

MOŽNOSTI DIAGNOSTIKE GLIV IZ RODU *Verticillium* spp. Z AFLP (DOLŽINSKI POLIMORFIZEM NAMNOŽENIH FRAGMENTOV) METODO

Sebastjan RADIŠEK¹, J. JAKŠE², Branka JAVORNIK³

¹ Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec,
SI-3310 Žalec, Slovenija

^{2,3} Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje,
Biotehniška fakulteta, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

IZVLEČEK

AFLP je novejša molekularna tehnika s široko uporabno vrednostjo pri različnih organizmih, saj nam omogoča detekcijo velikega števila DNA polimorfizmov v posamezni analizi, ima visoko ponovljivost in je lahko primerna za rutinske analize. Temelji na selektivni PCR amplifikaciji restriksijski fragmentov, ki so produkt razreza genomske DNA z restriksijskimi endonukleazami. Razlike med organizmi lahko odkrivamo brez predhodnega znanja o sekvencah genoma proučevanega organizma saj so le te odvisne od sprememb prepoznavnih mest restriksijskih encimov, ki nastanejo zaradi mutacij. Metoda zajame celoten genom in je primerna za ločevanje ozko sorodnih organizmov znotraj vrste. AFLP metodo smo uporabili za ugotavljanje DNA polimorfizma med izolati gliv *Verticillium alboatrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klehban, ki povzročata hmeljevo uvelost. Izolate gliv smo inokulirali v tekoče gojišče in jih štiri dni gojili na tresalniku. Micelij smo nato sprali z bidestilirano vodo in zbrali s centrifugiranjem. DNA iz micelija smo izolirali po SDS metodi. V analizi smo uporabili 500ng DNA, ki smo jo razrezali z endonukleazama *EcoR* I in *Msp* I. Po končani restrikciji smo dodali encimsko- specifične adapterje, ki smo jih z ligacijo vezali na restriksijske fragmente. Ti so služili kot tarčno mesto za začetne oligonukleotide z dvema selektivnima bazama s katerimi smo v PCR reakciji namnožili omenjene fragmente. Detekcijo namnoženih produktov smo opravili s 5% denaturacijsko poliakrilamidno elektroforezo in detektirali s srebrom. V analizi smo ugotovili razlike med obema vrstama iz rodu *Verticillium*, v nadaljevanju pa nameravamo s preizkušanjem različnih kombinacij začetnih oligonukleotidov ovrednotiti razlike med izolati znotraj posamezne vrste.

ABSTRACT

DIAGNOSIS OF FUNGI OF THE *Verticillium* spp. GENUS WITH THE AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) METHOD

AFLP is novel molecular technique with wide application in many different organisms, mainly due to the ability to detect a very high number of polymorphisms in a single assay, good repeatability and possibilities of automation. It is based on the selective PCR amplification of restriction fragments from total digestion of genomic DNA. It enables detection of genetic variations between closely related organisms. We used this technique to detect DNA polymorphism between isolates of the plant path-

ogenic fungi *Verticillium alboatrum* Reinke & Berthold and *Verticillium dahliae* Klehban., which causes hop wilt. In order to extract genomic DNA, we inoculated liquid media and incubated on orbit shakers for four days. Mycelium was collected by centrifugation and washed with demineralised water. DNA was extracted by the SDS method and digested with two enzymes, *EcoR* I and *Msp* I. The digestion adapters were then ligated to restriction fragments. The adapter-ligated fragments were amplified in PCR reaction by primers with two selective bases. The amplified fragments were separated by 5% denaturing polyacrylamid gels and visualised by silver staining. We detected DNA polymorphism between species of the genus *Verticillium*. In further research, we will test more primer combinations to assess genetic variations among isolates.

Do konca redakcije nismo prejeli integralnega besedila.