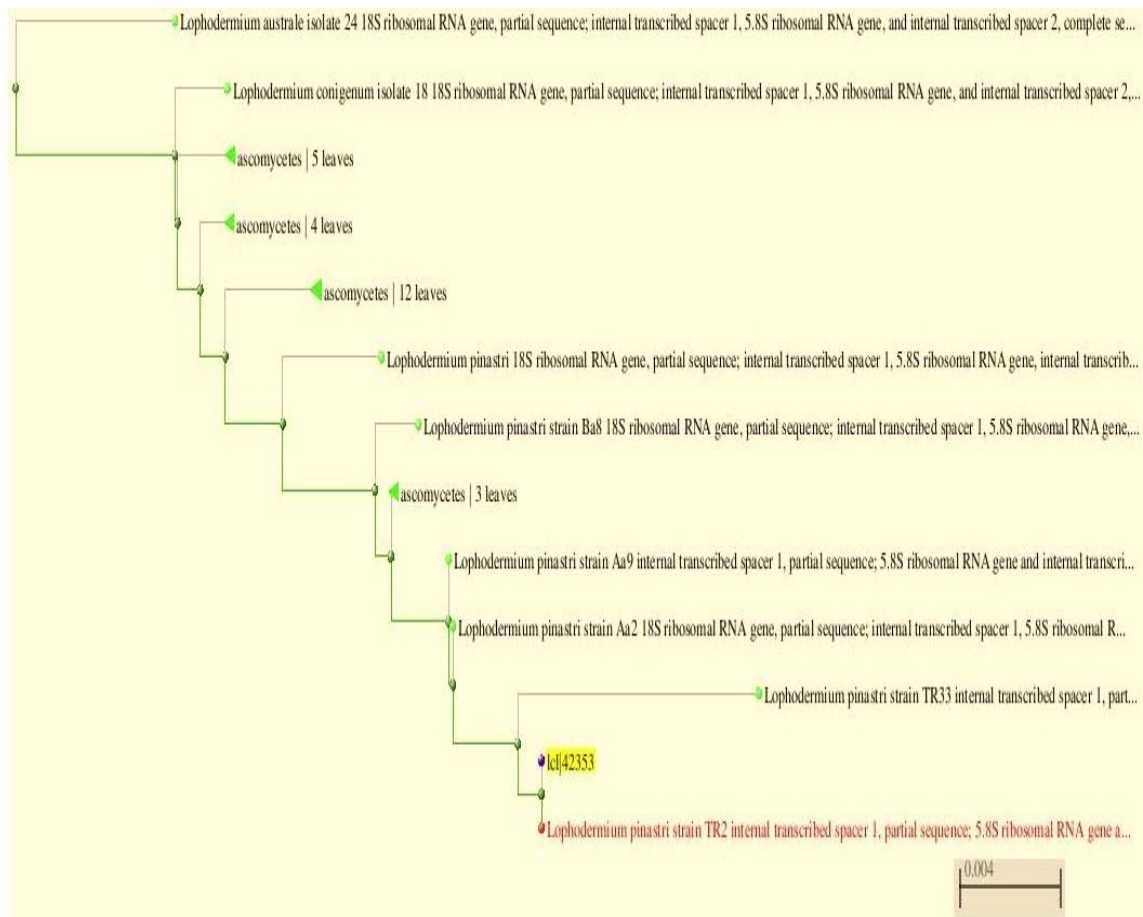
Slika 11: Agarozna elektroforeza PCR produktov - ločitev posameznih fragmentov (1 in 9= označevalec velikosti 50 BP in 1k BP, 2=pozitivna kontrola, afriška vijolica - *Saintpaulia ionantha* H. Wendl., 3 in 4=sev 35 in 35C - *L. seditiosum*, 5=sev 38 - *P. herbarum*, 6 in 7=sev 2 in 33 - *L. pinastri*, 8=*L. pinastri* - zgornja lisa, velika cca. 500 BP, spodnja lisa cca 250 BP, verjetno produkt nespecifičnega pomnoževanja).

Vzorca *Lophodermium pinastri*= TR2 (KC608049) in TR33 (KC608050) imata 98,5% ujemanje zaporedja. Oba seva sta največ 98,5% identična s preostalimi sevi *L. pinastri*, torej se v vsaj 1 BP razlikujeta od sosednjih vrst. Genetsko najsorodnejše vrste so prikazane na genetskem drevesu, ki ga predstavlja slika 12:

- *L. agathidis* 98,3% identičnost s TR2 97,5% s TR33
- *L. conigenum* 98,3% identičnost s TR2, 97,5% s TR33
- *L. australe* 97,7% identičnost s TR2, 96,7% s TR33

Opomba: za vse štiri vrste v bazah obstaja informacija o celotnih ITS regijah.

Primerjava nukleotidnih zaporedij vzorcev št. 2 in 33 prikazuje slika 13.



Slika 12: Genetsko drevo - primerjava sekvenc sevov št 2 in 33 z najsorodnejšimi vrstami.

Vzorca *L. seditiosum* = TR35 (KC608051) in TR35C (KC608052) imata 99,7% uje-manje zaporedja. Oba seva sta največ 98,1% identična s preostalimi sevi *L. seditio-sum*, objavljenimi v genski bazi podatkov GenBank, najbližje ostale vrste so:

- *L. conigenum* 91,2% identičnost s TR35, 91,1% s TR35C, (qc= 98% za TR35 in 97% za TR35C)
- *L. australe* 90,7% identičnost s TR35, 90,5% s TR35C, (qc= 97% za TR35 in 96% ZA TR35C)
- *L. pinastri* 92,2% identičnost s TR35, 92,1% s TR35C, (qc= 98% za TR35 in 97% za TR35C)

*Phoma herbarum* = TR38 (KC608053) je največ 99,6% identična s preostalimi sevi



*P. herbarum*, objavljenimi v genski bazi podatkov GenBank in 100% identična s *P. herbarum* izolatom NF-G.

Genetsko najsorodnejše vrste so:

- *P. macrostoma* 98,2% (qc=100%)
- *Dothiorella gregaria* 98,0% (qc=100%)
- *Didymella hacae* 98,6% (qc=100%)
- *Ascochyta lentis* 98,6% (qc=99%)
- *A. rabiei* 98,2% (qc=100%)

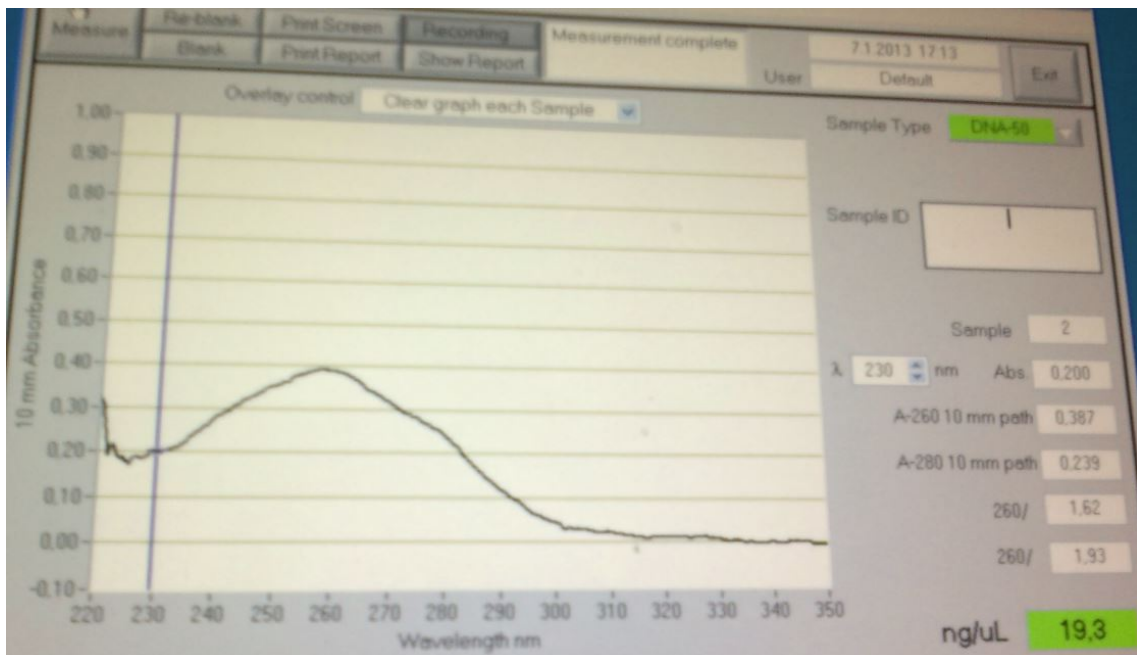
# Poglavje 5

## Razprava

Tradicionalne metode določanja novih vrst gliv (morfološko) v zadnjem času vse bolj dopolnjujejo hitrejša, naprednejša molekularna metoda, ki so osnovane na primerjavi razlik v dednem zapisu vrste. Izbrana pot določanja nukleotidnega zaporedja ITS regij se je izkazala za uspešno. V primeru dvomljivih rezultatov oz. potrebe po dodatni potrditvi natančnosti določanja taksonomske vrste bi lahko uporabili pomnoževanja kakšne druge primerne regije DNA. Najprimernejši nadomestni lokusi so tako IGS regija, geni za RNA polimeraze, geni za različne strukturne proteine (aktin) in velika podenota gena za jedrno rRNA. SSU ni tako primerna, saj ni dovolj vrstno specifična.

Praktično to pomeni, da smo iz petih od šestih vzorcev uspešno izolirali DNA, vendar je bila količina premajhna za direktno sekvenciranje. Zato smo se odločili za pomnoževanje s PCR. Izmed šestih izbranih vzorcev smo uspešno precepili in ponovno gojili na PDA gojiščih pet vzorcev. O razlogu za neuspešno kultiviranje vzorca 24B lahko navajamo zgolj domneve (najverjetnejša možnost je, da gliva ni bila več živa, DNA pa je že začela razpadati). S pomočjo metode RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo) bi lahko ugotovili, ali je gliva v kulturi še živa. Ker mRNA hitro razpada v mrtvih celicah, je detekcija le-te natančen pokazatelj celične sposobnosti preživetja [48]. V vseh primerih razen pri vzorcu 24B je bilo pomnoževanje uspešno že s konvencionalno PCR metodo in ni bilo potrebe po naprednejših izpeljankah. Poznamo jih vsaj ducat, tako je multipleks PCR še posebej primeren ob predpostavki, da imamo v izhodnem materialu več različnih gliv, ki bi jih radi

istočasno pomnožili. Ker je bil uporabljen izhodni material čista kultura z uporabo metode multipleks PCR ne bi veliko pridobili. Sicer je tudi izbira oligonukleotidnih začetnikov in pogojev reakcije zahtevnejša, a ob optimalnih nastavitvah prihranimo veliko časa. V primeru velikega števila vzorcev je najboljša izbira PCR v realnem času. Če bi želeli pospešiti in poenostaviti izolacijo DNA brez zamudnega gojenja glive na gojišču- je smiselna uporaba LAMP (izotermalno pomnoževanje, posredovano z zanko za določanje nukleinskih kislin). Največja prednost pa je nedvomno hitrost in robustnost, ker nečistote ne vplivajo na uspešnost pomnoževanja [50]. To v grobem pomeni, da bi biološki vzorec (iglica, list) lahko testirali kar na terenu s prenosno napravo. Rezultate o prisotnosti endofitov bi dobili v manj kot eni uri. Obe metodi čiščenja fragmentov - tako z uporabo čistilnega kita kot s preobarjanjem - sta bili učinkoviti in sta dali željene rezultate - približati se idealnemu razmerju  $A_{260}/A_{280} = 1,8$ . Ustrezno razmerje je bilo  $1,80 \pm 10\%$ . Slika 14 prikazuje še sprejemljivo čist vzorec št. 38 (*Phoma herbarum*). Čiščenje s preobarjanjem je bilo časovno zamudnejše predvsem zaradi vmesnega enournega hlajenja, čiščenje s kitom pa praktično enostavnejše, saj je kit vseboval vse potrebne reagente in pripomočke, zato se bile tudi predpriprave manj obsežne.



Slika 14: vzorec št. 38, *Phoma herbarum*,  $A_{260}/A_{280} = 1,62$ .

Zanimivo je, da so kar štiri izmed petih preučevanih gliv pripadale istemu rodu in dvema vrstama. Večinoma se vrsti *Lophodermium pinastri* in *Lophodermium seditiosum* prištevata med zajedalske in ne simbiotske. Vendar ju pod določenimi pogoji, predvsem po kriteriju kraja najdbe, uvrščamo med endofite [49]. Preučevani vrsti gliv *L. pinastri* in *L. seditiosum* do sedaj sploh nista bili poznani kot protibakterijsko aktivni. *Phoma spp.* je bila označena kot potencialno protibakterijsko aktivna, vendar za vrsto *P. herbarum* ni nobenih podatkov. Majhne razlike med paroma nukleotidnih zaporedij ITS regij vzorcev *Lophodermium pinastri* (št. 2 in 33) ter *Lophodermium seditiosum* (35 in 35C) so nakazovale na dva para različnih sevov dveh vrst gliv. Da je kaj takega popolnoma mogoče, so v preteklosti že dokazali [6]. O omenjenem odkritju in pred časom preiskovani protimikrobni učinkovitosti preiskovanih ekstraktov endofitov v okviru domače Fakultete za farmacijo, smo napisali tudi izvorni znanstveni članek ter ga poslali v pregled reviji *Current pharmaceutical biotechnology*.

Razlika v 481 BP dolgem nukleotidnem zaporedju med vzorcema št. 2 in 33 je bila 7 BP, od tega sta dva BP predstavljala vrzel, torej nista bila definirana. Različnih BP je bilo tako pet, kar predstavlja 1,0% primerjanega nukleotidnega zaporedja. Najsorodnejši organizmi istega rodu (*L. agathidis*, *L. conigenum*, *L. australe*) so se razlikovali v  $9 \pm 2$  BP, kar predstavlja že 1,9% primerjanega DNA sekvence. Enako velja za vzorca št. 35 in 35C, ki predstavljata različna seva vrste *Lophodermium seditiosum*. Zanimiva je bila podobnost z najbližjimi vrstami iz rodu *Lophodermium*, ki je bila manjša kot pri vzorcih št. 2 in 33. Znašala je med 91 in 92%, kar pri zaporedju, dolgem okrog 700 BP pomeni okrog 60 BP, kar je precejšnja razlika v primerjavi z 10 BP pri sevih št. 2 in 33. Opazovanje glivnih micelijev na PDA gojišču je dodatno potrdilo tezo o različnih sevih iste vrste in ne podvojenem izolatu istega seva. Kot je razvidno iz fotografij gojišč se sevi razlikujejo tako glede samega roba kot tudi po obliki in barvi (slika 8).

Poleg taksonomske definicije preučevanih endofitskih gliv, katerim je bila določena protibakterijska učinkovitost, bi bilo potrebno v prihodnje določiti protimikrobno aktivne ekstrakte do ene (ali več) učinkovin s pomočjo naprednih ločitvenih tehnik. S HPLC bi ločili frakcije, ki bi jih nato testirali na protimikrobno aktivnost. Dobro bi bilo uporabiti različne vrste bakterij. Spojini bi nato določili točno molekulo-

sko maso in strukturo z MS (masna spektrometrija) ali NMR (nuklearna magnetna resonanca). V primeru, da spojina kristalizira, pride v poštev tudi rentgenska kristalografija. Cilj prihodnjih raziskav bi bil dobiti novo spojino vodnico za nadaljne spremembe kemijske strukture, bodisi protimikrobno aktivno spojino, ki bi služila kot končna učinkovina pri zdravljenju infekcij.



# Poglavje 6

## Sklep

Razvoj učinkovitejših antibiotikov in ostalih učinkovin - iz predhodno odkritih sekundarnih metabolitov, ki jih proizvajajo endofitske glive - predstavlja velik potencial. Poleg molekularne določitve dejansko aktivnih učinkovin iz protimikrobno delujočih endofitov, je pomembno vedeti, katera vrsta gliv proizvaja učinkovino. Omenjen izziv je rešljiv v povezavi s sodobnimi molekularnimi metodami, kamor spadajo predvsem različne izvedenke PCR, ki jim sledi določanje nukleotidnega zaporedja in primerjava le-tega z že objavljenimi v bazah podatkov (npr. GenBank). Določanje vrste glive je pomembno bodisi zaradi dopolnitve znanja in določitve taksonomskih odnosov na kompleksnem področju sistematike gliv ali pa zaradi naprednega biotehnološkega pridobivanja novih učinkovin v prihodnosti, ki postaja vse pomembnejše na področju farmacije. Tudi zaradi razvoja novih učinkovin iz endofitskih gliv.

V diplomski nalogi smo uspešno dokazali, da je z določanjem nukleotidnega zaporedja glivnih ITS regij mogoče natančno določiti vrsto endofitske glive. Pomnoževanje ITS regij se je izkazalo kot uspešno za potrebe taksonomske identifikacije preučevanih endofitov, je zanesljiva metoda z nekaterimi omejitvami. Še zanesljivejšo določitev vrste bi lahko dodatno potrdili s pomnoževanjem in sekvenciranjem kakšnega drugega primernege odseka DNA, recimo IGS regije, genov za RNA polimeraze ali genov za različne strukturne proteine, kot je aktin. V prihodnje bi bilo potrebno protimikrobno aktivne ekstrakte preiskovanih endofitov tudi (do)ločiti do ene (ali več) učinkovin(e) s pomočjo primernih ločitvenih tehnik.

Poglavje 7

Priloge

```

LOCUS      KC608053                501 bp    DNA        linear    PLN 26-MAY-2013
DEFINITION Phoma herbarum strain TR38 internal transcribed spacer 1, partial
sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer
2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  KC608053
VERSION    KC608053.1  GI:506484916
KEYWORDS   .
SOURCE     Phoma herbarum
ORGANISM   Phoma herbarum
           Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
           Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae;
           Didymellaceae; mitosporic Didymellaceae; Phoma.
REFERENCE  1 (bases 1 to 501)
AUTHORS    Ravnikar,M., Tercelj,M., Janes,D., Strukelj,B. and Kerft,S.
TITLE      Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifers
           needles
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 501)
AUTHORS    Ravnikar,M. and Tercelj,M.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (12-FEB-2013) Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy,
           Ljubljana University, Askerceva 7, Ljubljana, Ljubljana 1000,
           Slovenia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
           source                1..501
                                   /organism="Phoma herbarum"
                                   /mol_type="genomic DNA"
                                   /strain="TR38"
                                   /db_xref="taxon:73001"
           misc RNA            <1..>501
                                   /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                                   ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S
                                   ribosomal RNA"
ORIGIN
1  gtgggctttg cctgctatct cttaccocatg tcttttgagt acttacgttt cctcgggtggg
61  ttgcgccggc gattggacaa tttaaaccct ttgcagttgc aatcagcgtc tgaaaaacat
121  aatagttaca actttcaaca acggatctct tggttctggc atcgatgaag aacgcagcga
181  aatgcgataa gtagtgtgaa ttgcagaatt cagtgaatca tcgaatcttt gaacgcacat
241  tgcgccccct ggtattccat ggggcatgcc tgttcgagcg tcatttgtag cttcaagctt
301  tgcttggtgt tgggtgtttg tctcgccttt gcgtgtagac tcgccttaaa acaattggca
361  gcggcggtat tgatttcgga gcgcagtaca tctcgcgctt tgcactcata acgacgacgt
421  ccaaaaagtac ttttttacac tcttgacctc ggatcaggta gggatacccg ctgaacttaa
481  gcatatcaat aagcggagga a
//

```

Slika 15: Nukleotidno zaporedje seva 38 - *Phoma herbarum*.

```

LOCUS      KC608049          482 bp    DNA     linear   PLN 26-MAY-2013
DEFINITION Lophodermium pinastri strain TR2 internal transcribed spacer 1,
partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed
spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION  KC608049
VERSION    KC608049.1  GI:506484912
KEYWORDS   .
SOURCE     Lophodermium pinastri
ORGANISM   Lophodermium pinastri
           Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
           Leotiomycetes; Rhytismatales; Rhytismataceae; Lophodermium.
REFERENCE  1 (bases 1 to 482)
AUTHORS    Ravnikar,M., Tercelj,M., Janes,D., Strukelj,B. and Kerft,S.
TITLE      Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifers
           needles
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 482)
AUTHORS    Ravnikar,M. and Tercelj,M.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (12-FEB-2013) Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy,
           Ljubljana University, Askerceva 7, Ljubljana, Ljubljana 1000,
           Slovenia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..482
                           /organism="Lophodermium pinastri"
                           /mol_type="genomic DNA"
                           /strain="TR2"
                           /db_xref="taxon:64358"
           misc RNA      <1..>482
                           /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                           ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S
                           ribosomal RNA"
ORIGIN
1  cgggcttcgg  ggcccctatt  ctcacccttt  gtctaccaca  cttgttgcc  ttggcgcttc
61  ggcgccagtg  gaacgaaacc  ctggaatcat  tgctgtctga  gtactatata  atagttaaaa
121  ctttcaacaa  cggatctctt  gttctctggc  tcgatgaaga  acgcagcgaa  atgcgataag
181  taatgtgaat  tgcagaattc  agtgaatcat  cgaatctttg  aacgcacatt  gcgcccctctg
241  gtattccggg  gggcatgcct  gttcgagcgt  cattacaacc  ctcaagctct  gcttggtatt
301  gggctcgccc  tgtagggctt  gcctcaaaat  cagtggcggc  caccgtccga  ccttcagcgc
361  agtaatgctc  gtcgctgtga  gggaggggcc  aagccgtcag  acaaccccca  ctttacaagg
421  ttgacctcgg  atcaggtagg  gataccgct  gaacttaagc  atatcaataa  gcggaggaaa
481  ng
//

```

Slika 16: Nukleotidno zaporedje seva 2 - *Lophodermium pinastri*.

```

LOCUS      KC608050                485 bp    DNA        linear    PLN 26-MAY-2013
DEFINITION Lophodermium pinastri strain TR33 internal transcribed spacer 1,
           partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed
           spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial
           sequence.
ACCESSION  KC608050
VERSION    KC608050.1  GI:506484913
KEYWORDS   .
SOURCE     Lophodermium pinastri
           ORGANISM Lophodermium pinastri
           Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
           Leotiomycetes; Rhytismatales; Rhytismataceae; Lophodermium.
REFERENCE  1 (bases 1 to 485)
           AUTHORS  Ravnikar,M., Tercelj,M., Janes,D., Strukelj,B. and Kerft,S.
           TITLE    Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifers
           needles
           JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 485)
           AUTHORS  Ravnikar,M. and Tercelj,M.
           TITLE    Direct Submission
           JOURNAL  Submitted (12-FEB-2013) Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy,
           Ljubljana University, Askerceva 7, Ljubljana, Ljubljana 1000,
           Slovenia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..485
                               /organism="Lophodermium pinastri"
                               /mol_type="genomic DNA"
                               /strain="TR33"
                               /db_xref="taxon:64358"
           misc RNA      <1..>485
                               /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                               ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S
                               ribosomal RNA"
ORIGIN
1 taaccgggcc ttcgggcccc tattctcacc ctttgtctac cacactttgt tgccttggcg
61 cttcggcgcc agtggaaaga aaccctggaa tcattgctgt ctgagtacta tataatagtt
121 aaaactttca acaacggatc tcttggttct gccatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga
181 taagtaatgt gaattgcaga attcagttaa tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgccc
241 tctggtattc cggggggcat gcctgttoga gcgtcattac aaccctcaag ctctgcttgg
301 tattgggctc gcctgttagg gcttgcctca aaatcagtagg cggccaccgt cgcaccttca
361 gcgcagtaat gctcgtcgtc gtgagggagg gccgaagccg tcagacnnc cccactttac
421 aaggttgacc tcggatcagg tatggatacc cgctgaactt aagcatatca ntgagcggag
481 gaaaa
//

```

Slika 17: Nukleotidno zaporedje seva 33 - *Lophodermium pinastri*.



LOCUS KC608051 694 bp DNA linear PLN 26-MAY-2013  
 DEFINITION Lophodermium seditiosum strain TR35 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION KC608051  
 VERSION KC608051.1 GI:506484914  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Lophodermium seditiosum  
 ORGANISM [Lophodermium seditiosum](#)  
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomycetes; Rhytismatales; Rhytismataceae; Lophodermium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 694)  
 AUTHORS Ravnikar,M., Terclj,M., Janes,D., Strukelj,B. and Kerft,S.  
 TITLE Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifers needles  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 694)  
 AUTHORS Ravnikar,M. and Terclj,M.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (12-FEB-2013) Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, Ljubljana University, Askerceva 7, Ljubljana, Ljubljana 1000, Slovenia  
 COMMENT ##Assembly-Data-START##  
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
 ##Assembly-Data-END##  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..694  
 /organism="Lophodermium seditiosum"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="TR35"  
 /db\_xref="taxon:128023"  
 misc RNA <1..>694  
 /note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"  
 ORIGIN  
 1 gcgcgccgg cgcgctagtc tcccctgcca ggcgacacgc tcaatgtgcg gagagcccta  
 61 accataggca atccgcagtc cctaccggg attcagagac tcaatgagcg tgggttcagc  
 121 gcagctgagc ttgagataga gcccgtcctt gccggccacg gcgggggagtc aacggaacct  
 181 gcggaaggat cattatagaa taaacgcgcc gcgaggtgct atttcaccc tttgtttacc  
 241 aactcagtt gccttgggc gcagcgccag cggattgaaa ctctgaatc attgctgtct  
 301 gactactatt caatagttaa aactttcaac aacggatctc ttggttctgg catcgatgaa  
 361 gaacgcagcg aaatgcgata agtaatgtga attgcagaat tcagtgatc atcgaatcct  
 421 tgaacgcaca ttgcgcccc tggattctg gggggcatgc ctggtcgagc gtcattacaa  
 481 cctcaagct ctgcttggtg ttgggctcgc cttcgtcacg aaggcctgcc tcaaattcag  
 541 tggcgccgc cgtccgacct tcagcgcagt aatgctcgtc gctggtaggg aaggcgagca  
 601 ggtgcccgtca acacaacccc cacacacaag gttgacctcg gatcaggtag ggataccccc  
 661 tgaacttaag catatcaatg agcggaggaa aaat  
 //

Slika 18: Nukleotidno zaporedje seva 35 - *Lophodermium seditiosum*.

```

LOCUS      KC608052                699 bp    DNA        linear    PLN 26-MAY-2013
DEFINITION Lophodermium seditiosum strain TR35C 18S ribosomal RNA gene,
           partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA
           gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S
           ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  KC608052
VERSION    KC608052.1  GI:506484915
KEYWORDS    .
SOURCE     Lophodermium seditiosum
           ORGANISM Lophodermium seditiosum
           Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
           Leotiomycetes; Rhytismatales; Rhytismataceae; Lophodermium.
REFERENCE  1 (bases 1 to 699)
           AUTHORS Ravnikar,M., Tercelj,M., Janes,D., Strukelj,B. and Kerft,S.
           TITLE   Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifers
           needles
           JOURNAL Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 699)
           AUTHORS Ravnikar,M. and Tercelj,M.
           TITLE   Direct Submission
           JOURNAL Submitted (12-FEB-2013) Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy,
           Ljubljana University, Askerceva 7, Ljubljana, Ljubljana 1000,
           Slovenia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..699
                               /organism="Lophodermium seditiosum"
                               /mol_type="genomic DNA"
                               /strain="TR35C"
                               /db_xref="taxon:128023"
           misc RNA      <1..>699
                               /note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed
                               spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer
                               2, and 28S ribosomal RNA"
ORIGIN
           1 tactnngcgc gccggcgcgc tagtctcccc tgcgaggcga cacgctcaat gtgcccagag
           61 ccctaaccat aggcaatccg cagtccctac ccgggattca gagactcaat gagcgtgggt
           121 tcagcgcagc tgagcttgag atagagcccc tccctgccgg ccacggccgg gagtcaacgg
           181 aacctgcgga aggatcatta tagaataaac gcgccgcgag gtgctattct cacccttgt
           241 ttaccacact cagttgcctt ggcgcgcagc gccagcggat tgaactcct gaatcattgc
           301 tgtctgagta ctattcaata gttaaaactt tcaacaacgg atctcttggc tctggcatcg
           361 atgaagaacg cagcgaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga
           421 atctttgaac gcacattgcy cccctggta ttctgggggg catgcctggt cgagcgtcat
           481 tacaaccctc aagctctgct tgggtgtggg ctgcctctcg tcacgaaggg ctgcctcaaa
           541 ttcagtgggc gccgccgtcc gaccttcagc gcagtaatgc tcgtcgctgg tagggaaggg
           601 cagcaggtgc cgtcaacaca acccccacac acaaggttga cctcggatca ggtagggata
           661 cccgctgaac ttaagcatat caatgagcgg aaggaaaaa
//

```

Slika 19: Nukleotidno zaporedje seva 35C - *Lophodermium seditiosum*.

# Literatura

- [1] F. Batič, H. Šircelj, and B. Turk. *Pregled rastlinskega sistema*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, 2004.
- [2] A. De Bary. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Holfmeister's Handbook of Physiological Botany. vol 2, Leipzig, 1866.
- [3] G. Carroll. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69(1):2–9, 1988.
- [4] O. Petrini. *Fungal endophytes of tree leaves*. Microbial Ecology of Leaves. Springer Verlag, New York, 179–197, 1991.
- [5] O. Petrini and G. Carroll. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany*, 59(5):629–636, 1981.
- [6] G. Carroll, O. Petrini. Patterns of Substrate Utilization by Some Fungal Endophytes from Coniferous Foliage. *Micologia*, 75(1):53–63, 1983.
- [7] D. S. S. Kumar and K. D. Hyde. Biodiversity and tissue - recurrence of endophytic fungi from *tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17:69–90, 2004.
- [8] M. V. Tejesvi, K. R. Kini, H. S. Prakash, S. Ven, and H. S. Shetty. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity*, 24:37–54, 2007.
- [9] M. M. Dreyfuss and I. H. Chapela. *Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals*. The discovery of natural products with therapeutic potential. Butterworth-Heinemann, London, United Kingdom, 49–80, 1994.



- [10] B. Schulz, C. Boyle, S. Draeger, A. K. Römmert, and K. Krohn. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9):996–1004, 2002.
- [11] M. Dermastia. *Sekundarni metaboliti*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, 5–6, 2006.
- [12] B. Schulz, C. Boyle. The endophytic continuum: Review. *Mycological Research*, 109(6):661–698, 2005.
- [13] B. Kendrick. *The Fifth Kingdom*. Focus Publishing, Newburyport, MA, USA, 3rd ed, 142–158, 2000.
- [14] A. Stierle, G. Strobel, and D. Stierle. Taxol and taxane production by taxomyces andreanae, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, 260:214–216, 1993.
- [15] V. Hellwig, T. Grothe, A. Mayer-Bartschmid, R. Endermann, F. U. Geschke and T. Henkel. Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. - *Journal of Antibiotics*, 55(10):881–892, 2002.
- [16] M. P. Singh, J. E. Janso, S. W. Luckman, S. F. Brady, J. Clardy and M. Greenstein. Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115. *Journal of antibiotics*, 53:256–261, 2000.
- [17] S. F. Brady, S. M. Bondi, and J. Clardy. The guanacastepenes: A highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. *Journal of American Chemical Society*, 123(40):9900–9901, 2001.
- [18] R. J. Rodriguez, J. F. White, A. E. Arnold, and R. S. Redman. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2):314–330, 2009.
- [19] D. Janeš. Raziskave gliv kot virov novih protimikrobnih učinkovin. *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, doktorska disertacija*, 1–24, 2007.

- [20] A. Žerjal. Ugotavljanje protimikrobne učinkovitosti nekaterih endofitskih gliv. *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, diplomsko delo*, 2008.
- [21] S. Zajc. Ugotavljanje protibakterijskega delovanja endofitskih iglavcev. *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, diplomsko delo*, 2011.
- [22] E. Ružič-Sabljić, T. Cerar, A. Steyer, K. Strašek, and V. Cvitković-Špik. *Osnutek praktikuma iz mikrobiologije namenjeno študentom farmacije*. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 68–72, 2007.
- [23] Laboratory Protocols, Level 1 Training Course, Agar diffusion using E-test. [http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/anti2\\_pdf.pdf](http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/anti2_pdf.pdf). Objavljeno 2003, dostop 15.1.2013
- [24] B. C. Sutton. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. *Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK*, 1980.
- [25] J. C. Goud and A. J. Termorshuizen. Quality of methods to quantify microscle-rotia of verticillium dahliae in soil. *Journal of Plant Pathology*, 109(6):523–534, 2003.
- [26] *Clinical and laboratory standards institute: Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by dna target sequencing: guideline*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.
- [27] D. M. Geiser, J. I. Pitt, J. W. Taylor. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1):388–393, 1998.
- [28] S. A. Balajee, A. M. Borman, M. E. Brandt, J. Cano, M. Cuenca-Estrella, E. Dannaoui, J. Guarro, G. Haase, C. C. Kibbler, W. Meyer, K. O'Donnell, C. A. Petti, J. L. Rodriguez-Tudela, D. Sutton, J. D. Eisner, and B. L. Wickes. Sequence-based identification of aspergillus, fusarium, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4):877–884, 2009.

- [29] E. Stackebrandt and B. M. Goebel. Taxonomic note: A place for dna-dna reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *IJSEM*, 44(1):846–849, 1994.
- [30] Conrad L. Schoch, Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, and Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16):6241–6246, 2012.
- [31] EDP DeRobertis. *Chapter 20: Transcription and Processing of RNA*. Cell and molecular biology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 8th edition, 558–593, 2010.
- [32] Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>. Dostop 15.11.2012.
- [33] T. J. White, T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rRNA genes for phylogenetics. in: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). *New York: Academic Press, Inc*, 315–322, 1990.
- [34] [http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/dna\\_sequencing/](http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/dna_sequencing/). Dostop 25.2.2013.
- [35] <http://www.dnasequencing.org/chain-method/49-dna-chain-termination>. Dostop 18.1.2013.
- [36] *DNeasy Plant Mini Kit Protocol*. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/DNeasy-Plant-Mini-Kit>. Dostop 15.11.2012.
- [37] *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*. [http://devbio.wustl.edu/krolllab/Kroll\\_Lab\\_Protocols/Molecular%20Biology%20protocols/Cloning%20protocols%20folder/Gel%20extraction-Qiagen.pdf](http://devbio.wustl.edu/krolllab/Kroll_Lab_Protocols/Molecular%20Biology%20protocols/Cloning%20protocols%20folder/Gel%20extraction-Qiagen.pdf). Dostop 20.11.2012.

- [38] N. L. Glass and G. C. Donaldson. Development of primer sets designed for use with the pcr to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4):1323–1330, 1995.
- [39] A. S. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman. *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Learning Inc., USA, 5th edition, 1997.
- [40] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, 854–859, 1989.
- [41] J. Burrell. *Click4Biology: 4.4 Genetic engineering and biotechnology*, <http://click4biology.info/c4b/4/gene4.4.htm>. Objavljeno 2011, dostop: 15.8.2013.
- [42] Thermo Fischer Scientific. *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual*. <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>. Objavljeno 2008, dostop 15.1.2013.
- [43] F. Sanger and A. R. Coulson. A rapid method for determining sequences in dna by primed synthesis with dna polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3):441–448, 1975
- [44] J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. The clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24):4876–4882, 1997.
- [45] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410, 1990.
- [46] S. F. Altschul, T. L. Madden and D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17):3389–3402, 1997.
- [47] The National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Dostop 15.12.2012.

- [48] G. E. Sheridan, C. I. Masters, J. A. Shallcross and B. M. Mackey. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4):1313–1318, 1998.
- [49] R. J. Rodriguez and R. S. Redman. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59(5):1109–1114, 2008.
- [50] <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>. Dostop 15.9.2013.