

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej JAKŠE

**IZOLACIJA MIKROSATELITNIH LOKUSOV NA KROMOSOMSKI
DNK HMELJA (*Humulus lupulus* L.) Z OBOGATITVENIM
POSTOPKOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ISOLATION OF MICROSATELLITE LOCI FROM HOP (*Humulus
lupulus* L.) CHROMOSOMAL DNA WITH ENRICHMENT
PROCEDURE**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2003

Doktorska disertacija je zaključek doktorskega Interdisciplinarnega podiplomskega študija biotehnologije. V celoti je bila opravljena na Katedri za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Senata Biotehniške fakultete in po sklepu Komisije za podiplomski študij Univerze, z dne 21.05. 2002 (po pooblastilu Senata Univerze v Ljubljani z dne 14.05. 2002) je bila za mentorico doktorske disertacije z naslovom "Izolacija mikrosatelitnih lokusov na kromosomski DNK hmelja (*Humulus lupulus* L.) z obogatitvenim postopkom" imenovana prof. dr. Branka Javornik.

Mentor: prof. dr. Branka Javornik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Dovč
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Anton Ivančič
Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo

Član: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 27. marec 2003

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorand:

Jernej Jakše

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
 DK UDK 575.822:633.791:577.2.08(043)=863
 KG genetika rastlin/genomi/hmelj/*Humulus lupulus*/molekularni markerji/polimorfizem /mikrosateliti/genomska obogatena knjižnica/DNA zaporedja
 KK AGRIS F30
 AV JAKŠE, Jernej, dipl. inž. agronomije, mag. znanosti
 SA JAVORNIK, Branka (mentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije
 LI 2003
 IN IZOLACIJA MIKROSATELITNIH LOKUSOV NA KROMOSOMSKI DNK HMELJA (*Humulus lupulus* L.) Z OBOGATITVENIM POSTOPKOM
 TD Doktorska disertacija
 OP XV, 141 str., 20 pregl., 33 sl., 4 pril., 226 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Optimizacija protokola izolacije zaporedij z mikrosatelitskimi ponovitvami iz proučevanega organizma je tehnično in cenovno zahtevna naloga. Razvili smo metodo za izdelavo genomske obogatene mikrosatelitske knjižnice, ki temelji na razrezu genomske DNA hmelja z mešanico restriksijskih encimov na fragmente dolžine pod 1000 bp. Sledi hibridizacijska selekcija fragmentov, ki vsebujejo mikrosatelitske lokuse z uporabo dolgih mikrosatelitskih sond pritrjenih na najlonske membrane. Metoda je bila testirana za di- [(GA)_n, (GT)_n], tri- [(AGA)_n, (ACA)_n, (CAG)_n] in tetranukleotidne [(ACTC)_n] mikrosatelitske ponovitve, nismo pa z njo uspeli izolirati A/T bogatih ponovitev [(AT)_n in (TAA)_n]. Mikrosatelite je možno z opisano metodo izolirati iz genomske DNA hmelja v 10-ih dneh, metoda pa je prenosljiva tudi na druge rastlinske ali živalske vrste. Povprečje obogatitve v genomskih knjižnicah ugotovljeno s hibridizacijskim preverjanjem rekombinantnih kolonij je znašalo 27 %. Skupno smo določili nukleotidno zaporedje 143-ih klonov iz 8-ih genomskih knjižnic v skupni dolžini 38.007 bp, od tega jih je 127 vsebovalo mikrosatelitsko ponovitev. Po preverjanju duplikacij smo ugotovili, da smo dobili 74 enkratnih zaporedij, kar predstavlja 43-odstotno pogostnost klonov. Glede na dolžino obrobnihih regij je 58 zaporedij bilo primernih za izdelavo začetnih oligonukleotidov. Na podlagi zaporedij dinukleotidnih mikrosatelitov smo izdelali 20 parov specifičnih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje lokusov v PCR, za katere smo določili optimalne pogoje pomnoževanja na skupini 6-ih akcesij in jih nadaljne karakterizirali na skupini 40-ih akcesij hmelja. Pri analizi potomcev dveh križanj smo skupno določili 15 lokusov, ki smo jih pomnožili s 14-imi pari začetnih oligonukleotidov. Pri enem lokusu nismo uspeli določiti alelov zaradi nagnjenosti k pomnoževanju zdrsnjenih fragmentov, en lokus je bil monomorfen, pri ostalih štirih pa aleli niso izrazili kodominantnega načina dedovanja. Skupno smo pomnožili 112 alelov, povprečno 7,5 alelov na lokus, od tega 26 specifičnih, prisotnih le pri eni analizirani akcesiji. Z alelnim polimorfizmom treh lokusov smo ločili vse analizirane akcesije. Na podlagi alelnih polimorfizmov lokusov smo določili različne genetske parametre: heterozigotnost, vrednost PIC, PI, efektivno število alelov in ocenili prisotnost ničtih alelov. Z iskanjem podobnosti v GenBank smo odkrili podobnosti z retrotranspozonskimi zaporedji, z zaporedjem iz kloroplasta, z genom za T7 bakteriofagni tip RNA polimeraze in za podenoto B topoizomernega gena. Slednji kaže na možnost uporabe pri filogenetskih študijah rastlinskih vrst.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
 DC UDC 575.822:633.791:577.2.08(043)=863
 CX plant genetics/genomes/hops/*Humulus lupulus*/molecular markers/polymorphism/microsatellites/genomic library enrichment/DNA sequences
 CC AGRIS F30
 AU JAKŠE, Jernej
 AA JAVORNIK, Branka (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology
 PY 2003
 TI ISOLATION OF MICROSATELLITE LOCI FROM HOP (*Humulus lupulus* L.) CHROMOSOMAL DNA WITH ENRICHMENT PROCEDURE
 DT Doctoral Dissertation
 NO XV, 141 p., 20 tab., 33 fig., 4. ann., 226 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The optimization of a procedure that generates microsatellite sequences from research organism represents challenge in terms of technique and expenses. Enrichment method for developing of genomic microsatellite library was developed, based on restriction digest of hop genomic DNA with a cocktail of several restriction enzymes which generate DNA fragments below 1000 bp. Subsequently, hybridization selection of fragments with microsatellite containing fragments proceeded with long microsatellite probes attached to small pieces of nylon membranes. Method was tested for di- [(GA)_n, (GT)_n], tri- [(AGA)_n, (ACA)_n, (CAG)_n] and tetranucleotide [(ACTC)_n] microsatellite repeats, but A/T rich repeats [(AT)_n in (TAA)_n] could not be captured with this protocol. Microsatellites can be isolated in 10 days and method can be easily adapted for use in other plant or animal species. Average enrichment ratio in developed genomic libraries determined by hybridization screening of recombinant colonies was 27 %. All together 143 clones were sequenced from 8 developed libraries in total length 38.007 bp, 127 clones contained microsatellite repeat. After examination of duplication, 74 unique clones were established, which represents 43 % redundancy. Length of flanking sequences allows primer development in 58 unique clones. Primer pairs were developed based on 20 sequences of dinucleotide clones for PCR amplification where optimal conditions were established for group of 40 hop accessions. Fifteen codominant loci amplified with 14 pair of primers were determined after segregation analysis of offsprings of two crosses. One locus was prone to producing strong stutter bands and alleles could not be assessed, one locus was monomorphic and remaining four had deviation from rules for codominant marker system. Overall 112 alleles were amplified; average 7,5 alleles per locus and 26 were genotype specific, found only in one hop plant. Only three loci were enough to distinguish all analyzed accessions. Several statistic parameters were determined for loci. Sequence homologies were discovered in GenBank with retrotransposon sequences, with chloroplast sequence, with gene for T7 bacteriophage type RNA polymerase and for gene for topoisomerase subunit B. Last one could be used for phylogeny analysis in plant kingdom.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XII
Okrajšave, simboli, slovarček	XIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MIKROSATELITI	4
2.1.1 Opisi in definicije	4
2.1.2 Pogostnost in porazdelitev mikrosatelitov v organizmih	5
2.1.3 Biologija mikrosatelitov	8
2.1.4 Aplikacije mikrosatelitske tehnologije	9
2.1.4.1 Medvrstno pomnoževanje mikrosatelitov	13
2.2 SPLOŠNO O HMELJU	15
2.2.1 Morfološki znaki uporabljeni v identifikacijske namene	17
2.2.2 Citološke študije hmelja	17
2.2.3 Aromatične snovi hmelja	18
2.2.4 Molekularne študije genoma hmelja	20
2.2.4.1 DNA markerji	20
2.2.4.2 Študije genov hmelja	22
2.3 STRATEGIJE IZOLACIJE MIKROSATELITSKIH LOKUSOV	23
2.3.1 Tradicionalne metode izolacije mikrosatelitov	23
2.3.2 Novejše strategije izolacije mikrosatelitskih lokusov	24
2.3.2.1 Postopki izolacije brez izdelave genomske knjižnice	24
2.3.2.2 Metoda podaljševanja začetnega oligonukleotida	25
2.3.2.3 Metode selektivne hibridizacije	26
2.3.2.3.1 Selektivna hibridizacija s pomočjo kovalentno vezanih sond	29
2.3.2.3.2 Selektivna hibridizacija s pomočjo biotinskih mikrosatelitskih sond	30
3 MATERIAL IN METODE	32
3.1 MATERIAL	32
3.2 METODE DELA	34
3.2.1 Izolacija rastlinske DNA za PCR analizo	34

3.2.2	Izolacija DNA cv. 'Savinjski Golding' za izdelavo genomske knjižnice	35
3.2.3	Določevanje koncentracije DNA	35
3.2.4	Agarozna elektroforeza	36
3.2.5	Postopek izdelave z mikrosateliti obogatene genomske knjižnice hmelja	36
3.2.5.1	Restrikcija genomske DNA hmelja in procesiranje restriksijskih fragmentov	36
3.2.5.1.1	Izbira primerne kombinacije restriksijskih encimov	37
3.2.5.2	Priprava fosforiliranih linkerjev	38
3.2.5.3	Ligacija linkerjev na DNA fragmente	38
3.2.5.4	Izdelava dolgih mikrosatelitskih sond za lovljenje	39
3.2.5.5	Lovljenje mikrosatelitov	41
3.2.5.6	Kloniranje obogatenih vzorcev	42
3.2.5.6.1	Restrikcija in defosforilacija vektorja	42
3.2.5.6.2	Izdelava kompetentnih celic <i>E. coli</i>	43
3.2.5.6.3	Procesiranje obogatenih DNA fragmentov	44
3.2.5.6.4	Transformacija kompetentnih celic s plazmidno DNA	45
3.2.5.6.5	Prenos kolonij in vezava DNA na najlonsko membrano	45
3.2.5.6.6	Hibridizacija in detekcija	46
3.2.5.6.7	Shranjevanje pozitivnih kolonij	48
3.2.5.6.8	Preverjanje dolžine DNA insertov pozitivnih kolonij	48
3.2.5.7	Izolacija plazmidne DNA	48
3.2.5.8	Določanje DNA zaporedja	49
3.2.5.8.1	Iskanje podobnosti v podatkovnih bazah zaporedij	50
3.2.6	Izbira začetnih oligonukleotidov	51
3.2.7	Pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR	51
3.2.7.1	Začetna optimizacija	51
3.2.7.2	Nadaljna optimizacija	52
3.2.7.3	Analiza križancev	52
3.2.8	Detekcija pomnoženih mikrosatelitov z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo in vrednotenje elektroforegramov	52
3.2.9	Statistična obdelava podatkov	53
3.2.10	Objava nukleotidnih zaporedij v GenBank	55
4	REZULTATI	56
4.1	IZDELAVA OBOGATENE GENOMSKE KNJIŽNICE HMELJA	56
4.1.1	Restrikcija DNA	56
4.1.2	Izdelava mikrosatelitskih sond	57
4.1.3	Lovljenje mikrosatelitov	58
4.1.4	Izdelava knjižnic	60
4.1.5	Analiza dolžine DNA insertov	61
4.1.6	Določevanje nukleotidnega zaporedja	61
4.1.7	Začetni oligonukleotidi	67
4.2	OPTIMIZACIJA POMNOŽEVANJA	68

4.2.1	Analiza mikrosatelitskega polimorfizma	71
4.2.2	Segregacijska analiza	74
4.2.3	Karakterizacija mikrosatelitskih markerjev	80
4.2.4	Vrednotenje podatkov	80
4.2.4.1	Frekvence alelov	80
4.2.4.2	Frekvence genotipov	88
4.2.4.3	Parametri variabilnosti	92
4.3	ISKANJE PODOBNOSTI V GENSKI BANKI NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	93
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	101
5.1	IZDELAVA POSTOPKA OBOGATENE MIKROSATELITSKE KNJIŽNICE HMELJA	101
5.2	POMNOŽEVANJE MIKROSATELITSKIH LOKUSOV HMELJA	112
5.3	ANALIZA MIKROSATELITSKEGA POLIMORFIZMA	113
5.4	ODKRITE PODOBNOSTI V GENSKI BANKI NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	118
5.5	SKLEPI	121
6	POVZETEK	122
6.1	POVZETEK	122
6.2	SUMMARY	124
7	VIRI	126

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Stroški izdelave protokola in genomske knjižnice (v ameriških dolarjih), vložen čas in rezultat glede na različne tehnike izolacije mikrosatelitov (Zane in sod., 2002: 6)	14
Preglednica 2: Najpogosteje uporabljeni linkerji pri izdelavi genomskih obogatenih knjižnic	27
Preglednica 3: Analizirane hmeljne akcesije, njihovo poreklo, rodovnik kultivarjev in spol	32
Preglednica 4: Preizkušene kombinacije restrikcijskih encimov (vsi RE New England Biolabs)	37
Preglednica 5: Mikrosatelitske ponovitve in komplementarna začetna oligonukleotida iz katerih smo izdelali sonde	40
Preglednica 6: Temperature spiranja membran po lovljenju za posamezne mikrosatelitske ponovitve	42
Preglednica 7: Zaporedje biotinske sonde za detekcijo mikrosatelitskih ponovitev, temperatura hibridizacije za posamezno knjižnico (T_h) in temperaturi spiranj za posamezno knjižnico (T_1 in T_2)	47
Preglednica 8: Zaporedje začetnih oligonukleotidov uporabljenih v reakcijah določevanja DNA zaporedja, na 5'-koncu so imeli pritrjeno barvilo CY5	50
Preglednica 9: Uporabljeni BLAST programi in podatkovne baze za iskanje podobnosti, pri iskanju smo uporabili privzete vrednosti programov	50
Preglednica 10: Število hibridizacijsko pregledanih kolonij v 7-ih genomskih mikrosatelitskih knjižnicah ter število in delež pozitivnih kolonij glede na hibridizacijski signal	60
Preglednica 11: Kloni, katerim smo določili nukleotidno zaporedje, njihova dolžina v bp, mikrosatelitsko zaporedje, število klonov z istim DNA insertom, primernost za izdelavo začetnih oligonukleotidov in tip mikrosatelitske ponovitve ...	62
Preglednica 12: Izdelani pari 20-ih začetnih oligonukleotidov z značilnimi karakteristikami; zaporedje začetnega oligonukleotida, mesto prileganja začetnega oligonukleotida ...	67
Preglednica 13: Pogoji pomnoževanja za izdelane pare začetnih oligonukleotidov	70
Preglednica 14: Aleli petnajstih analiziranih lokusov in njihove dolžine v bp	82
Preglednica 15: Genotipsko specifični aleli	87

	str.
Preglednica 16: Število določenih alelov in genotipov na lokus pri vseh analiziranih akcesijah hmelja ter njihovo število pri divjih akcesijah in kultivarjih	89
Preglednica 17: Dejanska in pričakovana heterozigotnost (H_o , H_e), vrednost PIC, verjetnost enakosti genotipov (PI), število efektivnih alelov na lokus (n_e) in ocena frekvence ničtih alelov (r) ...	94
Preglednica 18: Primerjava rezultatov klasičnega postopka izolacije mikrosatelitov (Brady in sod., 1996) in obogatitvenega postopka selektivne hibridizacije	105
Preglednica 19: Ponovljivost vseh klonov v 6-ih izdelanih mikrosatelitskih knjižnicah	106
Preglednica 20: Odkriti tipi mikrosatelitov po posameznih genomskih knjižnicah	111

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: (a) Žensko socvetje v času cvetenja, (b) cvetoči poganjek ženske rastline, (c) moško socvetje v času cvetenja in (d) cvetoči poganjek moške rastline japonskega hmelja, <i>H. japonicus</i>	16
Slika 2: Testiranje različnih kombinacij RE in groba ocena števila restriksijskih mest za posamezne encime v genomu hmelja ...	56
Slika 3: Izdelava dolgih mikrosatelitskih sond s podaljševanjem v PCR (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 in 10) ali s pomočjo zrds s Klenowim encimom (5 in 6) ...	57
Slika 4: Primer pomnoževanja DNA vzorca po lovljenju ...	58
Slika 5: Preverjanje stopnje obogatitve vzorca s hibridizacijo točkovnega odtisa ...	59
Slika 6: Pozitivni hibridizacijski signali testiranja membrane s 186-imi replikami rekombinantnih kolonij GT (a) in ACTC (b) knjižnice, s 37-in 2-odstotnim deležem pozitivnih klonov	61
Slika 7: Primer ocenjevanja velikosti DNA insertov AGA knjižnice shranjene v mikrotiterski plošči (96 vzorcev, A ₁ – H ₁₂) ...	62
Slika 8: Primer popolne, sestavljene in prekinjene mikrosatelitske ponovitve, določene s pomočjo laserske avtomatske naprave za določevanje nukleotidnega zaporedja	66
Slika 9: Primer začetnega pomnoževanja lokusov <i>HIGT3</i> , <i>HIGT7</i> , <i>HIGA3</i> , <i>HIGA5</i> , <i>HIGA9</i> in <i>HIGA29</i> pri 6-ih vzorcih hmelja ...	69
Slika 10: Vpliv temperature prileganja začetnih oligonukleotidov na pomnoževanje DNA pri lokusih ...	69
Slika 11: Primer pomnoževanja DNA fragmentov pri lokusu <i>HIGA2</i> pri 21 akcesijah hmelja, kjer smo pri posamezni akcesiji zaznali 3 ali 4 fragmente ...	72
Slika 12: Primer pomnoževanja DNA fragmentov pri lokusu <i>HIGA12</i> , kjer smo s segregacijsko analizo dokazali obstoj dveh lokusov. Prvi lokus, <i>HIGA12a</i> , je bil najpolimorfnejši lokus v naši analizi z 18-imi različnimi aleli ...	73
Slika 13: Primer pomnoževanja DNA fragmentov pri lokusu <i>HIGT7</i> , kjer smo pri vseh akcesijah zaznali fragment 158 bp, poleg tega pa še dva (1 in 20), enega (2, 3, 4...) ali nobenega fragmenta (9, 10, 16...) z značilnim mikrosatelitskim fragmentom ...	73
Slika 14: Primer pomnoževanje DNA fragmentov pri lokusu <i>HIGT11</i> , kjer smo zaznali zapleten elektroforetski profil ...	74
Slika 15: Razcep alelov lokusa <i>HIGA2</i> križanja 241/8 × No3-38	75
Slika 16: Razcep alelov lokusa <i>HIGA12</i> križanja 'Yeoman' × 3/3	75

	str.
Slika 17: Razcep alelov lokusa <i>HIGA12</i> križanja 241/8 × No3-38	76
Slika 18: Razcep alelov lokusa <i>HIGT7</i> križanja 'Yeoman' × 3/3	77
Slika 19: Razcep alelov lokusa <i>HIGT7</i> križanja 241/8 × No3-38	77
Slika 20: Razcep alelov lokusa <i>HIGT8</i> križanja 241/8 × No3-38	78
Slika 21: Razcep alelov lokusa <i>HIGT11</i> križanja 'Yeoman' × 3/3	78
Slika 22: Razcep alelov lokusa <i>HIGT11</i> križanja 241/8 × No3-38	79
Slika 23: Primeri pomnoženih dolžinskih polimorfizmov pri petih mikrosatelitskih lokusih hmelja ...	81
Slika 24: Frekvence alelov posameznih lokusov ...	85
Slika 25: Porazdelitev genotipov na posameznih lokusih ...	90
Slika 26: Odkrili smo proteinsko podobnost med hmeljnim klonom AGA12 (zgoraj, rdeče) in <i>Nicotiana sylvestrisovim</i> (spodaj, modro) (v sredini so ohranjene AK) delom eksona 2 in eksonom 3 gena za T7 bakteriofagni tip RNA polimeraze (<i>NsRPOT-A</i> , BAB69431) ...	97
Slika 27: Odkrili smo proteinsko podobnost med hmeljnim klonom GT2 (zgoraj, rdeče) in <i>Arabidopsis thalianim</i> (spodaj, modro) (v sredini so ohranjene AK) delom eksona 9 in eksonoma 10 in 11 podenote B topoizomeraze 6 (<i>top6B</i> , AJ297843) ...	98
Slika 28: Nukleotidna poravnava kodirajočih rastlinskih zaporedij, odkritih v bazi zaporedij (introni odstranjeni, če zaporedje ni iz EST baze), s hmeljnim klonom GT2 ...	99
Slika 29: Proteinska poravnava prevedenih nukleotidnih zaporedij iz slike 28 in proteinskih zaporedij iz proteinske banke zaporedij, ki kaže izredno visoko stopnjo podobnosti ...	100
Slika 30: DsSNX linker (a) z restrikcijskimi mesti <i>StuI</i> in <i>NheI</i> (podčrtano, shematsko prikazana cepitev), rev del linkerja je fosforiliran na 5'-koncu; (b) v primeru nastanka SNX dimera v postopku ligacije se ustvari restrikcijsko mesto <i>XmnI</i>	102
Slika 31: Odkriti SNP polimorfizmi in TAT insercija na označenih nukleotidnih mestih pri vzorcih A8 in E10 klona GA7	108
Slika 32: Primer izredno dolgega trinukleotidnega mikrosatelitskega zaporedja klona CAG4 iz obogatene knjižnice	109
Slika 33: Primer kompresije pri določevanju nukleotidnega zaporedja klona GA28 ...	110

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Parametri programa Prime za izdelavo začetnih oligonukleotidov, ki so se razlikovali od osnovnih vrednosti
- Priloga B: Genotipi 40-ih analiziranih akcesij hmelja (zaporedje akcesij kot v preglednici 3) pri 15-ih mikrosatelitskih lokusih ob predpostavki, da ni bil nikjer prisoten ničti alel (aleli v bp)
- Priloga C: Natančne vrednosti frekvenc alelov posameznih lokusov
- Priloga D: Hmeljni kloni, pri katerih smo odkrili določeno stopnjo podobnosti z DNA ali proteinskimi zaporedji

OKRAJŠAVE, SIMBOLI, SLOVARČEK

AFLP	polimorfizem dolžine pomnoženih restrikcijskih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
AK	aminokislina
AMP-PCR	PCR s sidrnim mikrosatelitskim oligonukleotidom (angl. Anchored Microsatellite-Primed PCR)
BLAST	angl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumine)
CaCl ₂	kalcijev klorid
cDNA	komplementarna DNA (angl. copy DNA)
cfu/μg	število kolonij na μg DNA (angl. Colony Forming Units)
CHS	halkon sintaza
CIAP	alkalna fosfataza iz telečjega črevesa (angl. Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
cM	centi morgan
cpDNA	kloroplastna DNA
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
CY5	cianinski tip barvila
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi nukleotid trifosfat
dsDNA	dvoverižna DNA (angl. Double Stranded DNA)
DTT	ditiotreitrol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina – dinatrijeva sol
EST	izražena nukleotidna zaporedja (angl. Express Sequence Tags)
EtBr	etidijev bromid
H _e	pričakovana heterozigotnost
H _o	dejanska heterozigotnost
homoplazija	dolžinska skladnost
IPTG	izopropil tiogalaktozid
ISSR	med-mikrosatelitski PCR (angl. Inter-SSR PCR)
ITS	notranja prepisana regija (angl. Internal Transcribed Spacer)
K ₂ HPO ₄	kalijev hidrogen fosfat
KCl	kalijev klorid

KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogen fosfat
LB	Luria-Bertanijev medij
LN-DNA	ligirana, pomnožena DNA
MBN	mung nukleaza (nukleaza fižola mung, angl. Mung Bean Nuclease)
Mg ⁺⁺	magnezijevi ioni
MgCl ₂	magnezijev klorid
MgSO ₄	magnezijev sulfat
MnCl ₂	manganov klorid
MP-PCR	PCR z mikrosatelitskim oligonukleotidom (angl. Microsatellite-Primed PCR)
mRNA	sporočilna RNA (angl. messenger RNA)
Na ₂ HPO ₄	natrijev hidrogen fosfat
NaCl	natrijev klorid
NADH	nikotinamid dinukleotid, reducirana oblika
NaOH	natrijev hidroksid
n _e	število učinkovitih alelov na lokus
(NH ₄) ₂ SO ₄	amonijev sulfat
nr	neponovljiva zaporedja (nanašajoč se na tip baze) (angl. Non-Redundant)
OD ₆₀₀	gostota bakterijskih celic merjena pri 600 nm valovne dolžine
PA	poliakrilamidna elektroforeza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
p _i	frekvenca i-tega alela
PI	verjetnost enakosti genotipov
PIC	informacijska vrednost polimorfizma
PIMA	tehnika izolacije mikrosatelitov, ki temelji na pomnoževanju DNA z večjim številom RAPD začetnih oligonukleotidov (PCR Isolation of Microsatellite Arrays)
PK	polinukleotidna kinaza
<i>pol</i>	Poliprotein
QTL	lokusi za kvantitativne lastnosti (angl. Quantitative Trait Loci)
r	frekvenca ničtih alelov
RAPD	tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA (angl. Random Amplified Polymorphic DNA)
rDNA	ribosomska DNA
RE	restrikcijski encim

RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
TS	sobna temperatura
SAMPL	selektivno pomnoževanje mikrosatelitskih ponovitev (angl. Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Loci)
SDS	natrijev dodecil sulfat
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. Single Nucleotide Polymorphisms)
SSC	natrijev citratni pufer (Angl. Saline Sodium Citrate)
SSCP	enoverižni konformacijski polimorfizem (angl. Single Strand Conformational Polymorphism)
ssDNA	enoverižna DNA (angl. Single Stranded DNA)
SSM	neppravilno parjenje zdrsne vijačnice med replikacijo DNA (angl. Slip-Strand Mismatching)
STMS	z nukleotidnim zaporedjem opredeljena mikrosatelitska mesta (angl. Sequence Tagged Microsatellite Sites)
STR	kratke tandemske ponovitve (angl. Short Tandem Repeats)
STS	sekvenčno označena mesta (angl. Sequence Tagged Sites)
TBE	tris-boratni-EDTA elektroforetski pufer
TD	PCR protokol, kjer v začetnih ciklih postopno znižujemo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov (angl. touch down)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
<i>top6B</i>	podnota B topoizomernega gena VI
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UCO	neenak crossing over (angl. Unequal Crossing Over)
UTR	nepreveden del mRNA (angl. UnTranslated Region)
UV	ultravijoličen
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. Variable Number of Tandem Repeats)
VPS	valerofenon sintaza
WWW	svetovni splet (angl. World Wide Web)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil galaktozid

SLOVARČEK

1 UVOD

Iskanje in uporaba polimorfizma mikrosatelitskih lokusov v molekularnih študijah rastlinskih genomov sta v zadnjem desetletju dobila neslutene razsežnosti. Zaradi lastnosti, ki jih uvrščajo med skoraj popolne molekularne markerje, so lokusno specifični mikrosateliti postali eno najboljših orodij za kartiranje genomov, identifikacijo osebkov in analize starševstva ter študije filogenetskih povezav. Vsakodnevno smo priča poročilom o izolaciji na desetine novih mikrosatelitskih lokusov pri rastlinskih vrstah, s katerimi povečujejo spoznanja o rastlinskem genomu.

Detekcija mikrosatelitskega polimorfizma temelji na uporabi hibridizacijskih tehnik, verižne reakcije s polimerazo (PCR¹) ali pa kombinira obe tehniki. Vendar nobena od alternativnih tehnik, ki se poizkušajo izogniti izdelavi genomske knjižnice, ne dosega uporabnosti in robustnosti lokusno specifičnega pomnoževanja mikrosatelitov. Za omenjeno tehniko pa je potrebno izdelati knjižnico in s hibridizacijo preveriti vstavljene fragmente DNA, da ugotovimo, kateri vsebujejo mikrosatelitske ponovitve. Omenjena klasična izolacija mikrosatelitov zahteva pregled več 10.000-ih klonov, da odkrijemo do nekaj 10 mikrosatelitskih zaporedij. Ta del, poleg določevanja nukleotidnega zaporedja, predstavlja finančen in delovno zahteven podvig in je glavni omejujoč dejavnik pri izdelavi in uporabi lokusno specifičnih mikrosatelitskih markerjev. Raziskovalci poizkušajo razviti raznovrstne metode, ki bi povečale odstotek mikrosatelitskih fragmentov v genomski knjižnici, kar bi omogočalo hitrejšo izvedbo in delno pocenitev postopka izolacije.

Center izvora hmelja še vedno ni natančno določen, čeprav največ dejstev govori v prid hipotezi, da je to Kitajska. Centri diverzitete pa obstajajo v Evropi, Aziji in Ameriki, v 19. stoletju pa je bil prenešen tudi v Avstralijo in Afriko. Poimenovanje in morebitna sorodnost hmeljnih rastlin s treh kontinentov pa še nista povsem razjasnjeni in raziskani (Neve, 1991). Divjo rastlino hmelja naj bi poznala in uporabljala že stara ljudstva (Babilonci, Egipčani, Rimljani, Grki), vendar ni o njegovi uporabi v tem času nič znanega (Moir, 2000). Pridelek hmelja predstavljajo neoplojena ženska socvetja, imenovana hmeljni storžki. Ta se dodajajo pivu kot grenčični dodatek, ki pa ima tudi vlogo konzervansa. Prvi znani zapiski o uporabi hmelja pri varjenju piva segajo šele v 11. stoletje. Pivovarska industrija je največji porabnik hmelja, določeno zanimanje zanj pa vlada v zadnjem času tudi v farmacevtski industriji, saj so odkrili v lupulinski frakciji snovi, ki vplivajo na zaviranje rasti rakastih celic (Miranda in sod., 1999).

Za področje Slovenije naj bi obstajala poročila iz 12. stoletja o gojenju hmelja v teh krajih, vendar pa je pri nas postal komercialno zanimiv šele po letu 1870 (Neve, 1991). V Savinjski dolini ga pridelujejo že več kot 100 let in je eden glavnih izvoznih artiklov

¹ Angl. Polymerase Chain Reaction; terminološki izrazi, splošne določbe, pravopisna določila in nomenklatura kemičnih elementov uporabljeni v nalogi so pisani po priporočilih terminološke komisije Slovenskega biokemijskega društva. Ta so na voljo na svetovnem spletu na strani <http://bio.ijs.si/sbd/terminologija.html> (11. nov. 2002).

slovenskega kmetijstva. Do nedavnega so ga pridelovali na 2.500 ha, danes pa lahko zasledimo upad kmetijskih površin, zasajenih s hmeljišči, kar je predvsem posledica sprememb v tehnologiji varjenja piva, zaradi zahtev trga po super alfa kultivarjih in posledično cenovni vojni na svetovnem trgu. Žlahtniteljski programi držav pridelovalk hmelja poizkušajo ujeti korak z zahtevami trga in s tem povezano izboljšati pridelovalne lastnosti novih kultivarjev, še posebej pa posvečajo pozornost dvigu odstotka alfa kislin in izboljšanju odpornosti na bolezni in škodljivce. Z žlahtnjenjem hmelja se v Sloveniji na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu ukvarjajo od leta 1952. Žlahtnjenje predstavlja nujnost, saj je introdukcija tujih kultivarjev v druge pridelovalne razmere pogosto neuspešna. Hmelj močno reagira na spremenjene ekološke razmere, spremeni habitus in stopnjo odpornosti na bolezni in škodljivce ter kvaliteto (Kralj, 1975). Rezultat žlahtniteljskih programov v Sloveniji do začetka 90-ih let je 11 kultivarjev A, B in C serije (Kralj in Wagner, 1971; Kralj in Wagner, 1980; Kralj, 1990). Najbolje se je uveljavil kultivar 'Aurora', ki je posajen na okoli 60 % hmeljišč (Kralj in Friškovec, 1993). Morda najbolj splošno znan slovenski kultivar 'Savinjski Golding' pa izvira iz Anglije. V 19. stoletju so ga prinesli v Savinjsko dolino in ga s pomočjo naravne in namenske klonske selekcije oplemenitili. Sorta se je razmeroma dobro prilagodila ekološkim razmeram in je po svojem fenotipu postala značilna za Slovenijo. S primerjanjem fenotipskih lastnosti so dokazali, da je 'Savinjski Golding' genetsko soroden z angleškim kultivarjem 'Fuggles' (Kralj, 1971).

Molekularne analize hmeljnega genoma so v primerjavi z ostalimi pomembnimi kmetijskimi analizami še zelo skromne. Do sedaj so bili znani le štirje mikrosatelitski lokusi, ki so jih odkrili avstralski raziskovalci (Brady in sod., 1996). Kljub nizkemu številu odkritih lokusov so tudi pri hmelju ti markerji pokazali uporabnost za identifikacijo in vrednotenje genetske variabilnosti hmelja (Jakše in sod., 2001). Svojo sposobnost ločevanja in razlikovanja so markerji še posebno izkazali pri upravljanju genske banke, kjer smo uspeli ločiti pomešane divje akcesije hmelja glede na sadilna mesta. S predhodnimi večletnimi morfološkimi opazovanji tega ni bilo v celoti možno izvesti (Jakše in sod., 2000). Kot primer uporabe identifikacije lahko navedemo še primer ameriške sorte 'Columbus', ki je bila v postopku introdukcije. Na poskusnem polju Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu so opazili dva tipa rastlin, ki sta se razlikovala v več morfoloških lastnostih. Potrdili smo, da je sorta mešanica dveh različnih genotipov, ki smo ju ločili z mikrosatelitskimi lokusi. Enako so bili komercialni vzorci iz ameriških polj mešanica dveh istih genotipov (Jakše in sod., neobjavljeno). Pomembnost mikrosatelitov so še posebno izrazili raziskovalci pri izdelavi prve genske karte hmelja (Seefelder in sod., 2000b). Kljub temu, da so uporabili samo štiri lokuse so le-ti predstavljali edine povezovalce med moškim in ženskim delom karte. Karta je bila izdelana v glavnem s pomočjo AFLP markerjev, za katere pa omenjene lastnosti ni bilo možno potrditi. Vse do sedaj našete lastnosti mikrosatelitov hmelja opravičujejo, še bolj pa narekujejo njihovo nadaljnjo izolacijo, še posebej za potrebe kartiranja hmeljnega genoma.

Dosedanji rezultati potrjujejo, da hmeljni genom, podobno kot genomi vseh ostalih evkariotskih organizmov, vsebuje mikrosatelitske ponovitve (Brady in sod., 1996). Avtorji

so uporabili klasičen postopek izdelave knjižnice, kjer so za 4 delujoče pare začetnih oligonukleotidov pregledali kar 274.800 bakterijskih klonov, kar ob gostoti 200 klonov na petrijevko (90 mm) predstavlja kar 1374 petrijevk. V knjižnicah so prav tako dobili zelo nizek odstotek pozitivnih klonov, v (GA)_n knjižnici 0,3 %, v (GT)_n knjižnici pa samo 0,03 %. Predpostavljamo, da bi z uporabo obogatitvenega postopka za izdelavo mikrosatelitske knjižnice hmelja dosegli večji odstotek klonov z mikrosatelitskimi ponovitvami, kar nam bi omogočilo izolacijo večjega števila lokusov v krajšem času. O pogostnosti ostalih tipov mikrosatelitskih ponovitev v hmeljnem genomu tudi ni nobenega podatka razen hibridizacije točkovnega odtisa genomske DNA z mikrosatelitsko sondo (Brady in sod., 1996). Avtorji so z omenjeno hibridizacijo predpostavili naslednjo pogostnost mikrosatelitskih ponovitev v hmeljnem genomu (od najvišje do najnižje): GA, GT, TAA, CAA, GACA, CAC, GATA in GAA.

V naši nalogi želimo:

- (1) razviti metodo izdelave obogatene mikrosatelitske knjižnice hmelja, ki bo temeljila na hibridizacijski selekciji in s pomočjo katere bomo dosegli tako pogostnost mikrosatelitskih ponovitev, ki se bo razlikovala od pogostnosti v klasični knjižnici in bo omogočala izolacijo večjega števila mikrosatelitov hmelja, po potrebi pa bo tudi prenosljiva na ostale rastlinske organizme;
- (2) izdelati obogatene mikrosatelitske knjižnice za 3 tipe dinukleotidnih ponovitev, 4 tipe trinukleotidnih ponovitev in eno tetranukleotidno ponovitev;
- (3) določiti nukleotidno zaporedje delu odkritih pozitivnih klonov in na njegovi podlagi izdelati lokusno specifične pare začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje v PCR;
- (4) določiti optimalne pogoje pomnoževanja za izdelane začetne oligonukleotide in
- (5) okarakterizirati skupino akcesij hmelja z izdelanimi začetnimi oligonukleotidi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROSATELITI

Mikrosateliti so enostavna, tandemska ponovljiva DNA zaporedja, ki so jih do sedaj odkrili v večini organizmov in organelov. V zadnjem desetletju so mikrosateliti postali zelo pomembni, saj so raziskovalci odkrili, da so uporabni v najrazličnejših aplikacijah molekularne biologije. Do sedaj so jih uporabljali za izdelavo različnih genskih kart, za identifikacijo posameznikov in tudi za zgodovinske študije populacij. Problem, ki omejuje njihovo uporabo, je povezan s slabo prenosljivostjo mikrosatelitskih lokusov med različnimi vrstami rodu ali znotraj družine. V večini primerov so v delih nekodogene DNA, ki med različnimi vrstami ni ohranjena, zato jih je potrebna izolirati iz vsake preiskovane vrste. Pri filogenetskih študijah pa so razvili posebej prirejene statistične metodah za te lokuse. Mnenja o njihovi uporabnosti pri teh študijah pa so še vedno deljena.

2.1.1 Opisi in definicije

Genomi višjih organizmov so polni številnih kopij DNA zaporedij, ki so organizirane v ponovitvah različnih redov velikosti. Ponavadi so ponovljiva zaporedja razvrščena v tri oddelke. Najdaljša so satelitna zaporedja, pri katerih lahko posamezen satelit predstavlja nekaj odstotkov posameznega genoma in meri celo do dolžine 5 M baznih parov (bp) (Armour in sod., 1999). Satelitno DNA so odkrili v 60-ih letih, ko so pod določenimi pogoji ultracentrifugirali vzorce DNA, ki se je porazdelila v dve ali več plasti. Prva, največja plast, je vsebovala gensko DNA, drugo pa so poimenovali satelitno plast (Moxon in Wills, 1999). Izkazalo se je, da je ta plast sestavljena iz zelo dolgih, ponavljajočih se zaporedij DNA, ki je v glavnem locirana na centromernih in telomernih regijah kromosomov (Fann in sod., 2001). V sredini 80-ih let so odkrili ponovitve, sestavljene iz ponavljajočih se 10-ih ali več baz, ki so jim dali naziv minisateliti. Ugotovili so, da se posamezniki lahko razlikujejo v številu ponovitev minisatelita in uspešno prikazali uporabo te lastnosti pri DNA tipiziranju (Jeffreys in sod., 1985). Ponovljeni blok minisatelita je krajši od satelita, ponavadi so dolgi od 0,5 do 30 kbp. Konec 80-ih pa so odkrili zaporedja, sestavljena iz še krajših ponovitev DNA, in jim nadeli ime mikrosateliti. Ponavadi so dolgi le nekaj ponovitev, praviloma pa njihova dolžina ne presega 1 kbp.

Čeprav so mikrosateliti na prvi pogled zelo enostavna zaporedja, jih je po prebiranju literature težko opisati. Razlog je v različnih opisih in definicijah, ki so se pojavili z leti v člankih in knjigah (Goldstein in Schlötterer, 1999; Chambers in MacAvoy, 2000). Po prepričanju Armourja in sod. (1999) znaša dolžina ponovitve mikrosatelita 2-8 bp, drugi avtorji prištevajo k mikrosatelitom tudi mononukleotidna zaporedja (1-6 bp) (Goldstein in Pollock, 1997) ali pa prištevajo k mikrosatelitom ponovitve, katerih osnovna ponovitev ni daljša od 5 bp (Schlötterer in Tautz, 1992). Vrzal med številom baz v ponovitvi mikro- in minisatelita je potrebna, saj ti dve vrsti ponovljivih DNA zaporedij mutirata s povsem drugačnimi mehanizmi (Armour in sod., 1999). Tudi pri poimenovanju mikrosatelitskih

zaporedja. Prvo delo uporabe mononukleotidnih zaporedij v kloroplastni DNA iglavcev so predstavili Powel in sod. (1995).

Podrobnejši pregled zastopanosti in pogostnosti di- in trinukleotidnih mikrosatelitskih ponovitev v podatkovni bazi nukleotidnih zaporedij pri rastlinah sta podala Morgante in Olivieri (1993). Avtorja sta v raziskavi odkrila, da je pri rastlinah najpogostejša AT dinukleotidna ponovitev, saj je ta tip predstavljal 74 % vseh dinukleotidnih ponovitev, sledil je AG/TC tip ponovitve s 24 % in AC/TG z 1-odstotno zastopanostjo. V podatkovni bazi pri rastlinah ni bilo ponovitev s CG motivom. V primerjavi z dinukleotidnimi ponovitvami pri človeku je pogostnost pri rastlinah povsem drugačna, saj sta najpogostejši ponovitvi pri človeku AG/TC in AC/TG. Večina ponovitev pri rastlinah je bila najdena v intronih ali 5'-obrobni regijah genov, kar 22 % pa tudi v 5'- ali 3'-regijah neprevedenega dela sporočilne RNA (mRNA) (UTR¹⁰). V genih nista odkrila nobenega dinukleotidnega mikrosatelita. Pri trinukleotidnih ponovitvah sta najbolj izstopali ponovitvi TAT (27,5 %) in TCT (25 %) med 10-imi možnimi trinukleotidnimi ponovitvami. Zastopanost trinukleotidnih ponovitev pa je bila povsem drugačna od dinukleotidnih, saj sta kar 30 % ponovitev odkrila v kodirajočih področjih genov, 28 % pa v UTR. Glede na dolžino DNA zaporedij, ki sta jo pregledala, domnevata, da se mikrosateliti pri rastlinah pojavljajo vsakih 50 kbp. Študija Wanga in sod. (1994) pa je obravnavala še mono- in tetranukleotidne ponovitve ter kloroplastno in mitohondrijsko DNA. Odkrili so zelo nizko frekvenco mikrosatelitov pri organelih, pri genomske DNA pa je bila situacija podobna predhodni študiji z najpogostejšimi ponovitvami AT in AG/TC. Potrdili so domnevo, da se dinukleotidne ponovitve nahajajo v nekodogenih regijah DNA, nekatere trinukleotidne pa tudi v kodirajočih. Poročajo tudi o trikrat višji frekvenci mikrosatelitov pri dvokaličnicah v primerjavi z enokaličnicami. Danes je na voljo vedno več znanih zaporedij, določevanje nukleotidnega zaporedja nekaterih manjših genomov pa je tudi že zaključeno. Prav zato novejša študije temeljijo na mnogo več podatkih in so zamenjale nekatere, skoraj desetletje stare trditve o zastopanosti in pogostnosti mikrosatelitov pri rastlinah. Za *Arabidopsis* so ugotovili, da se v genomske DNA nahaja mikrosatelitski lokus vsakih 6,04 kbp, medtem ko je razdalja za izražena nukleotidna zaporedja (EST¹¹) večja, do 14 kbp (Cardle in sod., 2000). Najpogostejša so bila mononukleotidna zaporedja A/T (32 %), sledila so AT (16 %), AAG (14 %) in AG (10 %) zaporedja. Najpogostejši dinukleotid v genomske bazi je bil AT motiv, medtem ko CG motiva sploh niso odkrili. Glede na enoto ponovitve je bila pogostnost skoraj enaka za mono-, di- in trinukleotidna zaporedja (33 %, 30 % in 30 %). V EST bazi pa je bila pogostnost drugačna z najpogostejšimi trinukleotidi (AAG 29 % in ATC 17 %), sledil je dinukleotid AG z 20 % in mononukleotid A/T z 10 %. V eksonih je bilo 91 % trinukleotidnih mikrosatelitov, ostali so bili dinukleotidi in eden pentanukleotid. V intronih so odkrili več tipov mikrosatelitskih ponovitev (40 % mono-, 32 % di-, 23 % tri-, 3 % tetra- in 3 % pentanukleotidov). Več kot 40 % vseh trinukleotidnih ponovitev pri *Arabidopsisu* je bilo eksonskih. V skupini zaporedij ostalih rastlinskih vrst so dobili primerljive rezultate kot pri *Arabidopsisu*. Povprečna razdalja med genomskimi lokusi je

¹⁰ Angl. UnTranslated Region.

¹¹ Angl. Express Sequence Tags.

bila tu 6,8 kbp. Za posamezne rastlinske vrste so izračunali pogostnost mikrosatelitov v EST bazi in dobili največjo frekvenco pri rižu (3,4 kbp), sledili so paradižnik (11,1 kbp), topol (14 kbp) in bombaž (20 kbp). Natančno študijo pogostnosti posameznih mikrosatelitskih ponovitev za genomske DNA različnih evkariotov so nedavno podali Tóth in sod. (2000). Tudi oni so potrdili visoko pogostnost tri- in heksanukleotidnih ponovitev v eksonih vseh organizmov. Natančen pregled pogostnosti in zastopanosti mikrosatelitov v 57,8 Mbp znanega zaporedja riževega genoma so podali Temnykh in sod. (2001). Predpostavili so delitev mikrosatelitov na dva razreda, v prvem razredu so hipervariabilni lokusi s ponovitvami nad 20 bp, v drugem razredu pa so potencialno variabilni markerji z dolžinami ponovitev med 12 in 20 bp. Skupno so mikrosateliti razreda 1 predstavljali le 11,2 % vseh mikrosatelitskih lokusov in so bili razporejeni po genomu vsakih 15,8 kbp. Mikrosateliti razreda 2 pa so bili zelo pogosti z 1,9 kbp razdalje med vsakim lokusom. GC-bogati trinukleotidi so bili zopet najpogostejši pri EST zaporedjih. Avtorji tudi opozarjajo na visoko stopnjo podobnosti nekaterih dinukleotidnih AT lokusov s transpozonskimi in ostalimi ponovljivimi elementi genoma. Podobno povezanost mikrosatelitskih lokusov ječmena z retrotranspozonskimi elementi so odkrili tudi Ramsay in sod (1999). Natančen pregled pogostnosti tipov mikrosatelitskih ponovitev pri *Arabidopsisu*, rižu, soji, koruzi in pšenici v genomske DNA in EST bazi so podali Morgante in sod. (2002). Odkrili so, da je frekvenca mikrosatelitov višja v transkripcijskih regijah, še posebno v UTR delih, kot pa v genomske DNA. Ugotovitve avtorjev kažejo, da imajo mikrosateliti drugačen izvor pri rastlinah kot so mislili do nedavno in kot je bilo dokazano pri živalih, kjer izvirajo predvsem iz ponovljivih delov genoma. Pri rastlinah pa naj bi bili mikrosateliti značilno povezani z neponovljivim ("low copy") delom genoma. Število in delež mikrosatelitov med posameznimi organizmi se statistično razlikujeta.

Nova spoznanja so pokazala, da mikrosatelitska DNA ni povsem nepotreben del genoma. Vse več je dokazov o tem, da so mikrosateliti tudi sestavni del kodogene DNA ali regulatornih elementov (Kashi in Soller, 1999). Neprevedeni deli genoma (UTR) imajo višjo pogostnost mikrosatelitov kot ostali, 5' UTR predeli imajo celo 4-krat višjo frekvenco (Morgante in sod., 2002). V soji so odkrili regulatorni protein, ki se veže na $(GA)_n$ mikrosatelit in ima visoko stopnjo homologije z GAGA faktorjem pri *Drosophili* in je v večini primerov odgovoren za začetek transkripcije (Sangwan in O'Brian, 2002). Dokazali so, da promotorska področja z mikrosatelitskimi ponovitvami pri ekspresijskih vektorjih delujejo kot ojačevalci, s krajšanjem dolžine ponovitve pa se je aktivnost promotorjev zmanjšala. Nekaj študij pa poroča tudi o fenotipskih spremembah organizmov, kot posledici spremembe dolžine mikrosatelitske ponovitve: npr. primeri rakastih obolenj pri človeku (Fabre in sod., 2002).

Te ugotovitve vodijo k razmišljanju, da bi lahko mikrosateliti služili kot pomemben vir evolucijske prilagoditve okolju, in da z njihovo pomočjo populacije osvežujejo genetski polimorfizem, izgubljen med selekcijskim pritiskom. Prav tako naj bi bili mikrosateliti eden izmed uglaševalnih elementov genoma, ki mu omogočajo hitre evolucijske prilagoditve (Moxon in Wills, 1999).

2.1.3 Biologija mikrosatelitov

Visoka stopnja polimorfizma, ki izvira iz njihove nestabilnosti, je lastnost, zaradi katere so mikrosateliti zelo uporabni pri evlucijskih in genetskih študijah. Mutacijska stopnja teh lokusov je v primerjavi z ostalimi deli genoma navadno višja. Možnih je več tipov mutacij pri mikrosatelitskih lokusih, glavni vzrok njihove višje stopnje pa je samo v enem tipu spremembe: spremembe v številu ponovitev osnovnega motiva (Eisen, 1999).

Mikrosateliti nastanejo iz kriptično enostavnih regij, to so regije z malo ponovitvami oz. regije, ki kažejo določeno stopnjo ponovljivosti. Primer tega procesa so podali Messier in sod. (1996) na pseudogenu η -globina pri primatih, kjer sta neodvisno nastali dve obliki mikrosatelita. Izhodna oblika kriptične regije je bila sestavljena iz GTAT(GT)₃ zaporedja, ki je s točkovnimi mutacijami in dodajanjem ponovitev prešlo v dinukleotiden (GT)₆ ali tetranukleotiden GT(ATGT)₅ mikrosatelit.

Opisana sta bila dva modela, ki razlagata visoko stopnjo nestabilnosti mikrosatelitskih lokusov, ki pa se po vsej verjetnosti dopolnjujeta (Eisen, 1999). Prvi model predpostavlja, da je glavni mehanizem mutacij mikrosatelitskih lokusov neenak crossing over (model UCO¹²), ki je rezultat rekombinacije med homolognima kromosomoma, ki nista bila popolnoma poravnana. Model predvideva, da navzočnost mikrosatelitskih ponovitev poveča verjetnost neporavnave med homolognima kromosomoma. S podobnim modelom so v preteklosti tudi razložili visoko stopnjo sprememb v številu genov, ki so tandemsko ponovljeni. Drug model pa predvideva, da je glavni mutacijski mehanizem neppravilno parjenje zdrsne vijahnice med replikacijo DNA (model SSM¹³) (Levinson in Gutman, 1987). Ta je bil v preteklosti uporabljen za razlago mutacij DNA regij, ko se jim spremeni bralni okvir. Mutacijo povzroči zdrs DNA v kompleksu s polimerazo (disociacija kompleksa DNA in encima) med replikacijo, kar lahko povzroči trenutno nekomplementarnost (neporavnavo) matrice in nove sintetizirane DNA verige. Za pravilno replikacijo se morata obe verigi pravilno poravnati. Mutacija bo nastala, če bo ta poravnava nepravilna. Model SSM predvideva, da je višja stopnja mutacij mikrosatelitov posledica v številu ponovitev osnovnega motiva, ki povečajo verjetnost nepravilne poravnave po zdrsu DNA. Ponovitve se zlahka izvijejo iz vijahnice v obliki zank. Rezultati mnogih študij kažejo na to, da je model SSM glavni vzrok mikrosatelitske nestabilnosti: (a) na povečanje mikrosatelitske nestabilnosti ne vplivajo okvare genov, ki imajo glavno funkcijo pri rekombinaciji – ugotovitev je v nasprotju z modelom UCO, (b) pri kvasovkah je mutacijska stopnja mikrosatelitov v mitotskih in mejotskih celicah enaka – če bi veljal model UCO, bi morali biti mikrosateliti bolj nestabilni med mejozo, kjer je frekvenca rekombinacij mnogo večja, (c) mikrosatelitska stabilnost se zmanjša pri neaktivnosti genov, ki so vpleteni v replikacijski popravljalni mehanizem – ugotovitev je v skladu z modelom SSM. Vendar pa vse napake SSM ne postanejo tudi mutacije, ker so popravljene

¹² Angl. Unequal Crossing-Over.

¹³ Angl. Slip-Strand Mismatching.

s pomočjo replikacijskih popravljalnih mehanizmov. Zaradi tega je potrebno za popoln opis mutacijskega procesa upoštevati tako model SSM kot tudi popravljanje teh napak.

Pri uporabi mikrosatelitov moramo vedeti, da imajo ti lahko različno strukturo in tudi zgodovino. Zaradi tega je možno, da so aleli z isto dolžino produkti različnih evolucijskih dogajanj. V primeru, da vzamemo tako trenutno stanje (aleli istih dolžin) za dejansko sorodstveno stanje (skupna genetska zgodovina), vodi to k nepravilnemu sklepanju. Ta proces se imenuje dolžinska skladnost ali homoplazija¹⁴ in lahko predstavlja nov nivo polimorfizma, obenem pa tudi predstavlja težavo pri filogenetskih študijah (Estoup in sod., 1995; Estoup in Cornuet, 1999). S karakterizacijo alelov na osnovi določevanja nukleotidnega zaporedja lahko dobimo izredno zanimive rezultate. Estoup in sod. (1995) so proučevali mikrosatelitske alele čebel in odkrili, da so aleli sorodnih populacij vsi enaki. Nasprotno pa so bile razlike nukleotidnega zaporedja zelo pogoste pri oddaljenih podvrstah. Viard in sod. (1998) so z določevanjem zaporedja dokazali, da je 15 alelov enakih dolžin dejansko skrivalo 31 alelov (enaki na nivoju nukleotidnega zaporedja). V primeru populacijskih študij lahko določevanje zaporedja velikemu številu alelov predstavlja tehnični in časovni izziv, zato so uporabili hitrejšo in cenejšo metodo določevanja enoverižnega konformacijskega polimorfizma (SSCP¹⁵) za razlikovanje različnih alelnih variant (Angers in sod., 2000). Razlikovati moramo tudi med nastankom homoplazije in zmožnostjo njenega odkritja. Nekateri mikrosatelitski lokusi, predvsem sestavljeni in prekinjeni tipi, omogočajo lažjo detekcijo alelne homoplazije. Prav tako moramo vedeti, da tudi identično nukleotidno zaporedje lahko pomeni identičnost stanja, ne pa dejanske sorodstvene povezave. Vpliv pojava homoplazije pri mikrosatelitih je ta, da osebkni lahko kažejo bližjo sorodnost, kot je v resnici (Chambers in MacAvoy, 2000). Doyle in sod. (1998) so ravno zaradi tega pojava proti uporabi mikrosatelitov pri medvrstnih filogenetskih študijah.

2.1.4 Aplikacije mikrosatelitske tehnologije

Mikrosateliti so postali eden izmed najboljših markerskih sistemov, ki so trenutno na voljo raziskovalcem. Njihova uporabnost se je izkazala na različnih področjih molekularne biologije, predvsem zaradi naslednjih lastnosti (Weising in sod., 1998): (a) velika variabilnost lokusov zaradi višje mutacijske stopnje, ki so jim podvrženi v primerjavi z ostalimi deli DNA, (b) v genomu so navzoči v velikem številu, (c) v večini primerov so bolj ali manj enakomerno razpršeni po genomih in (d) v večini primerov so deli nekodogene DNA in zato zanje velja nevtralna selekcija (ta trditev je že delno omajana z najnovejšimi izsledki iskanja po bazah nukleotidnih zaporedij, glej poglavje 2.1.2 Pogostnost in porazdelitev mikrosatelitov v organizmih).

Do sedaj je bilo razvitih mnogo strategij uporabe mikrosatelitov kot molekularnih markerjev, te pa temeljijo na hibridizacijskih tehnikah, tehniki PCR ali njunih

¹⁴ Angl. size homoplasy.

¹⁵ Angl. Single Strand Conformational Polymorphism.

kombinacijah. Avtorji predvsem iščejo načine, kako se izogniti pripravam genomskih knjižnic, a vseeno vsaj delno izrabiti in odkriti polimorfizem mikrosatelitskih lokusov. Vendar pa vse omenjene tehnologije ne morejo doseči popularnosti in uporabnosti lokusno specifičnega pomnoževanja mikrosatelitov.

V začetku so raziskovalci uporabljali označene oligonukleotide z mikrosatelitsko ponovitvijo kot multilokusne sonde za odkrivanje polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). Metodologija in uporaba te tehnike mikrosatelitskega fingerprintinga pri rastlinah je dobro ponazorjena pri čičeriki (Sharma in sod., 1995) in arabidopsisu (Depeiges in sod., 1995). Uspešno ločevanje paradižnikovih kultivarjev in žlahtniteljskih linij s kombinacijo sedmih mikrosatelitskih sond in dveh restrikcijskih encimov (RE) je predstavljeno v delu Kaemmerja in sod. (1995). Z uporabo (TCT)₁₀ mikrosatelitske sonde pri tipiziranju kultivarjev solate in njenih divjih sorodnikov so dobili dovolj velik polimorfizem za njihovo razločevanje (Van de Wiel in sod., 1998). Slabosti te tehnike so zapleten laboratorijski protokol, potreba po mikrogramske količinah DNA, predvsem pa uporabnost omejuje dominantnost markerjev. Izvedba podobne metode temelji na hibridizaciji mikrosatelitske sonde na RAPD¹⁶ ali kakšen drug PCR elektroforetski profil (Richardson in sod., 1995). Detekcijo polimorfizma razlagajo tako, da se v PCR pomnoži mnogo fragmentov, ki so pod mejo detekcije barvanja z etidijevim bromidom ali barvanja s srebrom, zaznamo pa jih s hibridizacijo.

Naslednja tehnika pa uporablja mikrosatelitske začetne oligonukleotide v PCR. V primeru, da sta si mikrosatelitska lokusa dovolj blizu, lahko pomnožimo del med ponovljivima zaporedjema. Tehniko so poimenovali MP-PCR (PCR z mikrosatelitskim oligonukleotidom)¹⁷. Gupta in sod. (1994) so prikazali uporabo te tehnike pri različnih evkariotskih vzorcih DNA, vključno z rastlinami. Pri PCR vzorcih, ki so jih pomnožili z radioaktivno označenimi začetnimi oligonukleotidi in ločili z denaturacijsko poliakrilamidno elektroforezo (PA), so dobili še bolj kompleksne elektroforetske profile. Izboljšana tehnika, AMP-PCR tehnika (PCR s sidrnim mikrosatelitskim oligonukleotidom)¹⁸ ali medmikrosatelitski PCR¹⁹, sloni na pomnoževanju DNA z začetnimi oligonukleotidi z mikrosatelitskim zaporedjem, ki imajo na 5'- ali 3'-koncu vsaj dve selektivni bazi, ki sta drugačni od mikrosatelita. Tehniko so uspešno uporabili za ločevanje kultivarjev krompirja (Provan in sod., 1996), oljne repice (Charters in sod., 1996) in ozko sorodnih citrusov (Fang in Roose, 1997). Primernost uporabe tehnike za ločevanje genotipov soje in za genetsko kartiranje je predstavljena v delu Wanga in sod. (1998). Metoda ima kar nekaj prednosti. Selektivne baze preprečijo pomnoževanje vseh mikrosatelitskih lokusov in zmanjšajo njihovo število, kar posledično pomeni ostrejši in preglednejši elektroforetski profil. Z uporabo selektivnih baz na 5'-koncu pa dosežemo, da se bo v PCR pomnožil cel mikrosatelit in je tako večja verjetnost, da bo produkt polimorfen.

¹⁶ Tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA, angl. Random Amplified Polymorphic DNA.

¹⁷ Angl. Microsatellite-Primed PCR.

¹⁸ Angl. Anchored Microsatellite-Primed PCR.

¹⁹ Angl. Inter-SSR-PCR.

Najnovejši primer uporabe mikrosatelitov je selektivno pomnoževanje mikrosatelitskih ponovitev (SAMPL²⁰). Avtorji (Witsenboer in sod., 1997; Kuiper in sod., 1999) so zamisel patentirali, temelji pa na principu metode polimorfizma dolžine pomnoženih restriksijskih fragmentov (AFLP²¹) (Vos in sod., 1995), kjer ni potrebe po izdelavi genomske knjižnice proučevanega organizma. Tehniko so uspešno uporabili pri človeku, papriki, kumari, paradižniku in kokoši.

Vsem do sedaj opisanim tehnikam je skupna pomanjkljivost, da so elektroforetski profili multilokusni, zato je nemogoče določiti posamezne lokuse (razen pri analizi F₂ generacije lahko ugotovimo določeno povezanost med posameznimi aleli). Posledično so zato tudi markerji dominantni. Ta pomanjkljivost pa ne velja za PCR pomnoževanje posameznih mikrosatelitskih lokusov (lokusno specifično pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov), katerega rezultat so lokusno specifični, kodominantni markerji. Predpogoj za njihovo uporabo pa je poznavanje obrobni zaporedij mikrosatelita, na podlagi katerih izdelamo komplementarne začetne oligonukleotide za pomnoževanje genomske DNA. V začetku so naredili tehniki več kratic, najbolj je bila v uporabi STMS²² (z nukleotidnim zaporedjem opredeljena mikrosatelitska mesta), čeprav danes izraz mikrosateliti izpodriva tudi to kratico. V letu 1989 je prvič več raziskovalnih skupin neodvisno predstavilo uporabo v PCR reakciji pomnoženih mikrosatelitov pri človeku (npr. Weber in May, 1989). V začetku raziskav v PCR pomnoženih mikrosatelitov pri rastlinah so te preprosto našli z iskanjem v podatkovnih bazah zaporedij (Morgante in Olivieri, 1993; Morgante in sod., 1994). Pri večini rastlinskih vrst pa podatkov o nukleotidnih zaporedjih ni na voljo, razen pri nekaj vodilnih poljščinah, zato je izdelava genomske knjižnice edini možen postopek, ki je neobhodno potreben za izdelavo specifičnih začetnih oligonukleotidov. Danes večina raziskovalcev pri izolaciji uporablja metode obogatitve mikrosatelitskih lokusov (predstavljene v poglavju 2.3.2 Novejše strategije izolacije mikrosatelitskih lokusov).

Na kromosomskem nivoju predstavljajo mikrosateliti najboljši markerski sistem za kartiranje genomov. Mikrosatelitski lokusi tudi izpolnjujejo predpogoje za uspešen marker, ki je uporaben pri kartiranju, to so njihova številčnost, enakomerna porazdelitev in relativno enostavno vrednotenje njihovega polimorfizma. Pri človeku je na voljo že več tisoč mikrosatelitskih lokusov, ki so gosto razporejeni po vseh kromosomih s povprečno razdaljo med markerji 1,6 cM, 59 % karte je pokrite z 2 cM intervali in le pri 1 % markerjev je bila razdalja nad 10 cM (Dib in sod., 1996). Njihovo število še vedno narašča po zaslugi določevanja nukleotidnega zaporedja človeka. Te zelo goste karte omogočajo genetikom, da hitro kartirajo posamezne lastnosti. Podobne karte nastajajo tudi za ostale organizme. Tako so pri miši 6580 mikrosatelitskih markerjev vključili v že obstoječo RFLP karto. Povprečna razdalja med markerji je bila okrog 0,2 cM, kar je enako fizični razdalji okrog 400 kbp (Dietrich in sod., 1996). Pri rastlinah je trenutno najgostejša karta izdelana pri koruzi na podlagi 978-ih mikrosatelitskih markerjev (Sharopova in sod.,

²⁰ Angl. Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Loci.

²¹ Angl. Amplified Fragment Length Polymorphism.

²² Angl. Sequence-Tagged Microsatellite Sites.

2002), sledi ji karta ječmena z integriranimi 242-imi mikrosatelitskimi lokusi (Ramsay in sod., 2000), kar nekaj rastlinskih vrst pa ima izdelane karte s preko 100 vključenimi mikrosatelitskimi lokusi, npr. riž (McCouch in sod., 1997), pšenica (Röder in sod., 1998), topol (Cervera in sod., 2001), kivi (Testolin in sod., 2001) in sirek (Menz in sod., 2002). Mikrosateliti so postali izredno pomembni pri kartiranju lokusov za kvantitativne lastnosti (QTL²³), ki so odgovorni za genetsko kompleksnost mnogih znakov. QTL kartiranje in kartiranje pomembnih monogenskih lastnosti je še posebno pomembno ravno pri gospodarsko pomembnih kmetijskih rastlinah, kjer velikokrat povezujejo markerje z vertikalnimi tipi odpornosti na boleznimi ali škodljivci in drugimi agronomsko pomembnimi lastnostmi. Tako so npr. pri pšenici povezali mikrosatelite z različnimi *Rht* geni, odgovornimi za nizko rast (Korzun in sod., 1997; Börner in sod., 1997; Korzun in sod., 1998) in z *Dn* geni, odgovornimi za odpornost na uši (Liu in sod., 2001). Pri soji so odkrili QTL lokuse, ki so odgovorni za odpornost proti ogorčicam (Li in sod., 2001). Vezani markerji lahko predstavljajo neprecenljivo vrednost pri žlahtniteljskih programih (selekcija s pomočjo markerjev).

Mikrosateliti so zaradi svoje hipervariabilnosti (več alelov na lokus) idealno orodje za identifikacijo posameznikov. Tehnika je že postala rutinska pri sodno medicinskih analizah. S tega področja je gotovo najbolj znan primer identifikacija okostij zadnjega ruskega carja in njegove družine (Gill in sod., 1994). Mikrosateliti so se izkazali tudi pri identifikaciji različnih genotipov kmetijskih rastlin. Pri ječmenu so določili komplet 48-ih začetnih oligonukleotidov (izmed 600-ih, ki so trenutno na voljo) za ločevanje kultivarjev. Ti lokusi so izpolnjevali stroge kriterije dobrega pomnoževanja in visoke heterozigotnosti (Macaulay in sod., 2001). Pri krompirju sta bila dva lokusa dovolj za ločevanje 12-ih analiziranih kultivarjev (Ashkenazi in sod., 2001). Z mikrosatelitskim polimorfizmom je možno ločiti tudi kultivarje oljke (Bandelj in sod., 2002; Cipriani in sod., 2002). Pri raziskavah soje so lahko s sedmimi zelo polimorfnimi lokusi (do 26 alelov na lokus) ločili 95 od skupno 96 genotipov. Neločeni par genotipov je izhajal iz istih potomcev (93,4 % identičnost). Avtorji menijo, da bi za ločevanje genotipov s podobnimi rodovniki zadostovalo od 10 do 15 mikrosatelitskih lokusov (Rongwen in sod., 1995). Pri aktinidiji so lahko s polimorfizmom 8-ih lokusov ločili 6 ozko sorodnih kultivarjev, ki so po vsej verjetnosti izvirali celo iz potomstva ene rastline (Weising in sod., 1996). Z desetimi mikrosatelitskimi lokusi so lahko ločili tudi večino od 64-ih kultivarjev in podlag vinske trte (Sefc in sod., 1998a), metoda pa je uporabna tudi, če DNA izoliramo iz grozdja ali rozin (Sefc in sod., 1998b).

Mikrosateliti so uporabni tudi za ugotavljanje stopnje sorodnosti med posamezniki. Zaradi kodominantnega dedovanja in visoke stopnje polimorfizma so idealni za starševske analize in ugotavljanje sorodnosti. Tudi na tem področju humane genetike so postali že uveljavljeno analitsko orodje. Pri rastlinah pa so (npr. pri vinski trti) mikrosatelite dokaj uspešno uporabili pri rekonstrukciji rodovnika in določitvi domnevnih staršev (Sefc in

²³ Angl. Quantitative Trait Loci.

sod., 1998c; Meredith in sod., 1999), podobno pa tudi pri razreševanju homonimov in sinonimov povezanih z istim genotipom (Fossati in sod., 2001).

Mikrosateliti so postali tudi močno orodje populacijskih genetikov, ki so jih sprejeli za naslednike izoencimov. Tudi glavni del teorije in statistike, ki je bil prirejen za uporabo te zgodnejše metodologije, se lahko uporabi pri proučevanju mikrosatelitov.

Pri zgoraj navedenih primerih so bile natančneje opisane le glavne aplikacije mikrosatelitske tehnologije. Znanih je še kar nekaj primerov njihove uporabe, npr. za proučevanje somaklonalne variabilnosti ipd.

Mikrosateliti imajo večino lastnosti, za katere želimo, da jih ima optimalen marker (Weising in sod., 1998):

- (a) Mikrosateliti so zelo polimorfni in zaradi tega zelo informativni. Navzočnost velikega števila alelov na lokus je večja kot pri ostalih markerjih, ki so danes na voljo.
- (b) Dedujejo se kodominantno, kar nam omogoča ločevanje med homo- in heterozigotnimi organizmi.
- (c) Ločevanje fragmentov na sekvenčnem gelu omogoča natančno določevanje alelov.
- (d) Mikrosateliti so v vsakem evkariotskem organizmu navzoči v velikem številu.
- (e) Ponavadi so enakomerno razpršeni po celotnem genomu.
- (f) Večji delež mikrosatelitov se nahaja v nekodogeni DNA, zato niso podvrženi selekciji.
- (g) Zaradi pomnoževanja lokusov v reakciji PCR so potrebne le nanogramske količine DNA, poleg tega je možna avtomatizacija.
- (h) Pri ostrih pogojih pomnoževanja dobimo visoko ponovljivost rezultatov.
- (i) Informacije o začetnih oligonukleotidih in dolžinah alelov so primerljive med laboratoriji.

2.1.4.1 Medvrstno pomnoževanje mikrosatelitov

Glavna slabost uporabe mikrosatelitov je velik strošek, ki je potreben pri razvoju lokusno specifičnih markerjev, kar v določeni meri zavira njihovo uporabo pri študijah rastlin. Okvirni stroški in čas izdelave mikrosatelitskih markerjev so predstavljeni v preglednici 1.

Vsekakor bi se situacija popravila, če bi bile obrobne regije, na podlagi katerih izdelamo začetne oligonukleotide ohranjene med vrstami istega rodu ali celo znotraj iste družine. Tako bi se lahko isti začetni oligonukleotidi širše uporabljali pri sorodnih vrstah.

V začetku so pri štirih vrstah primatov uspešno pomnožili mikrosatelite z začetnimi oligonukleotidi, izbranimi na podlagi človekovega DNA zaporedja (Blanquer-Maumont in Crouau-Roy, 1995).

Preglednica 1: Stroški izdelave protokola in genomske knjižnice (v ameriških dolarjih), vložen čas in rezultat glede na različne tehnike izolacije mikrosatelitov (Zane in sod., 2002: 6).

Table 1: Isolation protocol developing costs, genomic library costs (in US dollars), time investment and yield compared among different techniques of microsatellite isolation (Zane *et al.*, 2002: 6).

Protokol ^a	Cena izdelave protokola ^b (\$)	Cena genomske knjižnice ^b (\$)	Čas ^c	Št. pozitivnih klonov
Klasičen	2000-4000	<400	1 mesec	Majhno
RAPD	1000	<100	1 teden	Različno
Podaljševanje začetnih oligonukleotidov	1000-4000	<400	2 tedna	Srednje / Veliko
Selektivna hibridizacija	1000-4000	<400	1-2 tedna	Srednje / Veliko
Servis ^d	/	5000-10000	Kratek	Veliko

^a Protokoli so opisani v poglavju 2.3 STRATEGIJE IZOLACIJE MIKROSATELITSKIH LOKUSOV.

^b Cena variira glede na državo in dobavitelja reagentov, cena je brez določevanja nukleotidnih zaporedij.

^c Povprečen čas, da dobimo pozitivne klone.

^d Komercialni ponudniki izdelave obogatenih mikrosatelitskih knjižnic.

Tudi pri rastlinah je vse več objav o možnostih medvrstne uporabe nekaterih mikrosatelitskih lokusov. Pri soji so opravili obsežno študijo uporabe 31 sojinih mikrosatelitov pri divjih sorodnikih in drugih rodovih znotraj družine metuljnic (Peakall in sod., 1998). Pri treh vrstah znotraj rodu je 20 začetnih oligonukleotidov uspešno pomnožilo fragmente pri vsaj eni vrsti, skupno pri vseh treh vrstah pa 15. Poleg sprememb v samem mikrosatelitu je določevanje nukleotidnega zaporedja alelov pokazalo tudi razlike v obrobni območjih. Torej dolžinski polimorfizem med vrstami ni samo posledica krajše ali daljše mikrosatelitske ponovitve, ampak tudi zaradi sprememb v obrobni regijah. O uspešnem medvrstnem pomnoževanju mikrosatelitskih lokusov so poročali še pri paradizniku, kjer so pomnožili lokuse pri različnih vrstah rodu *Lycopersicon* (Alvarez in sod., 2001), pri hruški, kjer so uspešno uporabili komplet markerjev izoliranih iz jabolane (Yamamoto in sod., 2001), in pri češnji, kjer je bilo možno uporabiti začetne oligonukleotide breskve (Wünsch in Hormaza, 2002). Tudi pri različnih vrstah bora so poročali o uspešnem medvrstnem pomnoževanju mikrosatelitskih lokusov (Shepherd in sod., 2002).

Pri medvrstnem pomnoževanju mikrosatelitov je potrebno omeniti še empirične ugotovitve, da so mikrosatelitski aleli odkriti v vrsti, iz katere so bili ti izolirani, povprečno daljši od alelov pomnoženih v sorodni vrsti. Po mnenju nekaterih avtorjev te ugotovitve nedvoumno kažejo na hitrejšo evolucijo mikrosatelitov v določenih vrstah, npr. pri človeku naj bi se mikrosateliti razvijali hitreje kot njihovi homologi pri primatih (Rubinsztein in sod., 1995). Alternativne razlage pa trdijo, da ima najpomembnejšo vlogo selekcijska pristranskost, ker novih mikrosatelitskih lokusov ne izoliramo z naključnim procesom, ampak so izbrani na podlagi čim daljšega motiva mikrosatelita v preiskovani vrsti. Zaradi tega bodo taki lokusi v sorodni vrsti imeli zagotovo krajše ponovitve. Zato avtorji predlagajo obojestransko analizo mikrosatelitov iz obeh preiskovanih vrst, kot so to

naredili npr. pri govedu in ovcah in ugotovili, da so mikrosateliti v vrsti iz katere so bili izolirani dejansko daljši (Ellegren in sod., 1997).

2.2 SPLOŠNO O HMELJU

V rodu *Humulus* so do sedaj opisali tri vrste: *H. lupulus* L., *H. japonicus* Sieb. et Zucc. in *H. yunnanensis* Small (Small, 1978). Divji hmelj, *H. lupulus*, se je prvotno razprostiral na severni polobli od 35° do 70° geografske zemljepisne širine (Neve, 1991). Glede na taksonomsko varieteto so predlagali naslednjo klasifikacijo divjega hmelja: var. *lupulus* za evropski divji hmelj, var. *cordiflorus* za japonski divji hmelj, kar tri varietete pa naj bi se pojavljale v Severni Ameriki: var. *neomexicanus* (severozahodna varieteta), var. *pubescens* (srednji zahod) in var. *lupuloides* (vzhodna varieteta) (Small, 1978).

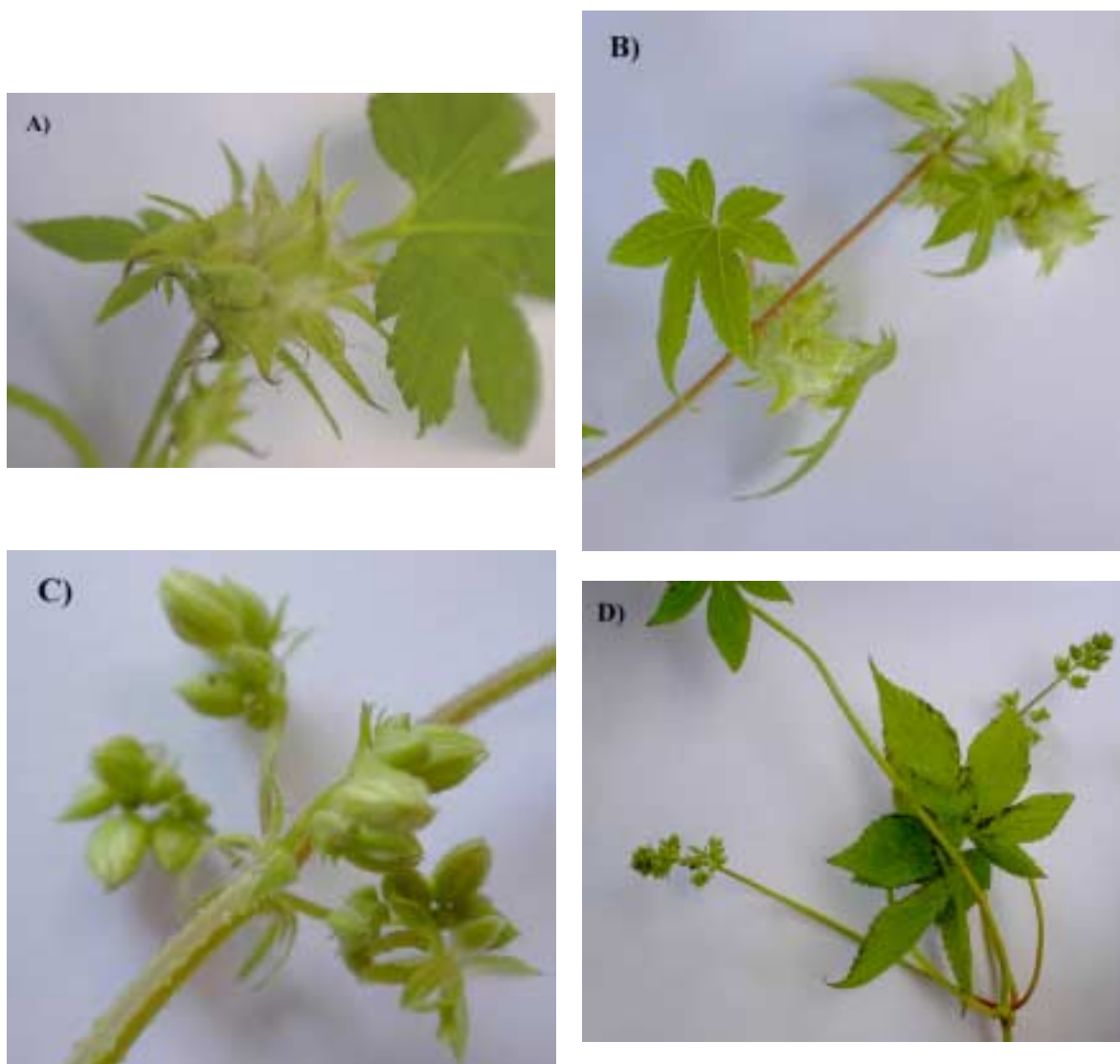
H. japonicus je razširjen na celotnem področju Kitajske in Japonske, drugje ga ne zasledimo. Je enoletnica²⁴ (slika 1), zanimiva predvsem kot okrasna rastlina. Je tudi dvodomna rastlina, storžki pa imajo le redko lupulinske žleze (Neve, 1991). Vrsta je tudi okarakterizirana s sistemom spolnih kromosomov. Ženske rastline imajo 16 kromosomov ($2n=14+XX$), medtem ko imajo moške rastline 17 kromosomov ($2n=14+XY_1Y_2$) (Shephard in sod., 2000).

O zadnji vrsti, *H. yunnanensis*, pa je znanega zelo malo. Nahajala naj bi se na višjih nadmorskih višinah v južnem predelu Kitajske, predvsem v provinci Yunnan. Obstajalo naj bi le nekaj herbarijskih rastlin, nič pa ni znanega o citoloških lastnostih vrste. Navzočnost vseh treh vrst na Kitajskem govori v prid domnevi, da je to področje center izvora rodu (Neve, 1991).

Rodova *Humulus* in *Cannabis* sta glede na klasično botanično sistematiko edina predstavnika družine konopljevok – *Cannabaceae*. Poročajo, da je mnogo podobnosti med hmeljem in konopljo (*Cannabis sativa*), saj je možno dobiti cepljenke hmelja na konoplji, prav tako pa naj bi oprašitev hmelja s cvetnim prahom konoplje ali kopriv (pripadajo istemu redu – *Urticales*) stimulirala razvoj storžkov, vendar embrio abortira v zgodnji fazi razvoja.

Hmelj, *H. lupulus*, je dvodomna trajna ovijalka, ki se ovija okoli opore v smeri urinega kazalca s pomočjo stebelnih trihomov. Nadzemni deli so enoletni in pričnejo spomladi odganjati iz korenike, ki je trajni podzemni del stebela. Pod koreniko se razvije koreninski sistem, ki lahko prodre do globine 1,5 m in 2-3 m v širino. Korenine ne tvorijo nadzemnih poganjkov, ti rastejo v velikem številu le iz podzemnega stebela, zato je spomladi nujno njihovo redčenje, da se doseže primerna gostota poganjkov v nasadu. Hmeljno steblo (trta) razvije liste, zalistnike in kompleksna socvetja. Rastlina lahko preseže 7 m višine, gojijo pa jo v zanjo posebej pripravljeni opori – hmeljni žičnici. Listi se razvijajo na vsakem nodiju in so ponavadi nasprotni.

²⁴ Literaturni podatki navajajo, da je vrsta enoletnica, vendar v naših klimatskih razmerah podzemni deli rastline prezimijo in spomladi ponovno odženejo (prof. dr. Anton Ivančič, mag. Andreja Čerenak, osebni vir).



Slika 1: (a) Žensko socvetje v času cvetenja, (b) cvetoči poganjek ženske rastline, (c) moško socvetje v času cvetenja in (d) cvetoči poganjek moške rastline japonskega hmelja, *H. japonicus*.

Figure 1: (a) Female inflorescence at anthesis, (b) a flowering shoot of a female plant, (c) male inflorescence at anthesis and (d) a flowering shoot of a male plant of Japanese hop, *H. japonicus*.

Imajo nazobčan listni rob, oblike pa so lahko srčaste, 7 krpate, najpogostejša pa je od 3 do 5 krpata oblika odraslega lista. Avtohtoni divji ameriški hmelj naj bi imel večkrpate in globlje razrezane liste kot divji evropski ali japonski hmelj in večina kultivarjev. Morfološke razlike med ženskimi in moškimi rastlinami so najbolj izrazite v generativnih organih. Moška socvetja so združena v grozdasta, racemozna socvetja. Cvetno odevalo rumenkasto zelene barve je iz petih venčnih listov. Cvet ima pet ožlebljenih prašnikov, ki proizvedejo velike količine cvetnega prahu. Ta je zelo lahek in suh, kar omogoča vetru, da ga lahko prenaša na zelo velike razdalje. V žlebovih pa je manjše število smolnih žlez. Ženski cvetovi so prav tako združeni v socvetje, ki je sestavljeno iz 40-60 posameznih cvetov, ki so nanizani na zbitem cikcakastem centralnem vretencu. Na vsakem nodiju

vretenca je par ovršnih lističev (braktej). Pod vsako braktejo je par predlistov (brakteol), ki obdajata vsak cvet. Ta je sestavljen iz perigona in pestiča. Perigon je neznatn in čašaste oblike in delno obdaja plodnico. Pestič ima razmeroma malo plodnico, zelo kratek vrat in dve dolgi, dlakavi brazdi (Ivančič, 2002). V začetku cvetenja so predlisti zakriti z ovršnimi listi, a se ti med razvojem hitro povečajo in postanejo vidni. Zrelemu socvetju se povečajo predlisti in ovršni listi, centralno vretenca pa se izdolži in kot tako predstavlja komercialni produkt rastline, ki ga imenujemo storžek. Hmelj je tujeprašnica, ki se oprahuje z vetrom. Oplojeni cvetovi razvijejo seme, katerega razvoj stimulira izdolževanje predlistov v večji meri kot se to zgodi pri neoplojenem cvetu. Močneje se tudi izdolži in odebeli centralno vretenca. Ti znaki omogočajo hitro vizuelno ločevanje semenskih in brezsemenskih storžkov.

Komercialno vrednost hmelja predstavljajo lupulinske žleze storžkov, ki vsebujejo smole, eterična olja, tanine in še nekatere druge snovi. Te komponente vplivajo na grenčico piva, njegov okus in ga konzervirajo. Še vedno pa ni jasno, kdaj so pričeli uporabljati hmelj pri varjenju piva, čeprav obstajajo podatki o gojenju hmelja v Babilonu, opisuje ga Plinij (23-79 n.š.) in znani so zapiski o hmeljnih vrtovih v okolici samostanov v 8., 9., in 10. st., ki pa se je verjetno kot mnoga druga zelišča uporabljal zgolj v medicinske namene. Šele iz leta 1079 obstaja zapisek o uporabi hmelja pri varjenju piva skupaj s skrivnostno mešanico zelišč ("grug"), mirtinimi jagodami in jerebikinimi listi (Moir, 2000).

Različni genotipi se močno razlikujejo v številu in velikosti žlez pri storžkih. Lupulin lahko predstavlja od 15 do 32 % teže sterilnega storžka, razvoj semena pa ta delež zmanjša, zato je oploditev nezaželena (Šuštar, 1992).

2.2.1 Morfološki znaki uporabljeni v identifikacijske namene

Kultivarje hmelja je možno ločiti po njihovih morfoloških lastnostih. Pri tem mislimo na lastnosti, katere je razmeroma lahko določiti in na katere ima okolje omejen vpliv. Celotno rastlino je potrebno opazovati v več letih pridelovanja, predvsem zaradi variabilnosti fenotipskih znakov med leti. Najpomembnejše lastnosti za genotipsko diferenciacijo so: (a) oblika in zraščanost rastline (ki je odvisna od debeline trte, dolžine in položaja zalistnikov, olistanosti, velikosti listov in razporeditve storžkov po rastlini), (b) barva trte, (c) zobatost, krpatost, oblika, velikost, drža in barva listov, (d) oblika, velikost in barva storžkov ter število, oblika, velikost in razporeditev krovnih lističev na vretencu, (e) plastičnost in (f) občutljivost sort na posamezne bolezni (Kralj, 1962; Kralj, 1964).

2.2.2 Citološke študije hmelja

H. lupulus ima v diploidnem stanju pri obeh spolih 20 kromosomov. Najdetaljnija morfološka študija kromosomov je bila opravljena že pred več kot 40-imi leti. V njej so razdelili kromosome kultiviranih evropskih, ameriških in japonskih hmeljev v tri glavne skupine glede na pozicije centromer. Vsi kariotipi so si bili podobni in niso odkrili razlik glede na geografsko poreklo hmelja (Haunold, 1991). V preteklosti so bili predmet

intenzivnih raziskav tudi spolni kromosomi pri hmelju. Ločeni spoli še ne pomenijo, da je ta lastnost zasnovana na navzočnosti določenih spolnih kromosomov. O pravih spolnih kromosomih govorimo le tedaj, ko ti predstavljajo poseben par ali skupino kromosomov, ki se po strukturi in funkciji loči od ostalih avtosomov (Sušnik, 1967). Opisanih je bilo pet tipov spolnih kromosomov z razlikami v dolžinah večjega X in manjšega Y kromosoma. V mejozi moških rastlin so odkrili originalen tip z razmerjem X:Y okrog 2:1 (Winge tip), tip z razmerjem 1,25:1 (New Winge tip) in homomorfen tip z enakim dolžinskim razmerjem X in Y kromosomom. Pri japonskih moških rastlinah so odkrili kvadrivalentno formacijo spolnih kromosomov v razmerju 14:12:10:7 (Sinoto tip) in z razmerjem 13:11:10:3 (New Sinoto tip). Pri japonskih genotipih so poročali tudi o povezavi šestih kromosomov, od katerih naj bi bil vsaj en par avtosomov. Haunold (1991) je zelo kritičen do teh trditev, saj v svojem dolgotrajnem citološkem delu ni nikoli našel ponovljivih dokazov o obstoju heteromornega para kromosomov pri moških genotipih. Zgoraj opisano klasifikacijo spolnih kromosomov so v nadaljevanju raziskovalci potrdili le delno. Potrdili so obstoj heteromornega tipa v evropskih moških akcesijah hmelja, ki pa je bil bolj intermediarni tip med Winge in New Winge tipom z dolžinskim razmerjem X:Y okrog 1,5:1. Tudi pri skupini japonskih divjih hmeljev klasifikacije Sinoto ali New Sinoto niso potrdili, saj so odkrili tip z razmerjem 16:15:14:13. Pri ameriških akcesijah pa so potrdili homomorfno obliko spolnih kromosomov (Shephard in sod., 2000).

Tudi razmerje spola potomcev diploidnega križanja bi bilo po pričakovanju 1:1 pri XX (ženski genotip) in XY (moški genotip) tipu spolnega dedovanja. Vendar je to razmerje pri hmelju vedno v prid ženskim genotipom. Problematiko je obdelal v svojem doktoratu Neve (1961). Pri večini proučevanih družin križancev je bilo razmerje ženskih in moških rastlin okoli 2:1, če pa je bil eden izmed staršev predstavnik žateške skupine hmelja, je bilo razmerje celo 4:1. Boljša razmerja istih družin je dobil pri tretiranju semen, kar je izboljšalo odstotek kalivosti. Po njegovem je glavni razlog porušenega razmerja v tekmovalnosti peloda na brazdi pestiča. Partenogeneza je izključena, saj izolirni cvetovi ne nastavijo semena.

Citološka študija s pomočjo sodobne tehnike pretočne citometrije je omogočila hitro in nedvoumno ločevanje triploidnih anevploidov hmelja, ki so imeli 29 ali 30 kromosomov (Šesek in sod., 2000).

2.2.3 Aromatične snovi hmelja

Aktivne aromatične snovi hmelja, ki so pomembne za pivovarja, se izločajo v lupulinskih žlezah ženskega socvetja. Delimo jih v tri glavne skupine: hmeljne smole, eterična olja in polifenolne spojine (Zupanec, 1991).

Hmeljne smole so najpomembnejša skupina aromatičnih spojin hmelja, ki jih do sedaj niso odkrili pri nobeni drugi rastlini. Glede na topnost v različnih organskih topilih jih delimo v dve skupini (Haunold in sod., 1977; Neve, 1991; Košir, 1995):

- (a) Mehke smole so za pivovarja najpomembnejše. Sestavljene so iz α -kislina (humulon in analogi), ki so glavni izvor grenčice v pivu, in β -kislina (lupulon in analogi), ki pa so zaradi slabe topnosti manj pomembne. Nekateri menijo, da je pomemben pokazatelj kvalitete kultivarja razmerje med α - in β -kislina. α -kislina so derivati 1,3,5-trihidroksi benzena oz. njegove tautomerne oblike, cikloheksan 1,3,5-triona, ki imajo na četrti in šesti ogljikov atom vezane izopentenilne skupine, med seboj pa se razlikujejo v radikalu, ki je vezan na drugi ogljikov atom. Glede na vsebnost α -kislina delimo hmeljne kultivarje na aromatične (do 7 %), grenčične (nad 7 %) in super α -kultivarje (nad 9 %) (Šuštar-Vozlič, 1996).
- (b) Trde smole nastanejo kot oksidacijski produkti mehkih smol in so brez pivovarske vrednosti.

Eterična olja so druga pomembna skupina aromatičnih spojin, ki tudi nastanejo v lupulinskih žlezah. Predstavljajo od 0,5 do 1,5 % teže suhih storžkov in dajejo pivu vonj in okus. Do sedaj so v hmeljnem eteričnem olju odkrili preko 200 različnih spojin, ki jih delijo v tri glavne skupine (Neve, 1991):

- (a) Terpeni, ki predstavljajo glavni del eteričnih olj večine kultivarjev, so zelo nestabilni in le nekaj jih po vrenju ostane. Glavni ogljikovodiki so: monoterpen (C_{10}) mircen in seskviterpena (C_{15}) kariofilen in humulen. Ostale seskviterpene, kot npr. farnezen in β -selinen, najdemo samo v nekaterih kultivarjih. Ugotovili so, da je razmerje med humulenom in kariofilenom ter humulenom in selinenom karakteristična lastnost kultivarjev, ki se lahko uporablja v identifikacijske namene.
- (b) Oksigenirani derivati, ki lahko nastanejo tudi med skladiščenjem iz terpenov z adicijo kisika na dvojne ogljikove vezi. Tako nastale komponente pa imenujemo ciklični epoksidi. Med varjenjem piva se ti lahko pretvorijo v alkohole.
- (c) Spojine, ki vsebujejo žveplo, so navzoče le v sledovih, imajo pa lahko pomemben vpliv na aromo in okus piva. Za zatiranje pepelaste plesni v hmeljiščih se uporablja elementarno žveplo, kar lahko spremeni spekter žveplastih spojin v eteričnem olju. Tako lahko seskviterpena kariofilen in humulen reagirata z elementarnim žveplom, nastanejo pa episulfidi (kot pri oksigeniranih derivatih, le da je kisik zamenjan z žveplom). Eterično olje vsebuje še polisulfide in tioestre.

Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu so razvili metodo, ki na podlagi 31-ih deskriptorjev (komponent eteričnega olja) loči 95 svetovnih kultivarjev v 14 oljnih skupin (Kralj in sod., 1991).

Hmeljne polifenolne spojine – tanini – se med varjenjem vežejo z beljakovinami, jih oborijo in imajo pozitiven vpliv na okus piva, stabilizirajo grenčico in povečajo stabilnost piva ter pene (Košir, 1995). Najbolj reaktivna skupina polifenolov so proantocianidini, sestavljeni iz katehinskih enot, npr. procianidin B-3 iz dveh enot, procianidin C-3 pa iz treh (Neve, 1991).

2.2.4 Molekularne študije genoma hmelja

Molekularne študije genoma hmelja so v zadnjih letih postale intenzivnejše, vendar se ne morejo primerjati s podobnimi študijami drugih pomembnih kmetijskih rastlin. Razlog je gotovo tudi v upadanju deleža kmetijskih površin, posajenih s hmeljem in zaradi sprememb v tehnologiji varjenja piva.

2.2.4.1 DNA markerji

Največ del do sedaj je bilo objavljenih s področja uporabe tehnike naključno pomnožene polimorfne DNA (RAPD) (Williams in sod., 1990; Welsh in McClelland, 1990), ki je enostavnejši markerski sistem, saj ne zahteva predhodnega poznavanja DNA zaporedja in le nanogramske količine vhodne DNA matrice. Tehniko so uporabljali predvsem za študije genetske variabilnosti in identifikacijo kultivarjev, se pa sedaj vse manj uporablja zaradi nekaterih slabih lastnosti (npr. dominantnost markerjev in slaba ponovljivost), ki so jih popravili sodobnejši markerski sistemi (npr. AFLP).

Abbotova in Fedelejeva (1994) sta uporabili RAPD polimorfizem za potrebe identifikacije sadilnega materiala. Razvili sta sistem identifikacije sedmih kultivarjev, ki so si bili zelo podobni po morfoloških znakih in jih kot mlade rastline niso mogli ločiti, s kemičnimi analizami storžkov pa so bili lahko razpoznavni. Na podlagi elektroforetskih profilov, dobljenih s preko 100 začetnimi oligonukleotidi, sta objavili sistem treh začetnih oligonukleotidov, ki so omogočili diferenciacijo vseh 7 kultivarjev. Tudi naša raziskovalna skupina je demonstrirala uspešnost uporabe RAPD markerjev pri identifikaciji 12-ih slovenskih kultivarjev hmelja s kombinacijo 5-ih začetnih oligonukleotidov (Jakše in sod., 1994). S štirimi RAPD začetnimi oligonukleotidi so uspešno identificirali češke kultivarje hmelja (Patzak in sod., 1999). Pillay in Kenny (1996a) sta poročala o nizki stopnji odkritih polimorfizmov z RAPD tehniko. Izmed 60 uporabljenih začetnih oligonukleotidov jih je samo 8 pokazalo polimorfizme med 24-imi hmeljnimi genotipi. Sta pa v isti raziskavi ugotovila, da se pri 182-ih F_1 potomcih RAPD markerji dedujejo po Mendlovih pravilih in da so stabilni in uporabni za gensko kartiranje. Poizkusili so tudi odkriti korelacije med RAPD polimorfizmi, fenotipskimi vrednostmi glavnih kemičnih komponent lupulinskih žlez in določiti genetsko variabilnost glavnih kultivarjev hmelja. Metoda bi omogočala odbiro rastlin v juvenilnem stadiju pred začetkom razvoja (Murakami, 2000a; Murakami, 2000b). Študija Šuštar-Vozličeve in Javornikove (1999) je do sedaj najboljše analiza genetske variabilnosti hmelja z RAPD markerji. V analizo je bilo vključenih 68 svetovnih kultivarjev hmelja, elektroforetski profili pa so bili pomnoženi z 28-imi polimorfnimi začetnimi oligonukleotidi. Z razvrstitvijo kultivarjev v skupine sta dobili dobro ujemanje skupin z rodovniškimi podatki, prav tako pa sta ločili genotipe na evropske in ameriške, kar se ujema s tezo o dveh geografsko in genetsko ločenih skupinah hmelja.

Polimorfnim RAPD markerjem so tudi določili nukleotidno zaporedje in na podlagi tega določili specifične začetne oligonukleotide (STS²⁵ markerji) za uporabo pri identifikaciji kultivarjev. Tako so raziskovalci japonske pivovarne (Araki in sod., 1998) izdelali specifične začetne oligonukleotide in s petimi pari uspešno ločili 11 analiziranih kultivarjev. Prav tako so z njimi zaznali primesi drugega kultivarja v mešanici storžkov, medtem ko z dekamernimi (RAPD) začetnimi oligonukleotidi primesi niso uspeli ugotoviti. Rezultati naše skupine pri detekciji mešanic storžkov pa kažejo na uporabnost RAPD markerjev, saj smo edino z njimi, poleg preizkušenih mikrosatelitskih in STS markerjev, zaznali 5% primesi v vzorcu (Jakše in Javornik, 1999). V drugi študiji (Brady in sod., 1996) pa specifični začetni oligonukleotidi, izdelani na podlagi nukleotidnega zaporedja polimorfnega RAPD fragmenta, niso bili uporabni za ločevanje kultivarjev, saj so se pri vseh pomnožili fragmenti enake dolžine. Po njihovem mnenju nek pomnožen fragment še ne pomeni, da je specifičen za določen kultivar. S pomočjo RAPD polimorfizma so našli tudi moško specifičen marker, s katerim je možno ločevanje sejancov in ni potrebno čakati leto do dve, da se na rastlini razvijejo generativni organi (Polley in sod., 1997). Na podlagi polimorfizma 900-ih RAPD elektroforetskih profilov pri moških in ženskih žlahtniteljskih linijah so našli tri začetne oligonukleotide, s katerimi so pri vseh moških genotipih pomnožili fragment, ki pa ni bil navzoč pri ženskih rastlinah. Eden izmed njih v genomu hmelja ni bil velikokrat ponovljiv in primeren za pretvorbo v STS marker. Z omenjenim markerjem so uspešno analizirali 770 potomcev treh križanj in v 17-ih primerih se rezultati molekularne analize niso skladali s fenotipskimi opazovanji (Patzak in sod., 2002). Po prepričanju avtorjev je marker še vedno dovolj zanesljiv za uporabo pri žlahtnjenju. Vendar pa po rezultatih naše raziskovalne skupine marker ni uporaben pri detekciji spola ameriško-azijskih hmeljnih genotipov. (Čerenak in Javornik, 1999).

Za analizo hmeljnega genoma so uporabljali tudi jedrno ribosomsko DNA in nekatere regije kloroplastne DNA. V začetku so za študije ribosomske DNA uporabili RFLP polimorfizme. (Pillay in Kenny, 1996b). Odkrila sta nizko stopnjo polimorfizma v jedrni ribosomski DNA (rDNA) in tri vrste fenotipov, eden je bil specifičen za evropske genotipe, drugi za ameriške, tretji fenotip pa je bil značilen za hibride med evropskimi in ameriški genotipi. Do enakih ugotovitev o obstoju treh fenotipov na podlagi določanja nukleotidnega zaporedja rDNA je prišel tudi Murakami (2001). V celotnem zaporedju je odkril tri tipe ponovitev, katerih spremenljivo število predstavlja variabilen znak. Isti avtor (Murakami, 2000c) je proučeval tudi spremenljivost nukleotidnega zaporedja predelov kodogenih in nekodogenih regij kloroplastne DNA in genomske ITS2²⁶ regije (notranje prepisane regije) pri kultivarjih hmelja, divjih akcesijah in pri sorodni vrsti *H. japonicus*. Znotraj vrste *H. lupulus* je odkril ohranjeno DNA zaporedje z vsega skupaj 6-imi zamenjanimi nukleotidi pri kloroplastni DNA, ITS2 regija pa je bila povsem identična pri vseh proučevanih akcesijah. Med vrstama pa je odkril 24 nukleotidnih zamenjav pri ITS2 regiji in 22 zamenjav pri kloroplastni regiji.

²⁵ Angl. Sequence Tagged Sites.

²⁶ Angl. Internal Transcribed Spacer.

Primernost uporabe markerjev AFLP za vrednotenje genetske variabilnosti osmih kultivarjev hmelja sta dokazala Hartl in Seefelder (1998). Kot alternativo radioaktivni detekciji sta uporabila fluorescentno označene začetne oligonukleotide. Z osmimi kombinacijami E- in M-začetnih oligonukleotidov sta dobila 145 polimorfni fragmentov, vendar je bila genetska variabilnost analiziranih genotipov majhna, prav tako pa nista uspela ločit treh od osmih analiziranih kultivarjev. Za potrebe identifikacije hmeljne DNA izolirane iz storžkov so uspešno izdelali fluorescenten AFLP protokol (Townsend in sod., 2000). Preizkusili so 11 kombinacij začetnih oligonukleotidov in povprečno pomnožili 50 fragmentov pri paru. Z metodo so uspešno ločili 6 analiziranih kultivarjev hmelja. AFLP tehniko so tudi uspešno uporabili pri študiji genetske variabilnosti 90-ih kultivarjev hmelja (Seefelder in sod., 2000a). Akcesije so razvrstili v skupine glede na uporabo in geografsko pripadnost. V naši študiji smo 41 akcesij hmelja analizirali z neradioaktivno AFLP tehniko z 8-imi kombinacijami začetnih oligonukleotidov, kjer smo povprečno določili 45 fragmentov pri posameznem paru (Jakše in sod. 2001). Dendrogram izdelan na podlagi AFLP polimorfizmov je dobro ločil analizirane hmeljne akcesije glede na poreklo in geografsko razdelitev.

Pri hmelju je do sedaj objavljeno le eno delo s področja izolacije mikrosatelitov (Brady in sod., 1996). Genomsko knjižnico hmelja so hibridizirali z 8-imi različnimi mikrosatelitskimi sondami: dvema dinukleotidnima, štirimi trinukleotidnimi in dvema tetranukleotidnima. Od skupno 47-ih pozitivnih kolonij, ki so jim določili nukleotidno zaporedje, so lahko izdelali 17 začetnih oligonukleotidov, od katerih so samo štirje uspešno pomnožili fragmente v PCR ali pa pokazali polimorfizem pri 34-ih analiziranih hmeljnih genotipih. Z njimi so skupno odkrili 27 alelov. V naši študiji smo pri 69-ih analiziranih akcesijah hmelja z istimi pari začetnih oligonukleotidov pomnožili 32 različnih alelov in z analizo potomstva potrdili obstoj dodatnega monomorfne lokusa z ničtim alelom (Jakše in sod, 2001). V nadaljni analizi večjega števila akcesij (140) se je število odkritih alelov dvignilo na 64 (Jakše, neobjavljeno). Uporabnost mikrosatelitskih markerjev pa se je pokazala pri izdelavi prve genske karte hmelja (Seefelder, 2000b). Izdelali so jo na podlagi 217-ih AFLP, 4-ih RAPD in treh mikrosatelitskih polimorfizmov. Edino kodominantni mikrosatelitski markerji so predstavljali zanesljive povezovalce med ženskim in moškim delom karte.

2.2.4.2 Študije genov hmelja

Znano je, da lupulinske žleze hmelja vsebujejo veliko različnih substanc, katerih sestava se delno spreminja med zorenjem in predelavo hmelja. Nedavno so v lupulinski frakciji natančno določili flavonoide (Stevens in sod., 1997) in tudi halkone (Etteldorf in sod., 1999). Vse več je tudi študij in poročil o pozitivnih zdravstvenih učinkih hmelja in njegovih ekstraktov. Pri hmeljnih smolah so dokazali mehanizem delovanja na bakterije, ki lahko pokvarijo pivo, ker delujejo kot prenašalci ionov preko membrane in s tem inhibirajo prenos hranilnih snovi v celico (Simpson in Smith, 1992; Simpson, 1993). Določeni antimikrobni učinki so bili dokazani tudi pri eteričnih oljih hmelja (Langezaal in sod.,

1992). Pri flavonoidnih substancah pa so dokazali antiproliferativne učinke in jih preiskujejo kot možne substance v boju proti raku (Miranda in sod., 1999; Henderson in sod., 2000). Vzporedno pa tudi odkrivajo in potrjujejo obstoj biokemičnih poti (Zuurbier in sod., 1998) in encimov (Paniego in sod., 1999), ki vodijo do posameznih intermediatov hmeljnih smol.

Na podlagi teh dognanj so do sedaj izolirali dva gena, odgovorna za sintezo hmeljnih aromatskih spojin, gen za valerofenon sintazo (VPS) (Okada in Ito, 2001) in gen za halkan sinatzo (CHS) (Matoušek in sod., 2002). Prva dva avtorja sta za izolacijo gena predpostavljala tkivno specifično izražanje gena v lupulinskih žlezah in pripravila subtrakcijo lupulinske in nelupulinske frakcije cDNA. Ostanek sta uporabila kot lupulinsko specifične sonde za pregled knjižnice. Odkriti gen je dolg 1185 nukleotidov (394 aminokislin (AK)) in kaže homologijo s CHS genom. Gen sta izrazila v *in vitro* pogojih in zaznala valerofenon sintazno aktivnost proteina. CHS gen pa so odkrili s primerjavo homologov gena iz ostalih rastlin, izdelali so začetne oligonukleotide v ohranjenih delih genov in pomnožili del gena iz hmelja. V naslednjih postopkih so izolirali celoten gen s promotorsko regijo. Gen ima dva eksona in 187 bp dolg intron. Dokazali so, da se najmočneje izraža v cvetnih delih hmeljne rastline. Nadaljne RFLP študije z uporabo CHS gena kot sonde so dokazale obstoj CHS multigenske družine pri hmelju.

2.3 STRATEGIJE IZOLACIJE MIKROSATELITSKIH LOKUSOV

V zadnjih nekaj letih so postali mikrosateliti eden izmed najbolj popularnih markerskih sistemov z možnostjo uporabe v različnih področjih. Zaradi dobrih lastnosti kot so relativno lahka detekcija, interpretacija rezultatov in visok polimorfizem jih veliko uporabljajo v različnih genetskih študijah. Glavni dejavnik, ki pa močno omejuje njihovo uporabo, je dejstvo, da morajo biti izolirani na novo iz vrste, ki se prvič proučuje. V začetku so mikrosatelite izolirali s pregledom velikega števila klonov genomskih knjižnic, sedaj pa večina avtorjev uporablja različne tehnike obogatitve, ki povečajo delež DNA fragmentov, ki vsebujejo mikrosatelitsko ponovitev. Pregled teh tehnik je predstavljen v nadaljevanju.

2.3.1 Tradicionalne metode izolacije mikrosatelitov

Tem metodam je skupna izdelava delne genomske knjižnice (DNA fragmenti izbrani v željenem območju) preiskovanega organizma, kloniranje in hibridizacijsko preverjanje velikega števila rekombinantnih klonov (npr. Brady in sod., 1996). Visoko molekularno genomsko DNA razcepijo z RE ali redkeje mehansko (npr. ultrazvok). Fragmente DNA nato ločijo z agarozno gelsko elektroforezo in izolirajo fragmente dolžin v območju 200-800 bp. Odvisno od načina cepitve DNA se potem izbere tip ligacije v plazmidni ali fagni vektor ali pa se predhodno na konce fragmentov z linkerji vnese določena restriksijska mesta, ki omogočajo lažje kloniranje. V koraku ligacije se pojavi največ težav pri izdelavi, kar se pokaže v nizkem številu transformantov ali pa v nastanku medseboj ligiranih DNA molekul. Po ligaciji transformiramo bakterije s produkti ligacije in ponavadi dobimo na tisoče rekombinantnih kolonij. Te preslikamo na membrano in nato v postopku Southern

hibridizacije preverimo, če vsebujejo mikrosatelitske inserte. Hibridizacijske sonde lahko omogočajo radioaktivno (P^{32} , P^{33}) ali neradioaktivno (npr. biotin, digoksinin, alkalna fosfataza) detekcijo. V zadnjih letih je postala občutljivost neradioaktivnih metod povsem primerljiva z radioaktivno detekcijo, omogočajo pa daljše shranjevanje sond (ni razpolovne dobe) in ne zahtevajo posebnega laboratorijskega prostora. Po določitvi zaporedja klonov z mikrosatelitskimi inserti napravijo par specifičnih začetnih oligonukleotidov, temu pa sledi optimizacija pomnoževanja posameznih mikrosatelitskih lokusov na različnih posameznikih ali populaciji.

Metoda je sorazmerno preprosta, saj uporablja standardne tehnike rekombinantne DNA, se pa izkaže, da postane izredno težavna in neučinkovita za vrste z nizkim deležem mikrosatelitskih ponovitev v genomu. Zaradi tega so razvili razne alternativne strategije izolacije mikrosatelitskih lokusov, da bi zmanjšali čas izolacije lokusov, ali da bi znatno povečali njihov delež. Te metode so opisane v nadaljevanju.

2.3.2 Novejše strategije izolacije mikrosatelitskih lokusov

V zadnjem desetletju so raziskovalci razvili mnogo metod, ki izključujejo klasično izdelavo genomske knjižnice ali hibridizacijsko preverjanje rekombinantnih klonov in nekatere močno povečajo (obogatijo) delež mikrosatelitskih klonov v knjižnici. V nadaljevanju so tehnike razdeljene glede na metodološki pristop k izolaciji.

2.3.2.1 Postopki izolacije brez izdelave genomske knjižnice

Modifikacija klasične izdelave knjižnice, ki preskoči cepitev in selekcijo DNA fragmentov, temelji na pomnoževanju DNA z večjim številom RAPD začetnih oligonukleotidov²⁷ (Lunt in sod., 1999). Tako se pomnožijo naključni fragmenti iz preiskovanega organizma. DNA fragmenti se vstavijo v T-vektor (Marchuk in sod., 1991), ki omogoča enostavno kloniranje PCR produktov. Avtorji so namesto hibridizacijskega pristopa k pregledu rekombinantnih klonov uporabili pomnoževanje insertov v PCR z vektorsko in mikrosatelitsko specifičnima začetnima oligonukleotidoma. Tako dobimo informacijo o prisotnosti mikrosatelitskega zaporedja v insertu in o dolžini obrobni regij. Na podlagi teh rezultatov se lahko pred določevanjem nukleotidnega zaporedja odločimo, ali je klon primeren za izdelavo začetnih oligonukleotidov (Waldbieser, 1995). Ta in njej podobne tehnike (Ender in sod., 1999) temeljijo na podatkih, da RAPD fragmenti vsebujejo mikrosatelitska zaporedja pogosteje kot naključni genomski fragmenti (Cifarelli in sod., 1995; Richardson in sod., 1995).

Ostale PCR strategije, ki preskočijo izdelavo genomske knjižnice, temeljijo na pomnoževanju mikrosatelitskih lokusov s sidrnimi²⁸ začetnimi oligonukleotidi in določevanju zaporedja pomnoženih fragmentov. Prva metoda omogoča izolacijo 3' konca obrobne regije mikrosatelitskega lokusa (Fisher in sod., 1996), medtem ko je možno z

²⁷ Angl. PCR isolation of microsatellite arrays – PIMA.

²⁸ Angl. anchored.

drugo metodo izolirati obe obrobni regiji mikrosatelitskega lokusa (Lench in sod., 1996). Protokol temelječ na PCR izolaciji obrobni zaporedij mikrosatelitskih lokusov so opisali Grist in sod. (1993). Z njim najprej določimo eno obrobno regijo, napravimo specifičen začetni oligonukleotid in v PCR izoliramo nato še drugo obrobno regijo. Opisani postopek je zaradi dvojne izolacije obrobni regij precej zamuden, avtorjem pa je uspelo izolirati le štiri lokuse. Metodi, ki sta ju razvila Hayden in Sharp (2001a; 2001b), uporabljata zanimiv pristop pri izolaciji mikrosatelitskih lokusov. Prva metoda (Hayden in Sharp, 2001a) temelji na kombinaciji metode SAMPL (Witsenboer in sod., 1997; Kuiper in sod., 1999) in metode Fisherja in sod. (1996). V tem postopku se po določitvi nukleotidnega zaporedja pomnoženega fragmenta izdelava le en začetni oligonukleotid, medtem ko ima drug degeneriran sidrni kod z mikrosatelitskim zaporedjem. Druga metoda (Hayden in Sharp, 2001b) pa omogoča izolacijo zaporedij dolgih 16 bp, ki jih zligiramo skupaj in celo do 50-im v eni sekvenčni reakciji določimo nukleotidno zaporedje. Na podlagi tega zaporedja lahko izdelamo specifičen začetni oligonukleotid za pomnoževanje v PCR skupaj s sidrnim začetnim oligonukleotidom.

Opisane metode zagotovo predstavljajo hitrejšo izvedbo izolacije mikrosatelitskih lokusov, vendar je sodeč po številu nadaljnih citiranj njihova uporaba ostala omejena na raziskovalne skupine, ki so jih iznašle.

2.3.2.2 Metoda podaljševanja začetnega oligonukleotida

Do sedaj sta bili opisani dve metodi, katerih izolacija mikrosatelitskih lokusov temelji na podaljševanju začetnega oligonukleotida (Ostrander in sod., 1992; Paetkau 1999). Obema metodama je skupna izdelava prve genomske knjižnice iz fragmentirane DNA raziskovanega organizma v fagnem ali fagemidnem vektorju, ki omogočata izolacijo enoverižne DNA molekule (ssDNA). Enoverižna DNA potem služi kot matrica v reakciji podaljševanja začetnega oligonukleotida, ki vsebuje mikrosatelitsko ponovitev. Do reakcije pride le na maticah (vektorjih), ki vsebujejo mikrosatelit, tako da dobimo dvoverižno obliko vektorja. V nadaljnih korakih uporabe dvoverižnega produkta pa se metodi nekoliko razlikujeta.

V metodi Ostranderja in sod. (1992) so transformirali mešanico dvoverižnih in enoverižnih molekul v bakterijske celice z normalnim genotipom. Predhodno so prvo knjižnico napravili v bakterijskih celicah z okvarjenima genoma (*dut-*, *ung-*), zaradi česar je vektorska DNA vsebovala uracil namesto timina. Bakterije z delujočima genoma so po transformaciji razgradile ssDNA z vgrajenim uracilom z encimom uracil-N-glikozilazo (*ung+*). Tako so razgradile vse fagemide brez mikrosatelita, kjer pa je bil prisoten mikrosatelit, je bila ena vijačnica v normalnem stanju (podaljšana v reakciji) in je tak vektor ostal v bakteriji. Tako so dobili knjižnico obogateno z mikrosatelitskimi inserti. Avtorji poročajo o 40-50 % klonov, ki so vsebovali (CA)_n ponovitev.

Drugi protokol (Paetkau, 1999) pa pri podaljševanju predvideva uporabo začetnega oligonukleotida, ki ima na 5'-koncu pritrjeno biotinsko molekulo. V reakciji podaljševanja

so uporabili Klenow encim. Tako so bili vsi fagi, ki so vsebovali mikrosatelit, označeni z biotinsko molekulo. Ta je omogočala vezavo fragmentov na s streptavidinom prekrute magnetne delce v procesu lovljenja, kjer so odstranili vse neoznačene enoverižne molekule. Ulovljene molekule so sprali z magnetnega kompleksa (denaturirali), še enkrat prevedli v dvoverižne in transformirali v bakterije. V dinukleotidni (AC)_n knjižnici samo en od 38-ih klonov ni vseboval mikrosatelitskega zaporedja. V tetranukleotidni knjižnici pa je avtor poročal o le nekaj klonih, ki so vsebovali nizko število ponovitev.

Metoda Ostranderja in sod. (1992) je v literaturi citiran 126-krat²⁹, Paetkaua (1999) pa 10-krat²⁹, vendar le pri opisu metod izdelave obogatene knjižnice. Citatov, na podlagi katerih bi s pomočjo teh tehnik izdelali knjižnico nismo zasledili.

2.3.2.3 Metode selektivne hibridizacije

Metode razvrščene v to skupino so po tehnološki plati razmeroma nezahtevne za izvajanje in do sedaj tudi največkrat uporabljene pri izolaciji mikrosatelitov iz raznovrstnih organizmov; od vretenčarjev do rastlin. Bile so preizkušene in tudi dale zadovoljive rezultate pri izolaciji di-, tri- in tetranukleotidnih mikrosatelitskih ponovitev. Prvotni protokoli (Karagyzov in sod., 1993; Armour in sod., 1994; Kijas in sod., 1994) so vsi detaljno izdelani in opisani, vendar je na voljo mnogo kasnejših modifikacij, ki izboljšujejo ali odstranjujejo nepotrebne korake (npr. Cordeiro in sod., 1999; Scott in sod., 1999). V teh študijah znaša stopnja obogatitve (delež klonov z mikrosatelitskim insertom v knjižnici) 20-95 %. Ti protokoli so tako uspešni, da lahko v primeru dinukleotidnih ponovitev in organizmov z visokim deležem mikrosatelitov v genomu dosežemo izredno visoko stopnjo obogatitve. V tem primeru ni več potrebno hibridizacijsko preverjanje klonov, ampak jim nekateri avtorji direktno določajo nukleotidno zaporedje.

Enako kot pri tradicionalnih metodah je prvi korak razrez genomske DNA na krajše fragmente, katerih dolžina omogoča uspešno kloniranje v vektor. Pri izdelavi mikrosatelitske knjižnice pa je zaželeno, da so ti fragmenti krajši od 1000 bp, kar nam omogoča določevanje nukleotidnega zaporedja v eni ali dveh reakcijah, brez potrebe po izdelavi vmesnih začetnih oligonukleotidov. Večina avtorjev uporablja razrez genomske DNA z RE, nekateri pa uporabljajo postopke mehaničnih poškodb (uporaba ultrazvoka ali atomizerja) dvojne vijačnice (npr. Karagyzov in sod., 1993, Connell in sod., 1998). Prednost mehanskega razcepa DNA je v tem, da je proces popolnoma naključen in neodvisen od pogostnosti restrikcijskih mest v tarčni DNA molekuli, ne omogoča pa ligacije linkerjev z lepljivimi konci in prav tako ne kombinirane uporabe ligaze in RE, saj njihova mesta v fragmentirani DNA niso uničena. Pri restrikciji uporabljajo predvsem en encim, ki ima prepoznavno zaporedje 4 bp in cepi DNA pogosto, restrikcijski vzorec ločijo na agrozem gelu in iz njega izrežejo in prečistijo DNA fragmente, ki so ponavadi krajši od npr. 800 bp. Nekateri pa uporabljajo zmes nekaj RE in tako dobijo restrikcijski vzorec, kjer se večina fragmentov nahaja v željenem dolžinskem območju (Ostrander in sod.,

²⁹ ISI Web of Science, <http://wos.izum.si>, 13. nov. 2002.

1992; Paetkau 1999; Hamilton in sod., 1999). S tem odpade selekcija in ponovna izolacija fragmentov z gelsko elektroforezo, saj se po tem postopku lahko pojavljajo problemi z inhibicijo ligacije fragmentov izoliranih iz gela. Pomembno pa je tudi to, da pri uporabi enega RE ne dobimo fragmentov, ki bi predstavljali celotno genomsko DNA, prav tako pa izbira RE pogojuje količino in vrsto nadalje izoliranih mikrosatelitskih ponovitev (Hamilton in Fleischer, 1999). Pri uporabi več RE pa moramo v primeru, da ne uporabljamo samo RE, ki producirajo tope konce, te konce zapolniti ali zgladiti npr. z DNA polimerazo ali mung nukleazo (nukleaza fižola mung³⁰). Enako uporaba več RE poveča verjetnost odkritja zaporedij z večjim številom kopij v genomu (npr. satelitna DNA) (Zane in sod., 2002). Satelitno DNA zaznamo kot močnejše izražene fragmente, ki izstopajo iz množice razrezanih fragmentov. Kloniranje teh fragmentov je nezaželeno, ker večji delež knjižnice vsebuje take fragmente. Problem je možno odpraviti z izbiro drugega seta RE. Pri hmelju nismo opazili pojava satelitnih fragmentov, je pa bila satelitna DNA močno izražena pri uporabi te metode pri oljki (Bandelj, neobjavljeno).

Preglednica 2: Najpogosteje uporabljeni linkerji pri izdelavi genomskih obogatenih knjižnic.

Table 2: The most common linkers used in enriched genomic library construction protocols.

ds DNA zaporedje linkerja (5'-3' in 3'-5')	Ligacija	Restriksijsko mesto za kloniranje	Referenca
CTCTTGCTTGAATTCGGACTA ACACGAGAACGAACTTAAGCCTGATp ^a	topa	<i>EcoRI</i>	Karagyzov in sod. (1993)
CTAAGGCCTTGCTAGCAGAAGC AAAAGATTCCGGAACGATCGTCTTCGp	topa	<i>StuI</i> , <i>NheI</i>	Hamilton in sod. (1999)
CTCTTGCTTACGCGTGGACTA ACACGAGAACGAAATGCGCACCTGATp	topa	<i>MluI</i>	Edwards in sod. (1996)
GGTCTACTGGACTCACT CCAGATGACCTGAGTGATTAAP	lepljiva, <i>Tsp509I</i>	<i>Tsp509</i> -> <i>EcoRI</i>	White in Powell (1997)
GGCCAGAGACCCCAAGCTTCG CCGGTCTCTGGGGTTCGAAGCCTAGp	lepljiva, <i>Sau3AI</i>	TA kloniranje PCR fragmentov	Refseth in sod. (1997)
GGGTAGGATGGGGGATGGG CCCATCCTACCCCTACCCCTAGp	lepljiva, <i>Sau3AI</i>	TA kloniranje PCR fragmentov	Refseth, osebni vir ^b
GCGGTACCCGGAAGCTTGG CGCCATGGGCCCTTCGAACCCTAGp	lepljiva, <i>MboI</i>	<i>MboI</i>	Armour in sod. (1994)
CGTAGTACTCGTGC GAATTCTGC CATCATGAGCACGCTTAAGACGCTAGp	lepljiva, <i>MboI</i>	<i>EcoRI</i>	Kandpal in sod. (1994)

^a p pomeni, da je 5' konec začetnega oligonukleotida fosforiliran.

^b Izboljšana verzija linkerja, ker naj bi bil objavljen linker (Refseth in sod., 1997) nagnjen k samopodaljševanju v PCR.

Po razrezu genomske DNA sledi korak kloniranja, ki pa je odvisen od proizvedenih DNA koncev. Večina protokolov sloni na uporabi linkerjev, s katerimi na konce DNA fragmentov vnesemo mesta, ki nam pozneje služijo v PCR reakciji kot mesta prileganja

³⁰ Angl. Mung Bean Nuclease.

začetnih oligonukleotidov. Ponavadi z njimi vnesemo tudi restrikcijska mesta za lažje kloniranje fragmentov v vektorje po postopku obogatitve. Največ uporabljajo linkerje z lepljivimi ali s topimi konci. Lepljivi konci pridejo v poštev pri razrezu DNA z enim RE (npr. Refseth in sod., 1997; White in Powel, 1997), ligacijo s topimi konci pa uporabljajo tako pri fragmentih, generiranih z enim RE (Armour in sod., 1994; Edwards in sod., 1996; Fischer in Bachmann, 1998), pri mehansko razcepljenih fragmentih (Karagyzov in sod., 1993) ali fragmentih pridobljenih z več RE (Hamilton in sod., 1999). V preglednici 2 so predstavljeni linkerji, ki so v literaturi najpogosteje uporabljeni pri protokolih obogatitve mikrosatelitov.

V primeru, da uporabimo topo ligacijo, in da smo pri razrezu uporabili RE, ki tvori lepljive konce, moramo te zgladiti in spremeniti v tope. V ta namen lahko uporabimo katerokoli polimerazo s 3'-5' nukleazno aktivnostjo, npr. Klenov fragment DNA polimeraze I (Ostrander in sod., 1992) ali T4 DNA polimerazo (Karagyzov in sod., 1993), ki lahko restrikcijska mesta ali zapolnita ali uničita. V primeru, da moramo restrikcijsko mesto obvezno uničiti pa uporabimo mung nukleazo (Hamilton in sod., 1999). Pred ligacijo lahko genomskim fragmentom odstranimo 3-fosfatne skupine z alkalno fosfatazo (Karagyzov in sod., 1993; Hamilton in sod., 1999). S tem močno zmanjšamo verjetnost, da dobimo pri ligaciji hibride genomskih fragmentov in zaradi tega nepravilna zaporedja ter nedelujoče pare začetnih oligonukleotidov. Linker mora izpolnjevati glavni pogoj, da ni nagnjen k samopodaljševanju v PCR reakciji, kot so v svojem delu prikazali Hamilton in sod. (1999). Prav tako niso zaželjeni himerni produkti več linkerjev, zato so ponavadi na enem koncu linkerja dodane vsaj štiri enostranske, nekomplementarne baze. Tako je možen samo hibrid dveh linkerjev. V večini primerov uporabljajo fosforilirani oligonukleotid 3'-5' linkerja, da ligaza uspešno katalizira nastanek fosfodiesterske vezi. Ta del linkerja služi v PCR kot mesto prileganja začetnega oligonukleotida, ki ga ponavadi predstavlja 5'-3' oligonukleotid linkerja. V primeru uporabe nefosforiliranih linkerjev po ligaciji ne nastane vez med 3'-5' oligonukleotidom linkerja in genomsko 3'-5' DNA vijačnico, kar povzroči izgubo linkerskega zaporedja. Ta del se lahko podaljša v PCR brez dodanih začetnih oligonukleotidov s pomočjo *Taq* DNA polimeraze (Glenn in sod., 2000). Elegantno rešitev problema hibridov dveh linkerjev so predstavili Hamilton in sod. (1999). Pri ligaciji dveh linkerjev se ustvari restrikcijsko mesto encima *XmnI*. Ligacija na genomsko DNA poteka v prisotnosti RE *XmnI*, ki stalno cepi ustvarjene dimere. Tako je ves čas ligacije na voljo dovolj linkerjev za konce genomske DNA. Ob ligaciji linkerja na genomsko DNA pa se *XmnI* mesto uniči in linker ostane nanjo vezan. Poleg tega je prepoznavno zaporedje *XmnI* RE dolgo kar 10 bp, tako da je v genomu le majhen delež teh mest. Po tem koraku lahko pomnožimo del procesirane DNA v PCR reakciji s katero preverimo uspešnost ligacije in si zagotovimo dovolj fragmentov za nadaljno manipulacijo.

Selektivno hibridizacijo nato izvedemo ali s pomočjo sond pritrjenih na koščke najlonskih membran ali pa uporabljamo z biotinom označene sonde, ki nam omogočajo selektivno lovljenje fragmentov s pomočjo streptavidin magnetnega kompleksa. Sledi kloniranje v vektor, hibridizacijsko preverjanje knjižnice, določanje nukleotidnega zaporedja pozitivnih klonov in izdelava začetnih oligonukleotidov.

2.3.2.3.1 Selektivna hibridizacija s pomočjo kovalentno vezanih sond

Selekcija poteka v postopku klasične hibridizacije pri temperaturi, ki odgovarja dolžini in tipu ponovitve. Genomska enoverižna DNA, komplementarna ponovitev se veže na sonde, tiste ki so nevezane pa odstranimo s spiranjem (Karagyzov in sod., 1993; Armour in sod., 1994; Edwards in sod., 1996).

V svojem postopku so Karagyzov in sod. (1993) uporabili omenjeno metodo selekcije za izolacijo (CA)_n ponovitev iz mišjega genoma. Po selekciji so enoverižne DNA molekule v PCR reakciji spremenili v dvoverižne, nakar je sledil še en krog selekcije PCR pomnoženih fragmentov. Z drugim krogom selekcije so še dodatno povečali delež mikrosatelitskih ponovitev. Po drugem krogu selekcije je okrog 40 % klonov vsebovalo mikrosatelitsko ponovitev. Nukleotidno zaporedje so določili 20-im naključnim klonom, od tega so vsi vsebovali CA mikrosatelit. Najkrajša ponovitev je bila dolga 20 bp (10 ponovitev), odkrili pa so 13 popolnih, 5 nepopolnih in 2 sestavljena mikrosatelita. Podoben postopek so za potrebe izolacije rastlinskih mikrosatelitskih ponovitev razvili Edwards in sod. (1996). Uspešnost izolacije so pokazali z uporabo di-, tri- in tetranukleotidnih sond: (GA)₁₅, (GT)₁₅, (AT)₁₅, (GC)₁₅, (CAA)₁₀, (ATT)₁₀, (GCC)₁₀, (CATA)₁₀, (GATA)₁₀ in (ATAG)₁₀. Pri hibridizaciji so uporabili mešanico vseh oligonukleotidov, ki so jih vezali na eno membrano. Uporabili so dva kroga selekcije. Rekombinantnim kolonijam so neposredno določili nukleotidno zaporedje, brez uporabe hibridizacijske detekcije pozitivnih klonov. Rezultati določevanja zaporedja 140-ih klonov so pokazali, da jih 50-70 % vsebuje mikrosatelitsko ponovitev. Postopek Armourja in sod. (1994) je enak zgoraj navedenim primerom, le da so tu uporabili mnogo daljše sonde mikrosatelitskih ponovitev (nad 200 bp) za izolacijo tri- in tetranukleotidnih humanih lokusov. Njihovi predhodni rezultati so pokazali, da pri uporabi mikrosatelitskih sond z dolžino nad 200 bp izolirajo daljše lokuse (verjetnost polimorfizma se tako poveča), prav tako pa takšne sonde tolerirajo nepopolne mikrosatelitske lokuse. Za sonde so uporabili dolge, že odkrite humane mikrosatelitske lokuse ali pa so jih izdelali sami s pomočjo PCR reakcije. Genomsko DNA so selekcionirali le enkrat, poročajo pa o 30 % klonov, ki so vsebovali mikrosatelitske ponovitve. Avtorji so tudi opozorili na napake, ki jih povzroča *Taq* DNA polimeraza in s tem na možnost nepravilno določenega DNA zaporedja in nepravilno izbranega začetnega oligonukleotida. Izmed 46 parov izdelanih začetnih oligonukleotidov, eden izmed njih ni deloval. S premikom mest prileganja začetnih oligonukleotidov so lahko lokus pomnožili v PCR reakciji. Uporaba dolgih mikrosatelitskih sond je smiselna tudi zaradi doseganja ponovljivih pogojev. Pri vezavi sonde na membrano se ustvari kovalentna vez med bazo in membrano. Na primer, membransko vezana sonda (CT)₁₂ ima lahko pri hibridizaciji prostih od 0 do 10 ponovitev, kar pomeni hibridizacijsko temperaturo med 15 in 77 °C. To lahko predstavlja problem pri uporabi ostrejših pogojev hibridizacije. Z uporabo dolgih ponovitev imamo večjo verjetnost, da so pri hibridizaciji na voljo daljše, neprekinjene ponovitve (Fischer in Bachmann, 1998).

2.3.2.3.2 Selektivna hibridizacija s pomočjo biotinskih mikrosatelitskih sond

Biotinsko označene mikrosatelitske sonde se vežejo na mikrosatelitske lokuse fragmentirane genomske DNA, biotin pa se veže z magnetnimi delci, ki so prekriti s streptavidinom. S posebnim magnetom ločimo hibridizirane fragmente od množice ostalih, ki ne vsebujejo željenih mikrosatelitskih ponovitev (Kijas in sod., 1994; Kandpal in sod., 1994; White in Powel, 1997; Refseth in sod., 1997; Fischer in Bachmann, 1998; Hamilton in sod., 1999).

V tem primeru so si vse metode enake, izvajajo pa jih po priporočilih proizvajalca streptavidin magnetnega kompleksa. Ponavadi uporabljajo dva kroga selekcije, da povečajo odstotek pozitivnih klonov. Avtorji poročajo o različnih deležih pozitivnih klonov. Kandpal in sod. (1994) poročajo o 80-odstotnem deležu klonov, ki so vsebovali (CA)_n ponovitve, 60 % klonov pa je vsebovalo humane (CAG)_n trinukleotidne ponovitve. Refseth in sod. (1997) poročajo o uspešni uporabi metode pri lososu in polarni lisici. Več kot 70 % klonov genomske knjižnice polarne lisice je vsebovalo (AC)_n ponovitve, pri lososu pa več kot 78 % klonov. Klonom so neposredno določevali zaporedje brez predhodnega pregleda genomske knjižnice. Fischer in Bachmann (1998) sta metodo uporabila pri čebuli s (CA)_n, (GAA)_n in (CAA)_n ponovitvami. Poročata o več kot 60 % klonov, ki so vsebovali mikrosatelitsko ponovitev. Tudi tem klonom so neposredno določili nukleotidno zaporedje. Hamilton in sod. (1999) so metodo preizkusili pri vrsti tropskega drevja, pri štirih vrstah pingvinov in več vrstah primatov. Poročajo od 20 do 95 % pozitivnih klonov. Pri tej metodi je posebej izpostavljen problem sond, ki lahko v nadaljnjem PCR pomnoževanju služijo kot mesta prileganja začetnih oligonukleotidov, kar doprinese k visokemu deležu klonov z mikrosatelitom na začetku zaporedja (izgubi se eno obrobno zaporedje) (Refseth in sod., 1997). Avtorji zato predlagajo uporabo sond z biotinsko molekulo, pritrjeno na 3' koncu, ki onemogoči njegovo podaljševanje v PCR (Koblížková in sod., 1998) ali pa blokado sonde na 3' koncu z dideksinukleotidom.

Po selektivni hibridizaciji prevedemo ulovljene ssDNA fragmente v dvovertično DNA (dsDNA) v PCR in jih kloniramo po standardnih postopkih. Sledi hibridizacijsko preverjanje knjižnice, PCR preverjanje knjižnice ali takojšnje določanje zaporedja DNA fragmentov.

Obe opisani metodi selekcije mikrosatelitskih ponovitev imata svoje prednosti in slabosti. Prednosti hibridizacijske selekcije s pomočjo kovalentno vezanih sond so nižja cena, saj ni potrebe po biotinsko označenih sondah, streptavidin-magnetnem kompleksu in dragih magnetih za separacijo. Prav tako se membrane s sondami lahko večkrat uporabijo. Njene slabosti pa so časovno daljši postopek, saj potrebujemo 1-2 dneva za hibridizacijo, metodo je težje optimizirati in pri uporabi krajših sond ostane po njihovi vezavi na membrano manj prostih ponovitev (Fischer in Bachmann, 1998). Prednosti magnetne selekcije so lažja optimizacija in boljša ponovljivost, metoda je opravljena v enem dnevu. Slabosti magnetne selekcije pa so višja cena in verjetnost, da nam kljub spiranju lahko ostane v končnem

eluat u nekaj mikrosatelitskih sond, ki lahko v PCR reakciji služijo kot začetni oligonukleotidi, tako da je možna izguba ene obrobne regije lokusa.

V literaturi smo odkrili še dva poskusa obogatitve mikrosatelitskih lokusov z nekoliko drugačnimi metodami kot so bile opisane do sedaj. S prvo metodo, ki je podobna selektivni hibridizaciji in temelji na tvorbi trojnega heliksa med dsDNA fragmentom in biotinsko sondo v kislem mediju, so uspeli izdelati obogateno mikrosatelitsko knjižnico (Ito in sod., 1992a; Ito in sod., 1992b). Druga metoda pa temelji na afinitetni kromatografiji, ki se je veliko uporabljala za izolacijo mRNA molekul, le da je tu na kromatografskem mediju vezana mikrosatelitska sonda (Brenig in Brem, 1991). Poročajo, da je 10 % klonov v knjižnici vsebovalo (GT)_n ponovitev.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

DNA kultivarja 'Savinjski Golding', ki smo jo uporabili za izdelavo genomske knjižnice, smo izolirali iz rastlinic, gojenih v tkivni kulturi.

DNA 40-ih diploidnih hmeljnih akcesij obeh spolov (preglednica 3) testiranih v PCR analizi izdelanih začetnih oligonukleotidov smo izolirali iz svežih listov, nabranih v kolekcijskem nasadu.

Za analizo dedovanja lokusov smo uporabili DNA potomcev dveh križanj, izoliranih iz listov, nabranih v rastlinjaku. Testirali smo 22 potomcev križanja med kultivarjem 'Yeoman' in slovenskim divjim moškim hmeljem 3/3 ter 19 potomcev križanja med žensko linijo 241/8 in japonskim divjim moškim genotipom No3-38.

Celoten material vrste *H. lupulus*, proučevan v nalogi, smo nabrali na omenjenih lokacijah Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu.

Genomsko DNA japonskega hmelja *H. japonicus* smo dobili v dar od dr. Murakamija iz Research Laboratory for Brewing, Kirin Brewery, Yokohama, Japonska. Ženska rastlina je bila nabrana v Yokohami v območju Tokia in DNA izolirana s standardno CTAB metodo.

Fagemidno³¹ DNA vektorja pBluescript II SK + (Stratagene, Kalifornija, ZDA, plazmid vstavljen v genotip *E. coli* XL-1 Blue), ki smo jo uporabili pri kloniranju mikrosatelitskih insertov, smo izolirali iz prekonočne tekoče kulture.

Vsi začetni oligonukleotidi, uporabljeni v raziskavi, so bili sintetizirani v podjetju MWG Biotech (Ebersberg, Nemčija), sonde, označene z biotinom, so imele modifikacijo pritrjeno na 3' koncu, začetni oligonukleotidi, uporabljeni za določevanje nukleotidnega zaporedja pa so imeli CY5 modifikacijo pritrjeno na 5' koncu. Liofilizirani začetni oligonukleotidi so bili raztopljeni v TdE raztopini [10 mM Tris-HCl³² (pH 8,0), 0,1 mM EDTA³³ (pH 8,0)] v koncentraciji 100 ali 500 µM.

Preglednica 3: Analizirane hmeljne akcesije, njihovo poreklo, rodovnik kultivarjev in spol.

Table 3: Analysed wild hop plants and cultivars, origin, pedigree of cultivars and sex.

Št.	Ime / Akcesija	Poreklo	Rodovnik	Spol	Divji/ Kultivar
1	41P36	Gevgelija, osrednja Makedonija		Ž	D
2	32P02	Brdčani, Šumadija, Srbija		Ž	D

Se nadaljuje/It follows.

³¹ V nadaljevanju teksta bomo uporabljali izraz plazmid, čeprav ta za uporabljeni vektor ni točen, saj vsebuje tudi bakteriofagna prepoznavna mesta.

³² Za vse kemikalije in reagente, kjer ni naveden proizvajalec velja Sigma-Aldrich, Nemčija; tris (hidroksimetil) aminometan, pH uravnan z 1M klorovodikovo kislino.

³³ Etilendiamintetraoacetna kislina – dinatrijeva sol.

Nadaljevanje preglednice 3: Analizirane hmeljne akcesije, njihovo poreklo, rodovnik kultivarjev in spol.
Continuation of table 3: Analysed wild hop plants and cultivars, origin, pedigree of cultivars and sex.

Št.	Ime	Poreklo	Rodovnik	Spol	Divji/ Kultivar
3	13P01	Poljice, Lika, Hrvaška		Ž	D
4	27P04	Olovo, centralna Bosna		Ž	D
5	02P09	Rogaška Slatina, Slovenija		Ž	D
6	40P19	Kavadarci, zahodna Makedonija		Ž	D
7	20P14	Jasenovac, Gorski Kotar, Hrvaška		Ž	D
8	33P26	Paraćin, Srbija		Ž	D
9	07P02	Puščava, Slovenija		Ž	D
10	34P16	Grdelička Klisura, JV Srbija, Srbija		Ž	D
11	K5	Rusija		Ž	D
12	K7	Rusija		Ž	D
13	K11	Rusija		Ž	D
14	A12	Rusija		Ž	D
15	A16	Rusija		Ž	D
16	4/4	Slovenija		M	D
17	3/3	Slovenija		M	D
18	253/1	Rusija		M	D
19	No3-38	Japonska		M	D
20	R16	Rusija		M	D
21	R21	Rusija		M	D
22	35P01	Srbija		M	D
23	253/95	Rusija		M	D
24	106/32	Slovenija	62/113x1/2	M	K
25	31/107	Slovenija	22/25x23/84	M	K
26	'Savinjski Golding'	Slovenija	ekotip kultivarja 'Fuggle', prinešen v Slovenijo leta 1872	Ž	K
27	'Aurora'	Slovenija	'Northern Brewer' × TG (slovenski hmelj neznanega porekla)	Ž	K
28	'Ahil'	Slovenija	'Brewers Gold' × 3/3 (slovenski divji hmelj)	Ž	K
29	'Coobs'	Velika Britanija	klonska selekcija goldinga	Ž	K
30	'Osvaldov Klon 72'	Češka	klonska selekcija žateškega hmelja	Ž	K
31	'Hallertauer Mittelfruher'	Nemčija	masovna selekcija bavarskega hmelja	Ž	K
32	'Wye Target'	Velika Britanija	'Northern Brewer' x prosto oprafen x 25/57/281 (sejanec kultivarja 'Eastwell Golding')	Ž	K
33	'Kirin I'	Japonska	selekcija kultivarja 'Shinshuwase'	Ž	K
34	'Chang Bei No. 1'	Kitajska	neznani rodovnik	Ž	K
35	'Ging Dao Do Hua'	Kitajska	neznani rodovnik	Ž	K
36	'Brewers Gold'	Velika Britanija	BB1 x prosto oprafen	Ž	K
37	'Northern Brewer'	Velika Britanija	'Canterbury Golding' x OB-21 (sejanec kultivarja 'Brewers Gold' x OY1 (ameriški moški hmelj))	Ž	K
38	'Spalter Select'	Nemčija	ni podatka	Ž	K
39	'Vojvodina'	Srbija	'Northern Brewer' x SX502	Ž	K
40	'Pride of Ringwood'	Avstralija	('Pride of Kent' x prosto oprafen) x prosto oprafen	Ž	K

3.2 METODE DELA

Pri delu smo se držali načel laboratorijske prakse, katera so uveljavljena pri postopkih molekularnega kloniranja: uporabljali smo sterilno steklovino in plastiko. Delovne raztopine kemikalij smo sterilizirali z avtoklaviranjem (121 °C, 20 min) ali filtrsko (premer por 0,22 µm), prostorsko smo ločili izolacijo DNA in njeno pomnoževanje v PCR. Večino postopkov smo izvedli v aseptični komori v sterilnih razmerah. Po delu z bakterijami smo kontaminirano plastiko in uporabljena gojišča uničili z avtoklaviranjem.

3.2.1 Izolacija rastlinske DNA za PCR analizo

Za izolacijo rastlinske DNA smo uporabili uveljavljen CTAB protokol (Kump in sod., 1992), ki temelji na uporabi kationskega detergenta v raztopini z visoko ionsko močjo (> 0,7 M NaCl). V teh pogojih tvori cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) komplekse s proteini in z večino kislih polisaharidov, medtem ko nukleinskih kislin ne obori (Sambrook in Russell, 2001).

Protokol:

- (a) Manjšo količino (1-2 cm²) svežega rastlinskega tkiva (list ali poganjek) smo zdrobili v tarilnici ob dodatku tekočega dušika.
- (b) Dobljeni prah smo spremenili v suspenzijo z 1-2 ml CTAB ekstrakcijske raztopine [2-odstoten (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl³⁴, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2-odstoten (v/v) β-merkaptotanol], ki smo ga predhodno segreti na 68 °C.
- (c) Do 1 ml homogeniziranega vzorca smo prenesli v 1,5 ml-mikrocentrifugirko in inkubirali z občasnim mešanjem 1,5 ure pri 68 °C.
- (d) Po inkubaciji smo vzorcem dodali 600 µl mešanice kloroforma in izoamilalkohola, pripravljeno v razmerju 24 : 1, in jih dobro premešali.
- (e) Nastalo suspenzijo smo centrifugirali 15 minut pri relativni centrifugalni sili 14.000 g pri temperaturi 4 °C (centrifuga Beckman J2-HS, rotor JA 18.1).
- (f) Supernatant smo previdno prenesli v novo 1,5 ml-mikrocentrifugirko in DNA precipitirali z dodatkom 1/10 volumna 3 M natrijevega acetata (pH 5,2, uravnan z očetno kislino) in 1-im volumnom ledenohladnega izopropanola (hranjen pri -20 °C). Vzorce smo premešali in inkubirali 30 minut pri -20 °C.
- (g) Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 min pri 14.000 g in 4 °C, supernatant smo zavrgli in spirali DNA v 70-odstotnem etanolu 10 min pri sobni temperaturi (TS). Etanol smo previdno odlili in posušili vzorce pri TS.
- (h) DNA smo raztopili v 50-100 µl TE raztopine [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] in vzorce shranili pri -20 °C.

³⁴ Natrijev klorid.

3.2.2 Izolacija DNA cv. 'Savinjski Golding' za izdelavo genomske knjižnice

Za potrebe izdelave obogatene mikrosatelitske knjižnice smo izolirali DNA iz celotnih rastlin cv. 'Savinjski Golding', ki so bile gojene v tkivni kulturi.

Za uspešno izdelavo genomske knjižnice potrebujemo čistejšo DNA kot jo uporabljamo pri PCR analizah. Zato smo modificirali protokol, predstavljen v poglavju 3.2.1 (Izolacija rastlinske DNA za PCR analizo), tako da smo vzorce večkrat očistili s topilom in odstranili izolirano RNA z encimom RNazo A:

- (a) Vključno s točko (c) poglavja 3.2.1 (Izolacija rastlinske DNA za PCR analizo) sta si metodi identični. Ker smo želeli izolirati večjo količino DNA smo izolacijo izvedli v več ponovitvah.
- (b) Po inkubaciji smo vzorcem dodali 600 μ l mešanice fenola, kloroforma in izoamilalkohola (pH 8,0), pripravljene v razmerju 25 : 24 : 1, in jih dobro premešali.
- (c) Nastalo suspenzijo smo centrifugirali 15 min pri 14.000 g pri temperaturi 4 °C, supernatant smo zatem prenesli v novo mikrocentrifugirko in ponovili spiranje s topilom.
- (d) Supernatant smo previdno prenesli v novo 1,5 ml-mikrocentrifugirko, vzorcem dodali po 100 μ g RNaze A [založna raztopina 10 mg/ml RNaze A pripravljena v raztopini 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) in 15 mM NaCl, hranjena pri -20 °C] in jih inkubirali vsaj 2 uri pri 37 °C.
- (e) Po inkubaciji smo še dvakrat ponovili ekstrakcijo s topili (tč. (b) in (c)), drugič smo uporabili mešanico kloroforma in izoamilalkohola (24 : 1).
- (f) Sledila je oboritev, spiranje z etanolom, sušenje in raztopitev DNA (enako kot tč. (f), (g) in (h) v poglavju 3.2.1 Izolacija rastlinske DNA za PCR analizo).

3.2.3 Določevanje koncentracije DNA

Koncentracije DNA smo v primeru genomskih vzorcev določali s pomočjo mini fluorometra TKO100 (Hofer Scientific, ZDA), v primeru PCR fragmentov in izolirane plazmidne DNA s pomočjo spektrofotometrije (BioPhotometer, Eppendorf, Nemčija).

V primeru fluorometrije smo pri merjenju 2 μ l vzorca uporabili 2 ml TNE delovne raztopine [10 mM Tris, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4 (pripravljena v 10-kratni koncentraciji), pred merjenjem smo dodali barvilo Hoechst 33258 v koncentraciji 0,1 μ g/ml (iz založne raztopine 1 mg/ml pripravljene v vodi)]. Za umeritev aparata smo uporabili DNA telečjega priželjca v koncentraciji 100 ng/ μ l.

Za spektrofotometrično merjenje smo s 70 μ l vode zmešali 1 ali 2 μ l vzorca in odčitali vrednosti pri 260 in 280 nm. Za umeritev aparata smo uporabili vodo.

Glede na izmerjene koncentracije smo v dvakrat destilirani vodi pripravili potrebne delovne redčitve. Tudi te smo hranili pri -20 °C.

3.2.4 Agarozna elektroforeza

Vzorci smo analizirali s horizontalno agarozno elektroforezo v $0,5 \times$ TBE elektroforetskem pufu [44,5 mM Tris, 44,5 mM borna kislina in 1 mM EDTA]. Za ločevanje vzorcev smo uporabljali dva tipa agaroze; SeaKem LE z nizko resolucijo in MetaPhor[®] z visoko resolucijo ločevanja vzorcev (BMA Products, ZDA). Koncentracijo agaroze v gelu smo prilagodili potrebam (glede na dolžino fragmentov) in je navedena v nadaljevanju pri opisanih postopkih. Gel je bil pripravljen v $1 \times$ TBE elektroforetskem pufu. Elektroforeza je potekala pri 100 V proti pozitivno nabiti anodi. Uporabljali smo horizontalno elektroforetsko napravo SubCell Model 192 (Bio-Rad, ZDA).

Na gel smo nanesti mešanico vzorca (PCR reakcija, restrikcija: 80 %) in nanašalnega barvila (20 %) [12,5-odstoten (w/v) Ficoll tip 400, 0,2-odstoten (w/v) brom fenol modro]. Poleg vzorcev pa smo na gel nanesti tudi 200 ng DNA markerja številka VI (Roche Molecular Biochemicals; 15 fragmentov dolžin: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 2x298, 2x234, 220 in 2x154 bp) ali 200 ng DNA markerja številka XIII – 50 bp (Roche Molecular Biochemicals; 16 fragmentov dolžin: 2642 bp, 750-50 bp, po 50 bp razlike).

Analizirano DNA smo obarvali z etidijevim bromidom (EtBr), ki smo ga predhodno dodali v agarozni gel v koncentraciji 0,5 μ g/ml [iz založne vodne raztopine s koncentracijo 10 mg/ml]. Elektroforetske vzorce smo opazovali s transiluminatorjem TFM-30 (UVP Inc., Anglija) in jih fotografirali s pomočjo fotografskega aparata MP-4 (Polaroid, ZDA).

3.2.5 Postopek izdelave z mikrosateliti obogatene genomske knjižnice hmelja

3.2.5.1 Restrikcija genomske DNA hmelja in procesiranje restrikcijskih fragmentov

Pri restrikciji smo uporabili več različnih RE, ki razcepijo večino hmeljne DNA tako, da so bili dobljeni fragmenti krajši od 1000 bp, kar je pogoj za uspešno določevanje nukleotidnega zaporedja.

Protokol:

- (a) 10 μ g genomske hmeljne DNA smo rezali s 15-imi enotami sledečih RE: *Nhe*I, *Alu*I, *Hae*III in *Rsa*I (vsi RE New England Biolabs) v $1 \times$ NEB2 pufu [10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1mM DTT³⁵ (pH 7,9)] ob dodatku $1 \times$ BSA³⁶ [100 μ g/ml, iz 100-krat koncentrirane založne raztopine]. Restrikcija je potekala v volumnu 100 μ l pri 37 °C. Po 16 urah smo inaktivirali encime pri 65 °C 20 minut.
- (b) Po restrikciji smo vzorcu odvzeli 300 ng DNA vzorca (3 μ l), da smo na 1,8-odstotnem agaroznem gelu preverili popolnost restrikcije.

³⁵ Ditiotritol.

³⁶ Goveji serumski albumin, angl. Bovine Serum Albumin.

Ker smo pri restrikciji uporabili RE *NheI*, ki proizvaja DNA fragmente z lepljivimi konci, v nadaljevanju postopka pa smo potrebovali fragmente s topimi konci, smo enoveržne konce odstranili s poliranjem z encimom mung nukleazo (MBN):

- (c) Celotni inaktivirani restrikciji smo dodali 10 enot encima MBN (New England Biolabs, Beverly, ZDA) in inkubirali 30 minut pri 30 °C.
- (d) Encime smo odstranili s 4-kratno ekstrakcijo z mešanico fenola, kloroforma in izoamilalkohola (25 : 24 : 1) in precipitirali DNA fragmente z dodatkom 1/10 volumna 3 M natrijevega acetata in 2,5 volumna absolutnega etanola in inkubirali pri –20 °C 2-3 ure ali preko noči. Vzorce smo centrifugirali (15 min, 14.000 g, 4 °C), sprali usedlo DNA s 70-odstotnim etanolom, jo posušili in raztopili v 30 µl TE pufra. Po tem koraku smo koncentracijo restrikcijskih fragmentov preverili spektrofotometrično.

Sledila je defosforilacija fragmentov (odstranitev fosfatne skupine iz 5'-konca DNA), s čimer preprečimo v postopku ligacije linkerjev združevanje in nastanek himernih DNA fragmentov:

- (e) Razrezane fragmente DNA smo na podlagi izmerjene koncentracije razredčili z vodo na 50 ng/µl in jih defosforilirali pri 37 °C z 20 enotami alkalne fosfataze iz telečjega črevesa (CIAP³⁷, New England Biolabs) v 1 × NEB3 pufri [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT (pH 7,9)]. Po 3 urah smo reakciji dodali EDTA-o (pH 8,0) do koncentracije 5 mM in inaktivirali encim 10 min pri 75 °C.
- (f) Encim smo odstranili s postopkom čiščenja s topilom (enako kot v tč. (d)). Razrezane in defosforilirane fragmente z določeno koncentracijo smo hranili pri –20 °C.

3.2.5.1.1 Izbira primerne kombinacije restrikcijskih encimov

V procesu optimizacije postopka smo določili pogostnost restrikcijskih mest v genomski DNA hmelja in najprimernejšo kombinacijo RE, ki razcepi celotno hmeljno DNA v območju pod 1000 bp.

Preglednica 4: Preizkušene kombinacije restrikcijskih encimov (vsi RE New England Biolabs).

Table 4: Tested combination of restriction enzymes (all enzymes produced by New England Biolabs).

Kombinacija	RE	Kombinacija	RE
1	<i>NheI</i>	6	<i>RsaI</i>
2	<i>XmnI</i>	7	<i>NheI</i> + <i>AluI</i> + <i>HaeII</i> + <i>HaeIII</i>
3	<i>AluI</i>	8	<i>NheI</i> + <i>AluI</i> + <i>HaeII</i> + <i>RsaI</i>
4	<i>HaeII</i>	9	<i>NheI</i> + <i>AluI</i> + <i>HaeIII</i> + <i>RsaI</i>
5	<i>HaeIII</i>	10	<i>NheI</i> + <i>HaeII</i> + <i>HaeIII</i> + <i>RsaI</i>

³⁷ Angl. Calf Intestinal Alkaline Phosphatase.

Genomsko DNA hmelja (1 µg) smo razrezali z 2,5-imi enotami vsakega RE in njihovimi kombinacijami (16 ur, 37 °C, inaktivacija 20 min 65 °C, preglednica 4) v odgovarjajočem 1 × NEB pufru in v najmanjšem možnem volumnu (da koncentracija glicerola iz encima ni v reakcijski mešanici presegala 10 %). Tristo ng restrikcije smo nanegli na 1,8-odstoten agarozni gel in primerjali z nerazrezano hmeljno DNA.

3.2.5.2 Priprava fosforiliranih linkerjev

V naši nalogi smo uporabili SNX linker, ki so ga razvili Hamilton in sod. (1999), ki ga izdelamo iz dveh komplementarnih začetnih oligonukleotidov z naslednjim zaporedjem:

- 1) SNXfor: 5' - CTAAGGCCTTGCTAGCAGAAGC - 3'
- 2) SNXrev: 5' - GCTTCTGCTAGCAAGGCCTTAGAAAA - 3'

Za uspešno vezavo linkerja na restrikcijske fragmente je potrebno fosforilirati 5'-konec SNXrev začetnega oligonukleotida z encimom T4-polinukleotidno kinazo (PK).

Postopek:

- (a) 300 pmolov (pmol) SNXrev začetnega oligonukleotida smo segreli na 70 °C za 5 min in zatem takoj ohladili na ledu. Fosforilacija je potekala v volumnu 50 µl pri 37 °C z naslednjo sestavo: 1 × ligazni pufer [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA (pH 7,5), New England Biolabs] in 10 enot encima T4 PK (New England Biolabs). Reakcijo smo po eni uri ustavili z uničenjem encima pri 65 °C, 20 min.
- (b) Fosforiliranemu SNXrev začetnemu oligonukleotidu smo dodali 300 pmol SNXfor začetnega oligonukleotida (10 µl) in segreli mešanico v napravi za PCR PE480 (Applied Biosystems) na 97 °C ter jo po 3 min izključili in pustili, da se je termoblok počasi ohlajal na sobno temperaturo. S tem smo ustvarili primerne pogoje za nastanek dvoverižnega linkerja iz komplementarnih začetnih oligonukleotidov. Fosforilirane linkerje smo hranili pri -20 °C do 2 tedna.

3.2.5.3 Ligacija linkerjev na DNA fragmente

Na konce razrezane DNA je potrebno pritrditi znana zaporedja DNA, linkerje (Wu in sod., 1987), ki nam v nadaljevanju postopka služijo kot mesta prileganja začetnih oligonukleotidov, z njimi pa tudi vnesemo znana restrikcijska mesta, ki nam olajšajo nadaljne kloniranje fragmentov.

Postopek:

- (a) V skupnem volumnu 20 µl smo združili 500 ng restrikcijskih, defosforiliranih, topih DNA fragmentov in 60 pmol SNX linkerja³⁸, 1 × ligazni pufer, 10 enot RE *Xmn*I (New

³⁸ To odgovarja molarnemu razmerju 20 : 1, če upoštevamo povprečno dolžino DNA fragmentov 500 bp.

England Biolabs), s čimer smo preprečili nastanek linker dimerov³⁹ in 6 Weissovih enot encima ligaze (New England Biolabs). Restriksijsko-ligazno reakcijo smo inkubirali izmenjajoče 16 ur pri 16 °C⁴⁰ 30 min in pri 37 °C⁴⁰ 10 minut. Na koncu smo encima inaktivirali s segrevanjem na 65 °C za 20 min. Ligacijsko reakcijo smo shranili pri -20 °C.

- (b) Uspešnost ligacije smo preverili s PCR tako, da smo napravili 4 reakcije v skupnem volumnu 50 µl, ki so vsebovale 2 µl ligacijske mešanice (kar odgovarja 25-im ng DNA fragmentov), 1 × PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3), Roche Molecular Biochemicals], 0,2 mM vsakega deoksinukleotida (dNTP), 0,5 µM SNXfor začetnega oligonukleotida, 1,25 enote encima *Taq* DNA polimeraze (Roche Molecular Biochemicals) in 0,25 enote encima *Pfu* DNA polimeraze (Promega), s katerim smo zagotovili manjši delež napak, saj ima encim za razliko od *Taq* DNA polimeraze tudi 3'-5' nukleazno aktivnost (Cline in sod., 1996).
- (c) Vzorce smo pomnožili v napravi za PCR PE9700 (Applied Biosystems) z naslednjem temperaturnim protokolom: začetna denaturacija 3 min pri 94 °C, ki ji je sledilo 35 ciklov pomnoževanja: 45 sec pri 94 °C, 1 min pri 62 °C in 2 min pri 72 °C, čemur je sledila še končna inkubacija 7 min pri 72 °C. Prvi vzorec smo vzeli ven pri končanem 20-em ciklu, naslednjega pri 25-em ciklu in tretjega pri 30-em ciklu. Uspešnost in stopnjo pomnoževanja smo preverili na 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Ostanek ligacijske reakcije smo pomnožili s številom ciklov, ki se je izkazal kot najboljši (enakomerno pomnoževanje brez prisotnih močnejše pomnoženih DNA fragmentov).
- (d) Ligrane, pomnožene DNA (LN-DNA) fragmente smo združili, očistili in precipitirali z dvema ekstrakcijama s topilom, kot je navedeno v poglavju 3.2.5.1 Restrikcija genomske DNA hmelja in procesiranje restriksijskih fragmentov tč. (d) in jih shranili pri -20 °C.

3.2.5.4 Izdelava dolgih mikrosatelitskih sond za lovljenje

Dolge mikrosatelitske sonde smo izdelali v PCR s podaljševanjem dveh komplementarnih začetnih oligonukleotidov z mikrosatelitskim zaporedjem. Izdelali smo tri dinukleotidne, štiri trinukleotidne in eno tetranukleotidno sondo (preglednica 5).

Protokol:

- (a) V volumnu 50 µl smo pripravili naslednje reakcijske komponente: 2,5 µM vsakega komplementarnega začetnega oligonukleotida (preglednica 5), 0,2 mM vsakega deoksinukleotida, 1 x PCR pufer, 2,5 mM MgCl₂ in 2 enoti *Taq* DNA polimeraze.
- (b) Mikrosatelitska zaporedja smo podaljšali v PCR z naslednjim temperaturnim profilom: začetni 2-minutni denaturaciji pri 94 °C je sledilo 20 ciklov 45 sec pri 94 °C, 30 sec pri

³⁹ Linker je napravljen tako, da se v primeru ligacije dveh linkerjev ustvari restriksijsko mesto *Xmn*I. S prisotnostjo tega RE v ligazni mešanici preprečimo nastanek takih dimerov in zagotovimo dovolj linkerjev, ki so na voljo DNA fragmentom.

⁴⁰ Optimalni temperaturi za delovanje ligaze in restriksijskih encimov.

V primeru (AT)_n in (TAA)_n ponovitev pa nismo uspeli izdelati sond s pomočjo podaljševanja v PCR reakciji, zato smo uporabili podaljševanje s pomočjo zdrsa Klenowega encima (Schlötterer in Tautz, 1992).

Protokol:

- (a) V volumnu 50 µl smo pripravili naslednje reakcijske komponente: 50 mM K-fosfat (pH 7,5), 15 mM MgCl₂, 4 mM DTT, 2 mM vsakega deoksi nukleotida, 5 µM vsakega komplementarnega začetnega oligonukleotida oz. 10 µM v primeru (AT)₁₅ samokomplementarne mikrosatelitske ponovitve in 5 enot Klenowega encima (Roche Molecular Biochemicals).
- (b) Reakcijo smo inkubirali 18 ur na 37 °C in preverili pomnožene fragmente na 1,8 % agaroznem gelu.
- (c) Pomnožene sonde smo dvakrat očistili in precipitirali (navedeno v poglavju 3.2.5.1 Restrikcija genomske DNA hmelja in procesiranje restrikcijskih fragmentov tč. (d)), jim spektrofotometrično določili koncentracijo in shranili pri -20 °C.

3.2.5.5 Lovljenje mikrosatelitov

Lovljenje mikrosatelitov je temeljilo na hibridizaciji denaturiranih LN-DNA fragmentov s sondami, pritrjenimi na membrano. Po prekonočni hibridizaciji smo nespecifične fragmente sprali z membrane, specifične pa prevedli v dvoverižno DNA v PCR.

Postopek:

- (a) LN-DNA fragmente (8 µg) smo denaturirali 5 min pri 95 °C skupaj s 600 pmol SNXfor začetnega oligonukleotida⁴² in jih odpipetirali v 500 µl formamidnega pufru, segretega na 70 °C, ki je že vseboval membrano s pritrjenimi mikrosatelitskimi sondami. Hibridizacija je potekala v hibridizacijski komori (Dual Hybridisation Oven, Hybaid) pri začetni temperaturi 70 °C. V primeru AT in TAA mikrosatelitov smo preizkusili tudi hibridizacijski pufer brez formamida [5 × SSC, 25 mM Na-fosfat pH 7,0, 0,5 % SDS]. Vsako uro smo znižali temperaturo za 5 °C, dokler ni temperatura dosegla 37 °C in hibridizirali pri tej temperaturi preko noči.
- (b) Naslednji dan smo 5-krat sprali membrane (5 min za vsako spiranje) v 2 × SSC + 0,01 % SDS in 3-krat pri bolj zaostrenih pogojih v 0,5 × SSC + 0,01 % SDS. Zadnja tri spiranja smo pri AT in TAA mikrosatelitskih ponovitvah izpustili. Temperature spiranj za posamezne mikrosatelitske ponovitve so predstavljene v preglednici 6.
- (c) Vezane DNA fragmente smo sprali z membrane v 220 µl sterilne vode pri 98 °C 5 min, jih odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in shranili pri -20 °C.

⁴² S tem smo preprečili, da bi se komplementarna linkerska mesta medsebojno hibridizirala, in da bi dobili več nespecifičnih DNA fragmentov.

- (d) Pripravili smo po 4 vzorce z 1, 5, 10 in 20 μ l ulovljenega DNA vzorca in jih pomnožili v PCR (50 μ l) na enak način, kot je predstavljeno v poglavju 3.2.5.3 Ligacija linkerjev na DNA fragmente tč. (b) in (c).
- (e) Najbolje pomnožen vzorec (enakomerno pomnoževanje z najmanj posameznih fragmentov) smo dvakrat očistili in precipitali (kot je opisano v poglavju 3.2.5.1 Restrikcija genomske DNA hmelja in procesiranje restrikcijskih fragmentov tč. (d)) in shranili pri -20°C .
- (f) Stopnjo obogatitve smo preverili s hibridizacijo točkovnega odtisa 50-ih ng ulovljenega vzorca, ki smo ga primerjali s 50-imi ng: (1) celokupne genomske DNA hmelja, (2) LN-DNA fragmentov, (3) dolgih mikrosatelitskih sond, uporabljenih pri lovljenju, in (4) sondi komplementarnega začetnega oligonukleotida, uporabljenega pri izdelavi dolge mikrosatelitske sonde. Za detekcijo smo uporabili komercialni komplet Phototope[®]-Star Detection Kit (New England Biolabs), katerega uporaba je natančneje razložena v poglavju 3.2.5.6.6 Hibridizacija in detekcija. V primeru, da je bil signal ulovljenega vzorca močnejši v primerjavi z genomsko DNA, kar je kazalo na vzorec obogaten z mikrosateliti, smo le-tega uporabili v nadaljnem postopku.

Preglednica 6: Temperature spiranja membran po lovljenju za posamezne mikrosatelitske ponovitve.

Table 6: Temperatures of membrane washing steps for individual microsatellite motifs after capturing.

Mikrosatelit	T [$^{\circ}\text{C}$]	Mikrosatelit	T [$^{\circ}\text{C}$]
GA	50	ACA	57
GT	58	AGA	57
AT	42	CAG	65
ATA	42	ACTC	61

3.2.5.6 Kloniranje obogatenih vzorcev

Za kloniranje smo uporabljali defosforiliran, z RE *Xba*I razrezan pBluescript II SK vektor in kompetentne celice XL-10 Gold (Stratagene).

3.2.5.6.1 Restrikcija in defosforilacija vektorja

Z RE *Xba*I ustvarimo lepljive konce, ki so komplementarni lepljivim koncem obogatenih DNA fragmentov, ustvarjenih z *Nhe*I RE. Z defosforilacijo plazmida pa preprečimo, da bi se v postopku ligacije plazmidna DNA zaprla brez vstavljenega DNA fragmenta in bi se s tem zmanjšal delež rekombinantnih kolonij.

Postopek:

- (a) 5 μ g plazmidne DNA (izolirane s postopkom opisanim v poglavju 3.2.5.7 Izolacija plazmidne DNA) smo razrezali v 50 μ l s 25 enotami *Xba*I RE v $1 \times$ NEB2 pufu ob

dotatku $1 \times$ BSA. Restrikcija je potekala 16 ur pri 37°C , na koncu smo encim inaktivirali s segrevanjem na 65°C za 20 min.

- (b) Razrezano plazmidno DNA smo razredčili na $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ v $1 \times$ NEB2 pufru in jo defosforilirali z 10 enotami CIAP encima 2 uri pri 37°C .
- (c) Razrezan in defosforiliran plazmid smo očistili s pomočjo komercialnega kompleta Qaquik PCR purification Kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Vzorcju smo dodali 5 volumnov pufru PB⁴³ in dobro premešali, ga nanесли na kolono, ki smo jo centrifugirali 1 min v namizni centrifugi pri TS (Eppendorf, 13.200 g). Vzorec smo sprali s $30\ \mu\text{l}$ vode (pustili stati 1 min) in ga zbrali s centrifugiranjem. Koncentracijo obdelane plazmidne DNA smo določili spektrofotometrično, napravili razredčitve na $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ in jo shranili pri -20°C .
- (d) Uspešnost razreza plazmida smo preverili na 1-odstotnem agaroznem gelu (250 ng DNA), delež nedefosforiliranega plazmida pa s samoligacijo vzorca (volumen $10\ \mu\text{l}$: 20 ng obdelane plazmidne DNA, $1 \times$ ligazni pufer in 3 Weissove enote ligaze; ligacija 16 ur pri 16°C , inaktivacija encima 10 min pri 65°C) in transformacijo v kompetentne celice (postopek opisan v poglavju 3.2.5.6.4 Transformacija kompetentnih celic s plazmidno DNA) ter s primerjavo z rezultati transformacije nerazrezanega in razrezanega plazmidnega vzorca.

3.2.5.6.2 Izdelava kompetentnih celic *E. coli*

Kompetentne celice *E. coli* genotipa XL-10 Gold smo izdelali po SEM metodi (Inoue in sod., 1990) z dodatkom aminoksiline glicina v gojitvenem mediju, ki povzroči motnje v sestavi membrane in poveča permeabilnost le-te (Akhtar in sod., 2000).

Postopek:

- (a) Zamrznjeno kulturo XL-10 Gold celic (hranjena pri -80°C smo razmazali po LB trdnem gojišču [1-odstotni NaCl, 1-odstotni tripton, 0,5-odstotni kvasni ekstrakt, 2-odstotni Difco[®] agar (Becton Dickinson)], ki je vseboval antibiotik kanamicin [30 mg/l] in gojili preko noči na 37°C .
- (b) Naslednji dan smo inokulirali 100 ml SOB medija [2-odstotni tripton, 0,5-odstotni kvasni ekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, končni pH v območju 6,8-7] (Hanahan, 1983) z dodatkom 1-odstotnega glicina v 1 l erlemajerici s 5 svežimi kolonijami in gojili kulturo s stresanjem pri temperaturi 18°C , dokler gostota celic merjena pri 600 nm s spektrofotometrom (OD_{600} , spektrofotometer umerjen z SOB medijem) ni dosegla vrednosti 0,6.
- (c) Kulturo smo prelili v ohlajeno 250 ml-centrifugirko, jo ohladili 10 min na ledu in centrifugirali 10 min pri 2.500 g pri 4°C (rotor JA-6).

⁴³ Proizvajalec ne navaja sestave.

- (d) Supernatant smo odlili in celice raztopili z rahlim mešanjem v 32 ml ledeno-hladnega TB pufru [10 mM pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7, filtrsko sterilizirano] in inkubirali 10 min na ledu.
- (e) Po inkubaciji smo celice ponovno centrifugirali 10 min pri 900 g pri 4 °C.
- (f) Supernatant smo previdno odlili in raztopili celice v 8 ml TB pufru, jim dodali DMSO⁴⁴ do končne koncentracije 7 %, rahlo premešali in inkubirali na ledu 10 min.
- (g) Bakterije smo razdelili po 450 µl v ohlajene 1,5 ml-mikrocentrifugirke in jih takoj zamrznili v tekočem dušiku in jih hranili pri -80 °C do enega leta brez izgube kompetence.
- (h) Celice smo pred uporabo transformirali z 10 pg plazmida pUC18 s toplotnim šokom (opisano v poglavju 3.2.5.6.4 Transformacija kompetentnih celic s plazmidno DNA) in jim na podlagi števila dobljenih kolonij določili stopnjo kompetence.

3.2.5.6.3 Procesiranje obogatenih DNA fragmentov

Z ligacijo SNX linkerjev smo vnesli na konce DNA fragmentov tudi dve restrikcijski mesti za RE *Stu*I, ki napravi tope konce in za RE *Nhe*I, ki napravi lepljive konce, ki so kompatibilni z restrikcijskim mestom encima *Xba*I, s katerim smo pripravili plazmidni vektor.

Postopek:

- (a) Dele linkerjev s koncev obogatenih DNA fragmentov smo odstranili z restrikcijo vseh v PCR pomnoženih obogatenih fragmentov v volumnu 20 µl 2 uri pri 37 °C z 2,5 enotami *Nhe*I RE v 1 × NEB2 pufru z dodatkom 1 × BSA. Encim smo inaktivirali 20 min pri 65 °C.
- (b) Vzorec smo dvakrat očistili in precipitirali (kot je opisano v poglavju 3.2.5.1 Restrikcija genomske DNA hmelja in procesiranje restrikcijskih fragmentov tč. (d)), raztopili v vodi ter odstranili dele linkerjev s komercialno Sephadex G-50 mini kolono (Amersham Biosciences) po navodilih proizvajalca: kolono smo centrifugirali 1 min pri 2.000 g (Eppendorf) in TS, zatem nanjo nanesli vzorec DNA in ponovno centrifugirali pri 2.000 g. Koncentracijo ulovljenih DNA fragmentov smo določili spektrofotometrično in jih shranili pri -20 °C.
- (c) Fragmente z *Nhe*I lepljivimi konci smo vstavili v *Xba*I razrezan, defosforiliran pBluescript SK plazmid (50 ng) v molarnem razmerju 1:1 (8,33⁴⁵ ng DNA fragmentov) v reakcijskem volumnu 15 µl s sestavo: 1 × ligazni pufer, 5 enot *Nhe*I RE in 3 Weissove enote ligaze. Restrikcijsko-ligazno reakcijo smo inkubirali 16 ur po protokolu, navedenem v poglavju 3.2.5.3 Ligacija linkerjev na DNA fragmente tč. (a).

⁴⁴ Dimetil sulfoksid.

⁴⁵ Ob predpostavki, da je povprečna dolžina DNA fragmentov, ki jih kloniramo 500 bp.

3.2.5.6.4 Transformacija kompetentnih celic s plazmidno DNA

Transformacijo celic s plazmidno DNA smo izvedli s toplotnim šokom in napravili modro-belo selekcijo na trdnem LB gojišču v prisotnosti antibiotika karbenicilina.

Postopek:

- (a) Na ledu odtaljene kompetentne celice smo razdelili po 100 μ l v ohlajene 2 ml-mikrocentrifugirke, jim dodali 2 μ l ligacijske mešanice⁴⁶, rahlo premešali in inkubirali na ledu 30 min.
- (b) Po inkubaciji smo v vodni kopeli pri 42 °C za 45 sec izvedli toplotni šok in celice za 5 min ohladili na ledu.
- (c) Celicam smo dodali 900 ml SOC medija [sestava identična SOB mediju z dodano 20 mM glukozo] in jih stresali 45 min pri 37 °C, da se je vzpostavila ampicilinska odpornost, kodirana na plazmidu.
- (d) 10, 50 in 100 μ l bakterijskih celic smo razmazali po trdnem LB gojišču, ki je vseboval karbenicilin kot selekcijski antibiotik [150 mg/l] ter IPTG⁴⁷ (Duchefa) [0,2 mM, iz založne raztopine s koncentracijo 0,1 M] in X-gal⁴⁸ (Duchefa) [40 μ g/ml, iz založne raztopine s koncentracijo 20 mg/ml v dimetil formamidu] za modro-belo selekcijo. Petrijevke smo inkubirali preko noči pri 37 °C, da smo ugotovili najprimernejšo gostoto celic ter naslednji dan razmazali preostanek celic na gojišču.
- (e) Bele (transformirane) kolonije smo s sterilnim zobotrebcem precepili na LB gojitveno ploščo z ampicilinom [50 mg/l] (delali smo v dveh ponovitvah) s 186-imi mesti in gojili preko noči pri 37 °C. Precepljene bakterije smo zatem uporabili pri detekciji pozitivnih klonov (do takrat hranili pri 4 °C, vendar ne več kot dva tedna).

3.2.5.6.5 Prenos kolonij in vezava DNA na najlonsko membrano

Pri tem postopku prenesemo bakterijske kolonije na najlonsko membrano, kemično razbijemo celice in kovalentno vežemo sproščeno DNA na membrano.

Postopek:

- (a) Pozitivno nabito najlonsko membrano (Nytran[®] Super Charge) smo položili na gojitveno ploščo z razporejenimi kolonijami za dve minuti, da so se te prilepile nanjo.
- (b) S pinceto smo previdno odlepili membrano z gojišča in nadaljevali s postopkom razgradnje bakterij s kolonijami obrnjenimi navzgor na omočenem Whatmannovem 3MM kromatografskem papirju.
- (c) Najprej smo membrane za 3 min prenesli v pladenj z 10 % SDS, sledilo je 5-minutno tretiranje na papirju, omočenim z denaturacijsko raztopino [0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl]. Nato smo membrane 5 min nevtralizirali [1,5 M NaCl, 0,5M Tris-HCl (pH 7,4)] in na

⁴⁶ Ali 10 pg plazmidne DNA v postopku preizkusa kompetentnosti novo nastavljenih celic.

⁴⁷ Izopropil tiogalaktozid.

⁴⁸ 5-bromo-4-kloro-3-indolil galaktozid.

koncu za 5 min prenesli v pladenj s papirjem, omočenim z $2 \times$ SSC (Sambrook in Russell, 2001).

- (d) Membrane smo s kolonijami navzgor na filter papirju zračno posušili (vsaj 30 min).
- (e) DNA smo kovalentno vezali na membrano s pomočjo UV transiluminatorja (310 nm) 2 min s kolonijami, obrnjenimi proti UV viru.
- (f) Membrane smo omočili v $2 \times$ SSC pufru, jih namestili v 100 ml-hibridizacijske steklenice, dodali 5 ml proteinaznega K pufra [10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % SDS] in 250 µg encima proteinaze K [iz založne raztopine 20 mg/ml pripravljene v 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 mM kalcijev acetat] ter rotirali v hibridizacijski komori pri 55 °C vsaj 4 ure. V tem koraku smo razgradili večino proteinov, ki lahko motijo pri postopku neradioaktivne detekcije. Membrane smo na koncu sprali v $2 \times$ SSC, zračno posušili in shranili pri -20 °C do postopka hibridizacije.

Pri vezavi DNA za hibridizacijo točkovnega odtisa smo na najlonsko membrano, ki smo jo omočili v $2 \times$ SSC pufru in posušili, odpipetirali ustrezno količino DNA (50 ng) v 10 µl in izpostavili UV viru za 2 min. Membrane smo do postopka hibridizacije shranili pri -20 °C.

3.2.5.6.6 Hibridizacija in detekcija

V postopku hibridizacije smo uporabljali hibridizacijski pufer po Westneatu in sod. (1988), mikrosatelitske sonde so bile na 3'-koncu označene z biotinsko molekulo, za detekcijo pa smo uporabljali komercialni komplet Phototope[®]-Star Detection Kit (New England Biolabs), katerega detekcija temelji na vezavi streptavidina na biotinsko označeno sondo, na kompleks se pa nato veže encim alkalna fosfataza s pritrjeno biotinsko molekulo. Encim zatem razgradi kemiluminiscenten substrat CDP-Star[®]. Svetlobo, ki jo oddaja razgrajen substrat, zaznamo na rentgenskem filmu.

Postopek:

- (a) V hibridizacijsko steklenico smo med najlonske mrežice namestili do 4 membrane (predhodno omočene v $2 \times$ SSC) z vezano DNA v 15 ml segrete hibridizacijske raztopine [7 % SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,263 M Na₂HPO₄ (pH 7,2), 1 % BSA] in predhibridizirali pri hibridizacijski temperaturi T_h (preglednica 7). Po 4 urah smo zamenjali hibridizacijsko raztopino z novo (5 ml) in dodali 50 pmol sonde (preglednica 7) označene z biotinom in inkubirali pri hibridizacijski temperaturi preko noči.
- (b) Naslednji dan smo membrane sprali v $2 \times$ SSC + 0,1 % SDS 20 min pri TS, pri temperaturi T_1 in pri temperaturi T_2 (preglednica 7).

Detekcija na membrani je potekala po navodilih proizvajalca kompleta, vsak korak je trajal 5 minut z rotiranjem pri TS.

- (j) Film smo ročno razvili z inkubacijo 2 min⁵⁰ v Kodakovem razvijalcu GBX, sledilo je spiranje v tekoči vodi 30 sec in inkubacija 2 min v Kodakovi fiksacijski raztopini GBX.

3.2.5.6.7 Shranjevanje pozitivnih kolonij

Pozitivne kolonije z močnim hibridizacijskim signalom smo s sterilnim zobotrebcom iz druge gojitvene plošče prenesli v 96-mestno mikrotitersko ploščo z 200 µl gojišča z ampicilinom [50 mg/l], ki je vseboval 90 % LB medija in 10 % 10 × zamrzovalne raztopine [10×: 360 mM K₂HPO₄, 132 mM KH₂PO₄, 17 mM Na-citrat, 4 mM MgSO₄, 68 mM (NH₄)₂SO₄, 44 % glicerol] (Zimmer in Verrinder Gibbins, 1997), inkubirali preko noči pri 37 °C, da so se bakterije pomnožile ter jih do uporabe shranili pri –80 °C.

3.2.5.6.8 Preverjanje dolžine DNA insertov pozitivnih kolonij

S tem postopkom smo določili dolžino vstavljenih fragmentov DNA in se poizkušali izogniti fragmentom identičnih dolžin, ker smo predpostavljali, da imajo ti identična nukleotidna zaporedja.

Protokol:

- (a) V volumnu 20 µl smo pripravili PCR mešanico z naslednjimi komponentami: 1 µl bakterijske kulture iz mikrotiterske plošče, 1 × PCR pufer, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 5-odstoten DMSO in 0,5 µM vektrosko specifičnih začetnih oligonukleotidov T3 in T7 (preglednica 8, uporabljali smo par začetnih oligonukleotidov brez modifikacije).
- (b) DNA smo pomnožili z naslednjim temperaturnim profilom: začetna 5-minutna inkubacija pri 95 °C, sledilo je 35 ciklov pri 94 °C (45 sec), prileganje začetnih oligonukleotidov pri 55 °C (30 sec) in pomnoževanje pri 72 °C (1 min 20 sec), ki so se zaključili z 8-minutno inkubacijo pri 72 °C.
- (c) Pomnožene vzorce smo nanесли na 1,9-odstoten agarozni gel (MetaPhor[®]), analizirali elektroforegrame s primerjavo dolžinskih markerjev in izbrali primerne bakterijske klone (dolžina vstavljenega fragmenta nad 200 bp) za izolacijo plazmidne DNA.

3.2.5.7 Izolacija plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey Nagel) po navodilih proizvajalca.

Protokol:

- (a) V 8 ml LB medija z ampicilinom [50 mg/ml] (v epruveti) smo iz mikrotiterske plošče s sterilnim zobotrebcom nacepili izbrane bakterijske klone in gojili s stresanjem (250 vrt./min) pri 37 °C preko noči.

⁵⁰ Glede na intenzivnost razvijanja filma smo po potrebi spremenili ta čas.

- (b) 4 ml bakterijske kulture smo centrifugirali 30 sec (13.200 g, vsa nadaljna centrifugiranja isto in TS), odlili gojišče in na zraku posušili bakterije.
- (c) Dodali smo 250 μ l pufra A1⁵¹ in z mešanjem razbili skupke celic.
- (d) Nato smo dodali 250 μ l pufra A2, 5-krat rahlo obrnili mikrocentrifugirko in inkubirali pri sobni temperaturi 5 min.
- (e) Dodali smo 300 μ l pufra A3, 5-krat rahlo obrnili mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 min.
- (f) Supernatant smo nanegli na kolono in jo centrifugirali 1 min.
- (g) Kolono smo sprali s 500 μ l na 50 °C segretega pufra AW, zatem smo jo sprali s pufrom A4 in kolono na koncu posušili z 2 min centrifugiranjem.
- (h) Na kolono smo nanegli 60 μ l segretega (50 °C) pufra AE [5 mM Tris-HCl, pH 8,5], počakali 2 min in zbrali vzorec s centrifugiranjem v mikrocentrifugirki.
- (i) Vzorcem smo določili koncentracije spektrofotometrično in z vodo napravili redčitve na 100 ng/ μ l.

3.2.5.8 Določanje DNA zaporedja

Zaporedje DNA smo določili s ciklično reakcijo z označenimi začetnimi oligonukleotidi po uveljavljeni dideoksi metodi (Sanger in sod., 1977). Sekvenčno reakcijo smo ločili s pomočjo avtomatske laserske naprave za določanje zaporedja (ALFexpress II DNA Analysis System, Amersham Biosciences) in analizirali s priloženo programsko opremo (ALFwin Sequence Analyser ver. 2.10, Amersham Biosciences).

Postopek:

- (a) Za vsak vzorec smo pripravili štiri reakcije (za vsako bazo DNA molekule), ki so v skupnem volumnu 8 μ l vsebovale 200 ng matrične plazmidne DNA, 2 pmola začetnega oligonukleotida (preglednica 8) označenega na 5'-koncu s CY5 barvilom in 2 μ l A, C, G ali T reagenta (Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, Amersham Biosciences).
- (b) Reakcije smo termostatirali v napravi za PCR po naslednjem profilu: začetna 5-minutna denaturacija pri 95 °C, ki ji je sledilo 25 ciklov pri 95 °C (30 sec), 56 °C (30 sec) in 72 °C (1 min). Reakcijo smo do uporabe hranili pri -20 °C, vendar ne dlje kot 1 dan.
- (c) Reakcijam smo pred nanosom dodali 7 μ l fuksin-formamidnega barvila (Amersham Biosciences, ne navaja sestave), jo denaturirali 3 min pri 72 °C in hranili na ledu do nanosa na denaturacijski gel [5,75-odstotna Long Ranger gelska raztopina (BMA Products, ZDA), 7 M urea, 1 \times TBE pufer, 60 ml gelske raztopine smo po filtriranju in vakumiranju kemično polimerizirali z 42 μ l TEMED-a in 330 μ l amonopersulfata]. Elektroforetski pogoji so bili naslednji: katodni in anodni pufer je bil 0,5 \times

⁵¹ Proizvajalec ne navaja sestave pufrov v kompletu.

koncentriran TBE, čas elektroforeze 700 min, temperatura gela 55 °C in konstanten tok 25 W.

Preglednica 8: Zaporedje začetnih oligoukletidov uporabljenih v reakcijah določevanja DNA zaporedja, na 5'-koncu so imeli pritrjeno barvilo CY5.

Table 8: Sequences of primers used in sequencing reactions, at 5'-end CY5 dye label was attached.

Ime	Zaporedje 5'-3'
M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG
M13-20	GTAAAACGACGGCCAGT
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC

Za iskanje identičnih zaporedij smo uporabljali demonstracijsko verzijo programa Sequencher (verzija 4.0.5, Gene Codes Corporation, ZDA).

3.2.5.8.1 Iskanje podobnosti v podatkovnih bazah zaporedij

Vsa nukleotidna zaporedja smo pregledali z verzijo programov BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, preglednica 9) (Altschul in sod, 1990) lociranih na strežniku Nacionalnega centra za biotehnoške informacije (Bethesda, ZDA)⁵².

Preglednica 9: Uporabljeni BLAST programi in podatkovne baze za iskanje podobnosti, pri iskanju smo uporabili privzete vrednosti programov.

Table 9: BLAST programs and databases used for similarity searches, basic program values were used in search analysis.

Program	Tip primerjave (naše zaporedje z objavljenimi zaporedji)	Podatkovna baza
BLASTN	nukleotidno zaporedje z nukleotidnim zaporedjem	nr ^a , EST ^b
BLASTX	prevedeno nukleotidno zaporedje v protein s proteinsko bazo	nr
TBLASTX	prevedeno nukleotidno zaporedje v protein s prevedenimi nukleotidnimi zaporedji baze v proteine	nr, EST

^a Večina nukleotidnih ali proteinskih (neponovljivih) zaporedij (angl. non redundant).

^b Nukleotidna zaporedja cDNA zaporedij (angl. expressed sequence tags).

⁵² National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

3.2.6 Izbira začetnih oligonukleotidov

Na podlagi določenega DNA zaporedja smo z uporabo programa Prime, ki je del Wisconsin programskega paketa (Accelrys), lociranega na strežniku Mednarodnega centra za genski inženiring in biotehnologijo v Padričah pri Trstu⁵³, določili pare začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR.

Parametri programa, ki so se razlikovali od osnovnih vrednosti, uporabljeni pri izbiri začetnih oligonukleotidov, so podani v prilogi A. V primeru neuspešne izdelave smo poizkusili izbrati par začetnih oligonukleotidov s spreminjanjem parametrov programa (nižanje ali višanje odstotka vsebnosti GC v začetnem oligonukleotidu in v matrici, dopustili smo večjo razliko optimalnih temperatur začetnih oligonukleotidov, dopustili smo pomnoževanje daljše DNA molekule).

Izdelane pare začetnih oligonukleotidov smo še dodatno analizirali s programom NetPrimer (Premier Biosoft), ki določi nastanek lasničnih zank in dimerov, določi njihovo stabilnost in preveri prisotnost palindromov in ponovitve istih baz. Na podlagi rezultatov tega programa smo izbrali in naročili najbolj optimalen par.

3.2.7 Pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR

V preglednici 12 so predstavljeni izdelani pari začetnih oligonukleotidov za dinukleotidne lokuse, za katere smo poskušali določiti pogoje pomnoževanja v PCR.

3.2.7.1 Začetna optimizacija

Pri določanju začetnih pogojev pomnoževanja lokusov smo se odločili, da bomo poizkusili določiti najoptimalnejše pogoje s spreminjanjem števila ciklov pomnoževanja (koraki po 2 cikla) in iskanjem optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov (s spreminjanjem po korakih navzdol ali navzgor za 2 °C od teoretično določene temperature prileganja). Kot referenčni standard smo pri vsakem paru začetnih oligonukleotidov uporabili plazmidno DNA z insertom, na podlagi katerega zaporedja smo jih izdelali. Pri začetni optimizaciji smo pomnoževali še 6 akcesij hmelja ('Savinjski Golding', K7, No3-38, 'Kirin I', 'Ahil' in 'Brewers Gold').

Kot izhodišče smo vzeli sledeče pogoje pomnoževanja:

- (a) Reakcijski volumen je bil 20 µl s 40 ng hmeljne DNA, 1× PCR pufer, 0,2 mM koncentracija vsakega dNTP-ja, 0,5 µM koncentracija vsakega začetnega oligonukleotida in 0,5 enote encima *Taq* DNA polimeraze.
- (b) Vzorec smo pomnoževali v napravi za PCR PE9700 po naslednjem protokolu: začetna 5-minutna denaturacija pri 95 °C, kateri je sledilo 26 ciklov pri 94 °C (45 sec),

⁵³ International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.

teoretična temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov (30 sec) in pomnoževanje pri 72 °C (1 min 30 sec) in na koncu 8–minutna inkubacija pri 72 °C.

3.2.7.2 Nadaljna optimizacija

Nekateri lokusi so še tudi po začetni optimizaciji kazali izredno šibek ali premočno pomnožen signal ali pa smo pomnožili več nespecifičnih fragmentov, zato smo pri izhodiščnem pogoju pomnoževanja spremenili ali dodali (posamezno ali v kombinaciji):

- (a) Povečali ali zmanjšali koncentracijo $MgCl_2$ v razponu od 0,8 do 3,5 mM.
- (b) Reakciji dodali DMSO do koncentracije 5 %.
- (c) Reakcijo napravili v amonij sulfatnem-tris-BSA pufri [20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,15 mg/ml BSA, 10 mM β -merkaptoetanol, 2,5 mM $MgCl_2$] (Jeffreys in sod., 1988).
- (d) Za pomnoževanje smo uporabili protokol z zniževanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov 13 ciklov (v vsakem ciklu za 0,7 °C), ki se je začel pri 65 °C in zatem nadaljeval še 13 ciklov pri 56 °C⁵⁴.

3.2.7.3 Analiza križancev

V primeru, da se je pri analiziranem lokusu pomnožilo več fragmentov ali smo sumili na pomnoževanje dveh ali več lokusov, smo s parom začetnih oligonukleotidov pomnožili še lokus iz DNA potomcev dveh križanj po najoptimalnejšem protokolu, ki smo ga predhodno določili.

3.2.8 Detekcija pomnoženih mikrosatelitov z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo in vrednotenje elektroforegramov

Za ločevanje pomnoženih vzorcev smo uporabili vertikalno denaturacijsko gelsko elektroforezo, model S2 z velikostjo gela 31 x 38,5 cm (Life Technologies).

Veliko stekleno ploščo smo premazali z 2 ml avtokozmetičnega pripravka Clear Sight™ (The Armor All Products Corporation). Manjšo stekleno ploščo pa smo obdelali s 3-ml 0,0023-odstotne raztopine γ -metakriloksipropil-trimetoksisilana (bind silan), pripravljene v raztopini 95-odstotnega etanola in 0,5-odstotne očetne kisline.

Denaturacijski gel debeline 0,35 mm smo pripravili dan pred elektroforezo, da je v celoti polimeriziral [5 ali 6-odstoten akrilamid : bisakrilamid (odstotek prilagojen dolžini pomnoženih alelov, iz 40 % založne raztopine z razmerjem 19:1), 8 M urea in 1 × TBE elektroforetski puffer, raztopina prefiltrirana skozi 0,22 μ m filter, vakuumirano 5 minut, za vsak ml raztopine gela smo dodali 0,5 μ l TEMED-a in 2 μ l 10-odstotnega amonipersulfata kot katalizatorja polimerizacije].

⁵⁴ "Touch down" protokol.

V katodni puferski posodi smo uporabljali $1 \times$ TBE elektroforetski puffer, v anodni pa mešanico 1 M natrijevega acetata in $0,66 \times$ TBE elektroforetskega pufra. S tem smo dosegli učinek klinastega gela (Sheen in Seed, 1988). Sledila je 45-minutna predelektroforeza gela pri najvišji moči 60 W.

PCR vzorcem smo dodali enak volumen stop barvila [96-odstoten deioniziran formamid, 0,05-odstoten brom fenol modro in 0,05-odstoten ksilen cianol FF] in jih nato denaturirali 5 min pri 95 °C. Po denaturaciji smo jih takoj ohladili na ledu in nanесли (5 μ l) na gel. Isti vzorec smo nanесли na gel dvakrat s 50-minutnim intervalom, elektroforeza pa je potekala pri najvišji moči 60W v skupnem trajanju 120-165 minut (odvisno od dolžine pomnoženih alelov). Nanesli smo tudi 60 ng DNA dolžinskega markerja 30-330 bp AFLP™ DNA Ladder (Life Technologies; 33 fragmentov od 10 do 330 bp in dodatni fragment dolžine 1668 bp), pripravljenega na enak način kot PCR vzorci.

DNA smo zaznali z barvanjem s srebrom, po protokolu Promega Silver Sequence™ z manjšimi modifikacijami (Echt in sod., 1996):

- (a) Po koncu elektroforeze smo takoj ločili steklene plošči in dali manjšo ploščo s prilepljenim gelom v 1,2 l fiksacijske raztopine [7,5-odstotna očetna kislina (v/v)] in stresali 20 min.
- (b) Gel smo nato trikrat po 2 minuti spirali v bidestilirani vodi.
- (c) Sledilo je 30-minutno stresanje v raztopini za barvanje (1,2 l) [0,1-odstotni (w/v) srebrov nitrat, 0,056-odstoten (v/v) formaldehid].
- (d) Gel smo potopili v bidestilirano vodo (3-5 sekund) in ga stresali v ohlajenem (4-10 °C) razvijalcu (1,2 l) [3-odstoten (w/v) natrijev karbonat, 0,0002-odstoten (w/v) natrijev tiosulfat in 0,056-odstoten (v/v) formaldehid]. Po pojavu prvih črt smo dodali še 0,8 l razvijalca in razvijali gel do željene intenzitete. Proces razvijanja smo zaustavili s fiksacijsko raztopino ohlajeno na 4 °C.
- (e) Elektroforegrame smo posneli z računalnikom in s pomočjo dolžinskih markerjev, alelov in fragmentov, ki so bili posledica zdrsa polimeraze, uspešno določili dolžine alelov v bp.

3.2.9 Statistična obdelava podatkov

Za analizirane genotipe hmelja smo pri nedvoumno kodominantnih lokusih določili genotipsko specifične alele, število alelov na lokus in število homozigotov ter izračunali statistične vrednosti za lokuse – mere raznolikosti in razločevanja, ki so predstavljene v nadaljevanju.

(a) frekvenca alelov (p_i)

To je delež posameznega alela v populaciji, ki se izračuna po formuli:

$$p_i = \frac{\text{pogostnost } i \text{ - tega alela v populaciji}}{\text{pogostnost vseh alelov v populaciji}}$$

(b) **dejanska heterozigotnost (H_o)** (Ayala in Kiger, 1980)

To je delež posameznikov v populaciji (vzorcu), ki so heterozigotni. Izračuna se po formuli:

$$H_o = \frac{\text{število heterozigotnih posameznikov}}{\text{število posameznikov v populaciji}}$$

(c) **pričakovana heterozigotnost (H_e)** (Ayala in Kiger, 1980)

To so vsote kvadriranih vrednosti frekvenc lokusa, ki jih odštejemo od vrednosti 1. Ta koeficient so razvili predvsem za samoprašne populacije, kjer je večina posameznikov homozigotnih, lokus pa je v populaciji lahko zelo variabilen:

$$H_e = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right), \text{ kjer je } n \text{ število alelov na lokus.}$$

(d) **informacijska vrednost polimorfizma (PIC)** (Botstein in sod., 1980; Hearne in sod., 1992)

Vrednost PIC prav tako izračunamo iz vrednosti frekvenc alelov in jo uporabljamo predvsem kot merilo, ali je lokus primeren za gensko kartiranje. Izračunamo jo po naslednji formuli:

$$\text{PIC} = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j^2.$$

(e) **verjetnost enakosti genotipov (PI)** (Paetkau in sod., 1995)

Višja vrednost PI nam kaže na nizko informativnost lokusa, kar je ponavadi posledica nizkega števila alelov ali pa visoke frekvence enega izmed alelov. Izračunamo jo po naslednji formuli:

$$\text{PI} = \sum_{i=1}^n p_i^4 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j>1}^n (2p_i p_j)^2.$$

(f) **število učinkovitih alelov na lokus** (Morgante in sod., 1994)

Vrednost je različna od dejanskega števila alelov na lokus, saj redki aleli praktično ne doprinesejo nič h končni vrednosti. Število učinkovitih alelov na lokus je obratno vrednosti vsot kvadriranih frekvenc alelov lokusa:

$$n_e = \left(\sum_i p_i^2 \right)^{-1}.$$

(g) **frekvenca ničtih alelov** (Brookfield, 1996)

Pri izračunu smo uporabili formulo, ki uporablja pričakovano in dejansko heterozigotnost:

$$r = \frac{(H_e - H_0)}{(1 + H_e)}$$

Vrednosti frekvenc alelov, dejansko in pričakovano heterozigotnost, verjetnost enakosti genotipov in frekvenco ničtih alelov smo izračunali s pomočjo računalniškega programa Identity 1.0 (Wagner in Sefc, 1999), informacijsko vrednost polimorfizma s programom Cervus 2.0 (Marshall in sod., 1998; Slate in sod., 2000), število efektivnih alelov smo določili v Excel tabeli, genotipsko specifične alele pa s pomočjo programa Microsat 1.5 (Minch, 1997).

3.2.10 Objava nukleotidnih zaporedij v GenBank

Nukleotidna zaporedja 13-ih mikrosatelitskih lokusov smo predložili ameriški podatkovni bazi (GenBank) (stanje na dan 28. avgust 2002). Za ureditev podatkov v potrebno obliko smo uporabili program Sequin 4.00⁵⁵. Nukleotidnim zaporedjem so bile določene akcesijske številke AF515712-AF515724 in so dostopne preko treh javnih bank zaporedij.

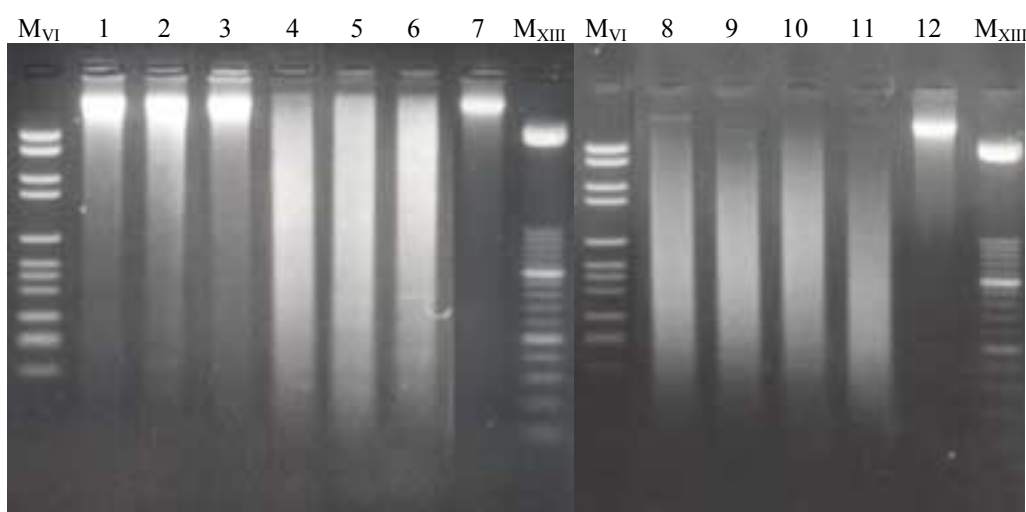
⁵⁵ Dostopen brezplačno preko anonimnega FTP strežnika: <ftp.ncbi.nih.gov/sequin/>.

4 REZULTATI

4.1 IZDELAVA OBOGATENE GENOMSKE KNJIŽNICE HMELJA

4.1.1 Restrikcija DNA

Pred izdelavo genomske knjižnice smo DNA hmelja razrezali s kombinacijo RE, ki smo jo izbrali tako, da je bila večina restriksijskih fragmentov krajša od 1000 bp. Testirali smo priporočene kombinacije RE (Hamilton in sod., 1999), za primerno kombinacijo pa smo se odločili po njihovem preizkušanju. Pri testiranju posameznih RE pa smo tudi grobo ocenili pogostnost restriksijskih mest v genomski DNA.



Slika 2: Testiranje različnih kombinacij RE in groba ocena števila restriksijskih mest za posamezne encime v genomu hmelja. M sta dolžinska markerja št. 6 in 13, vzorci pa so naslednji: 7 in 12 – 500 ng visokomolekularne genomske DNA hmelja; razrezana DNA (300 ng) z RE: 1 – *NheI*, 2 – *XmnI*, 3 – *HaeII*, 4 – *AluI*, 5 – *HaeIII*, 6 – *RsaI*, 8 – *NheI+AluI+HaeII+HaeIII* (še vedno viden del visokomolekularne genomske DNA), 9 – *NheI+AluI+HaeII+RsaI*, 10 – *NheI+HaeII+HaeIII+RsaI* in 11 – *NheI+AluI+HaeIII+RsaI* (večina fragmentov pod 1000 bp).

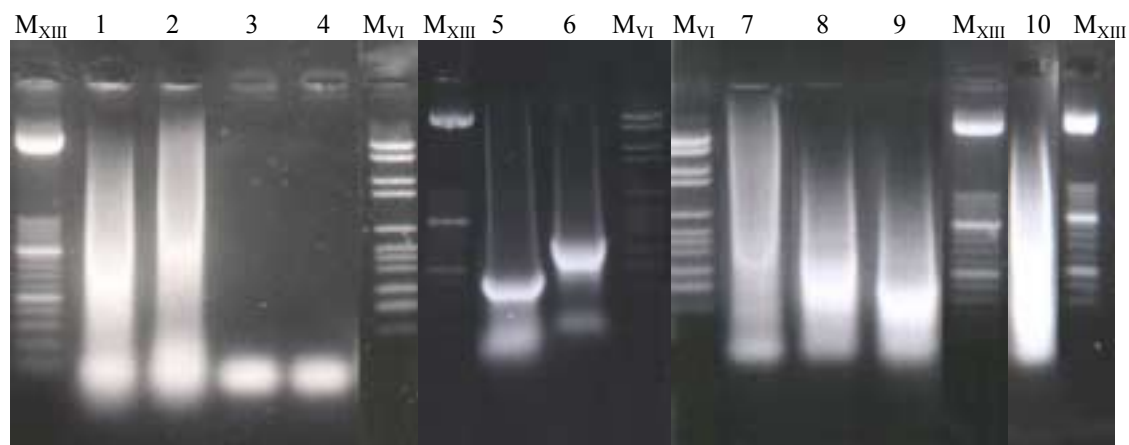
Figure 2: Testing of different combinations of restriction enzymes (RE) and rough estimate of restriction sites for enzymes used in hop genome. M are length markers no. 6 and 13, samples are as follows: 7 and 12 – 500 ng of high molecular weight hop genomic DNA; digested DNA (300 ng) with RE: 1 – *NheI*, 2- *XmnI*, 3 – *HaeII*, 4 – *AluI*, 5 – *HaeIII*, 6 – *RsaI*, 8 – *NheI+AluI+HaeII+HaeIII* (minor whole genomic DNA band is still visible), 9 – *NheI+AluI+HaeII+RsaI*, 10 – *NheI+HaeII+HaeIII+RsaI* and 11 – *NheI+AluI+HaeIII+RsaI* (majority of fragments below 1000 bp).

Iz elektroforegrama (slika 2) lahko s primerjanjem restriksijskih vzorcev z nerazrezano genomsko DNA vidimo, da imajo RE *NheI*, *XmnI* in *HaeII*, s prepoznavnimi zaporedji 6, 10 in 6 bp, zelo malo restriksijskih mest v genomski DNA hmelja, saj je večinski del visokomolekularne DNA hmelja ostal nerazrezan. RE s 4 bp dolgimi prepoznavnimi zaporedji (*AluI*, *HaeIII* in *RsaI*) pa cepijo genomsko DNA hmelja pogosteje, vendar je še vedno prisoten velik delež DNA fragmentov, daljših od 2000 bp, pa tudi manj intenziven fragment celotne visokomolekularne DNA je še vedno viden pri vseh treh restrikcijah. Na

podlagi elektroforetskega vzorca restrikcijskih vzorcev smo za najprimernejšo kombinacijo izbrali set RE *NheI*+*AluI*+*HaeIII*+*RsaI*. To smo v nadaljevanju uporabili za razrez hmeljne DNA.

4.1.2 Izdelava mikrosatelitskih sond

Di-, tri- in tetranukleotidno sondo za lovljenje mikrosatelitskih DNA fragmentov smo uspešno izdelali s pomočjo PCR, v kateri sta se podaljševala dva komplementarna oligonukleotida. V primeru dinukleotidne (AT)_n in trinukleotidne (TAA)_n mikrosatelitske ponovitve pa postopek ni bil uspešen, saj nismo uspeli podaljšati začetnih oligonukleotidov, smo pa te sonde uspešno izdelali s pomočjo zdrsa Klenowega encima (Schlötterer in Tautz, 1992).



Slika 3: Izdelava dolgih mikrosatelitskih sond s podaljševanjem v PCR (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 in 10) ali s pomočjo zdrsa s Klenowim encimom (5 in 6). M – dolžinska markerja št. 6 in 13, vzorci sond: 1- GT, 2 – GA, 3 – AT, PCR, 4 – TAA, PCR, 5 – AT, Klenow encim, 6 – TAA, Klenow encim, 7 – AGA, 8 – ACA, 9 – CAG in 10 – ACTC.

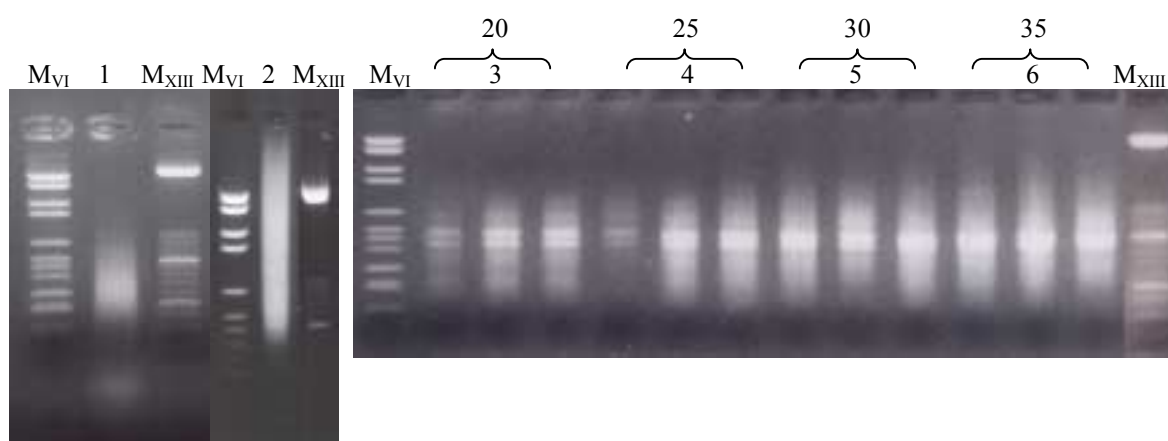
Figure 3: Long microsatellite probe elongation in PCR (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 and 10) or in slippage reaction with Klenow enzyme (5 and 6). M – length markers no. 6 and 13, probe samples: 1- GT, 2 – GA, 3 – AT, PCR, 4 – TAA, PCR, 5 – AT, Klenow enzyme, 6 – TAA, Klenow enzyme, 7 – AGA, 8 – ACA, 9 – CAG and 10 – ACTC.

Na sliki 3 lahko vidimo, da smo dinukleotidni sondi GT (1) in GA (2) uspešno podaljšali v PCR po opisanem protokolu. Najdaljši pomnoženi fragmenti so bili daljši od 2000 bp, glavnina fragmentov je bila pri GT sondah dolgih od 200 do 450 bp, GA sonde pa so bile nekoliko daljše, od 350 do 550 bp. Pri podaljševanju AT in TAA sond, pa jih kljub ponavljanju in spreminjanju pogojev (spreminjanje koncentracije Mg⁺⁺, povečevanje količine encima) nismo uspeli podaljšati (3 in 4). Smo pa jih uspešno podaljšali s pomočjo zdrsa in s podaljševanjem koncev s Klenowim encimom (5 in 6). Lahko vidimo, da se v tem procesu začetni oligonukleotidi podaljšujejo enakomerno in da se večina nahaja v istem dolžinskem območju. AT sonde so bile tako po 16 urah dolge okrog 200 bp, TAA sonde pa so bile nekoliko daljše (okrog 350 bp). Ostale trinukleotidne sonde in tetranukleotidno sondo smo uspešno podaljšali v PCR (AGA-7, ACA-8, CAG-9 in ACTC-

10, slika 3). Glavnina sond se je nahajala pri AGA mikrosatelitu okrog 350 bp, pri ACA okrog 250 bp, pri CAG pa le okrog 150 bp. Tetranukleotiden mikrosatelit ACTC pa smo podaljšali zelo enakomerno v območju od 550 do 1000 bp.

4.1.3 Lovljenje mikrosatelitov

Ulovljene enoverižne DNA fragmente smo v vseh primerih lovljenja prevedli (pomnožitev PCR produkta) v dvoverižne z 20-35 cikli v PCR (slika 4).

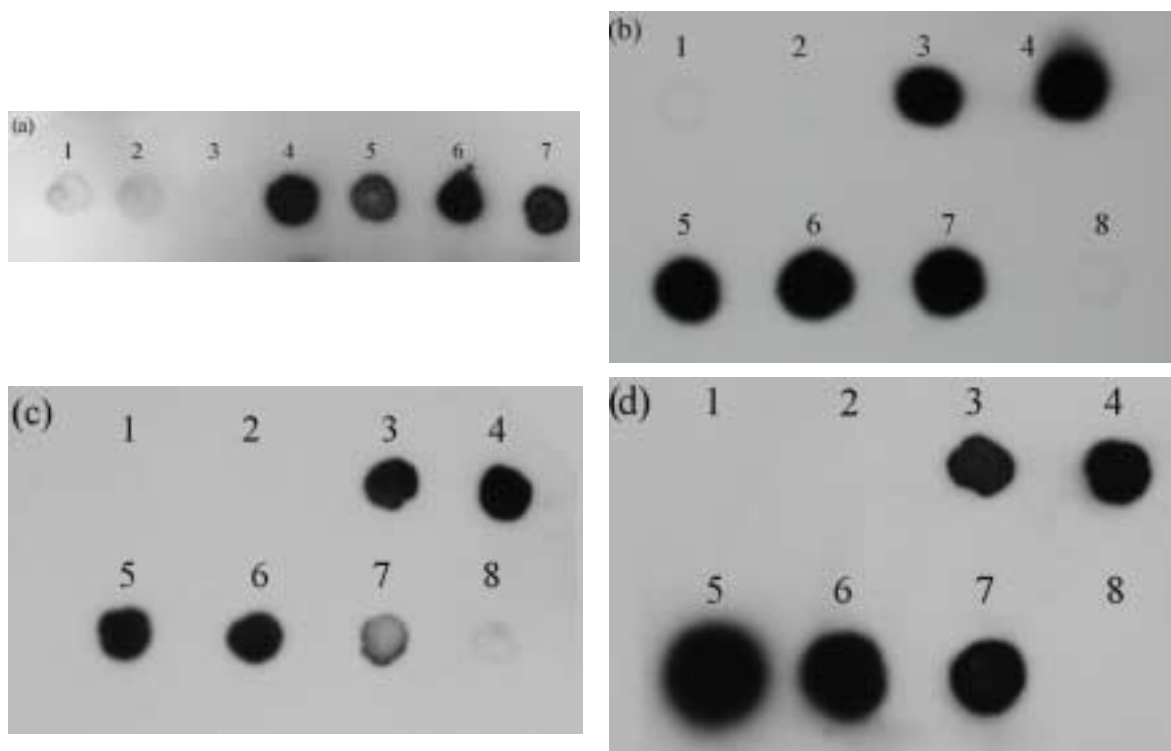


Slika 4: Primer pomnoževanja DNA vzorca po lovljenju. M - dolžinska markerja št. 6 in 13, 1 – vzorec GT pomnožen s 25-imi cikli, 2 – vzorec CAG pomnožen s 25-imi cikli; oba primera sta najidealnejši vzorec, kjer dobimo enakomerno pomnožene fragmente, 3-6 – vzorec AGA pomnožen z 20-35 cikli, kjer smo variirali količino vhodnega DNA vzorca (1, 5 in 20 μ l); v vseh primerih sta vedno prisotna dva močnejše pomnožena fragmenta.

Figure 4: Amplification of DNA samples after enrichment step. M - length markers no. 6 and 13, 1 – GT sample amplified with 25 cycles, 2 – CAG sample amplified with 25 cycles; in both cases the most appropriate amplification pattern was achieved with even amplification smear, 3-6 – AGA sample amplified with 20-35 cycles, where amount of sample DNA was varied (1, 5 and 20 μ l); two strong bands were amplified in all cases.

Tako smo npr. v primeru spranega vzorca GT (slika 4, vzorec 1) po 25 ciklih dobili idelen vzorec brez prisotnih močnih fragmentov, enako je bilo v primeru CAG vzorca (slika 4, vzorec 2), le da so bili tu pomnoženi fragmenti mnogo daljši kot je bila dolžina vhodnih DNA fragmentov (do 1000 bp), pomnožili so se fragmenti daljši od 2000 bp. Možno je, da se pri spiranju fragmentov z membrane sperejo tudi slabo pritrjene sonde, ki služijo kot začetni oligonukleotidi v PCR. Preverili smo tudi to možnost in napravili PCR brez prisotnega SNXfor začetnega oligonukleotida, vendar nismo tudi po 35 ciklih pomnožili produkta. V večini ostalih primerov pa je bilo izredno težko dobiti enakomerno pomnožen vzorec, kar je vidno iz slike (slika 4, vzorci 3-6) na primeru lovljenja AGA ponovitev, kjer smo variirali količino vhodne DNA in število ciklov. V vseh primerih sta se močnejše pomnožila dva fragmenta. To je zelo nezaželeno, saj je v primeru da gre za identičen fragment njegov delež v knjižnici izredno visok.

Pred izdelavo knjižnice smo še preverili stopnjo obogatitve vzorca z mikrosatelitskimi lokusi s hibridizacijo točkovnega odtisa (razen pri AT ponovitvah zaradi samokomplementarnosti sonde) in s primerjanjem intenzitete enake količine ulovljenega vzorca z genomsko DNA hmelja in LN-DNA fragmenti, ki smo jih uporabili za lovljenje. Primeri so prikazani na sliki 5.



Slika 5: Preverjanje stopnje obogatitve vzorca s hibridizacijo točkovnega odtisa za (a) GA, (b) ACA, (c) AGA in (d) CAG ponovitve; (a): 1 – genomsko DNA hmelja, 2 – genomsko DNA hmelja po restrikciji 3 – LN-DNA fragmenti, 4 – vzorec ulovljen z GA dolgimi sondami, 5 – vzorec ulovljen z $(GA)_{15}$ sondami, 6 – GA sonde pripravljene v PCR, 7 – $(TC)_{10}$ sondi komplementaren oligonukleotid, vsi vzorci 50 ng DNA; (b), (c) in (d): 1 – in 8 – genomsko DNA hmelja, 2 – LN-DNA fragmenti, 3 – in 4 – ulovljen vzorec, 5 – in 6 – sonde pripravljene v PCR, 7b – $(TTG)_6$ sondi komplementaren oligonukleotid, 7c – $(TTC)_6$ sondi komplementaren oligonukleotid, 7d – $(GCT)_5$ sondi komplementaren oligonukleotid, vzorec 4 200 ng DNA, vzorec 6 600 ng DNA, vsi ostali vzorci 50 ng DNA.

Figure 5: Dot blot hybridisation check of enrichment success for GA (a), ACA (b), AGA (c) and CAG (d) tandem repeats; (a): 1 – hop genomic DNA, 2 – restricted hop DNA, 3 – LN-DNA fragments, 4 – sample enriched with long GA probes, 5 – sample enriched with $(GA)_{15}$ probes, 6 – GA PCR probes, 7 – $(TC)_{10}$ probe complementary oligo, all samples 50 ng of DNA; (b), (c) and (d): 1 and 8 – hop genomic DNA, 2 – LN-DNA fragments, 3 and 4 – enriched sample, 5 and 6 – PCR made probes, 7b – $(TTG)_6$ probe complementary oligo, 7c – $(TTC)_6$ probe complementary oligo, 7d – $(GCT)_5$ probe complementary oligo, sample 4 200 ng of DNA, sample 6 600 ng of DNA, all other samples 50 ng of DNA.

Pri hibridizaciji točkovnega odtisa GA vzorcev vidimo vpliv uporabe dolgih sond pri lovljenju mikrosatelitskih fragmentov, saj ima ta vzorec (slika 5, vzorec 4a) dvakrat večjo intenziteto kot vzorec, ulovljen z oligonukleotidnimi $(GA)_{15}$ sondami (slika 5, vzorec 5a, primerjano z denzitometrijo slike). Pri vseh ponovitvah, razen pri TAA in ACTC, smo v

ulovljenem vzorcu s hibridizacijo dokazali obogatitve vzorcev in smo jih uporabili pri izdelavi knjižnice. Pri TAA ponovitvah je bil hibridizacijski signal vzorca genomske DNA enak intenziteti signala ulovljenega vzorca, vendar je bila jakost signala primerljiva z jakostjo ostalih mikrosatelitskih sond, zaradi česar smo se odločili za izdelavo knjižnice. Pri ACTC ponovitvah pa je bila jakost signala genomske in ulovljene DNA zopet primerljiva, vendar izredno šibka, kar je kazalo na nizek delež ACTC ponovitev v ulovljenem vzorcu. Trditev smo potrdili z izdelavo genomske knjižnice, v kateri je bil nizek odstotek klonov z ACTC mikrosatelitskim insertom.

4.1.4 Izdelava knjižnic

Kompetentne celice *E. coli* genotipa XL-10 Gold smo uspešno izdelali po SEM metodi (Inoue in sod., 1990) z dodatkom 1-odstotne koncentracije aminokislina glicina v gojišče (Akhtar in sod., 1999). S to metodo smo dosegli kompetenco 4×10^8 cfu/ μg^{56} nerazrezanega plazmida, ki pa je nekoliko nižja od objavljene kompetence avtorjev metode ($1-3 \times 10^9$ cfu/ μg).

S hibridizacijo replik knjižnic smo preverili različno število rekombinantnih klonov za posamezne mikrosatelitske ponovitve in dobili rezultate, ki so predstavljeni v preglednici 10. Zaradi samokomplementarnosti AT ponovitev smo se odločili, da bomo iz te knjižnice določili nukleotidno zaporednje 10-im naključno izbranim klonom, na podlagi katerega bomo ugotovili odstotek obogatitve za mikrosatelitske inserte.

Preglednica 10: Število hibridizacijsko pregledanih kolonij v 7-ih genomskih mikrosatelitskih knjižnicah ter število in delež pozitivnih kolonij glede na hibridizacijski signal.

Table 10: Number of colonies screened in seven genomic microsatellite libraries, number and percentage of positives according to hybridisation signal counts.

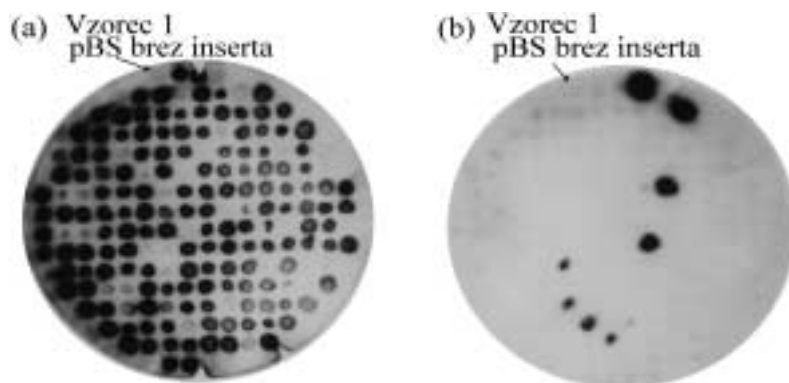
	Mikrosatelitske ponovitve							Skupaj
	GA	GT	AGA	ACA	CAG	TAA	ACTC	
št. pregledanih kolonij	2790	1020	930	744	2232	744	558	9018
št. pozitivnih kolonij glede na hibridizacijski signal	1038	358	263	214	515	0	11	2399
delež pozitivnih [%]	37	35	28	29	23	0	2	27 ^a

^a Rezultati TAA knjižnice so tudi upoštevani v povprečnem deležu pozitivnih kolonij, brez tega je delež 29 %.

Pri hibridizacijskem testiranju TAA knjižnice tokrat nismo dobili izrazito pozitivnih signalov (pri hibridizacijskem testiranju točkovnega odtisa smo dobili po jakosti enakovredna signala tako v genomskem kot v obogatnem vzorcu), zato smo se odločili enako kot pri AT knjižnici za določanje nukleotidnega zaporedja naključno izbranim trem klonom.

⁵⁶ Angl. Colony Forming Units.

Primer rezultata hibridizacijskega testiranja replik (rentgenski posnetek) GT in ACTC knjižnic je prikazan na sliki 6 (a in b).



Slika 6: Pozitivni hibridizacijski signali testiranja membrane s 186-imi replikami rekombinantnih kolonij GT (a) in ACTC (b) knjižnice, s 37- in 2-odstotnim deležem pozitivnih klonov.

Figure 6: Positive signals of hybridisation replica testing of 186 recombinant clones from GT (a) and ACTC (b) libraries with 37 and 2 % of positive clones.

4.1.5 Analiza dolžine DNA insertov

Dolžino DNA insertov v bakterijskih klonih smo preverili v PCR, v kateri smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida T3 in T7, ki sta specifična za vektor⁵⁷. Velikost DNA insertov smo določili s pomočjo elektroforegramov ločenih na MetaPhor[®] agaroznem gelu, ki ima visoko sposobnost ločevanja (odkrije razlike okrog 10 bp). Dolžina vstavljenih fragmentov se je v vseh primerih gibala od 200 do 1000 bp, kar je pričakovana dolžina DNA insertov (slika 7).

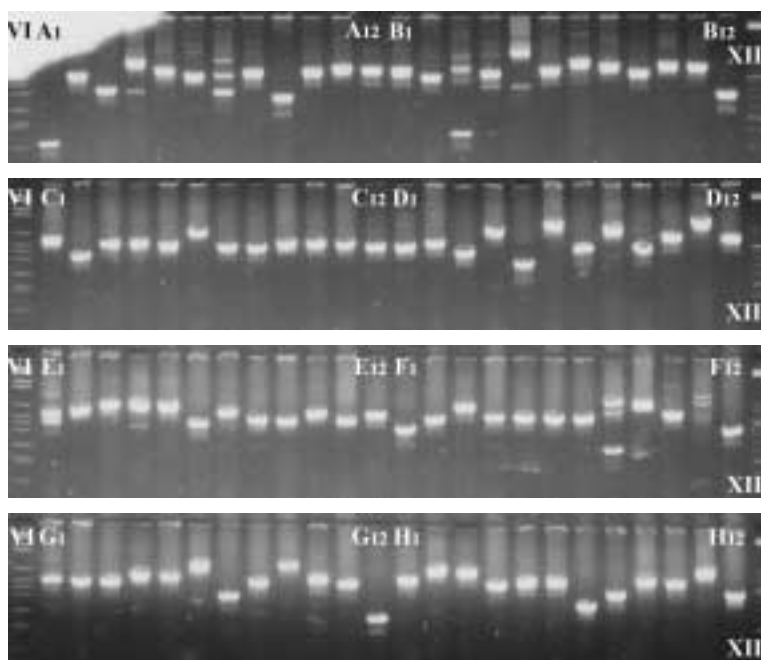
Fragmentom smo ocenili dolžine in naključno izbrali za določanje nukleotidnega zaporedja bakterijske klone, ki so izpolnjevali sledeče pogoje: da so se med seboj razlikovali po dolžini za vsaj 20 bp, da so bili daljši od 350 bp (tako smo dobili vsaj 168 bp uporabnega nukleotidnega zaporedja, ker se z vektorsko specifičnima začetnima oligonukleotidoma T3 in T7 pomnoži tudi 168 bp plazmidne DNA in 7 bp linkerja) in da smo pri pomnoževanju inserta dobili pomnožen samo en fragment (npr. slika 7, klona A7 in B3 nismo vključili v določevanje nukleotidnega zaporedja, ker smo pomnožili 3 oz. 2 fragmenta različnih dolžin, kar je lahko posledica mešane bakterijske kulture).

4.1.6 Določevanje nukleotidnega zaporedja

Skupno smo določili nukleotidno zaporedje 143-im klonom iz 8-ih mikrosatelitskih knjižnic. Pri preverjanju duplikacij smo ugotovili, da smo dobili 88 različnih zaporedij, kar predstavlja 62 % vseh klonov, ki smo jim določali nukleotidno zaporedje.

⁵⁷ V začetku smo poizkusili pomnožiti inserte z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma M13rev in M13-20, vendar tudi po spreminjanju pogojev nismo uspeli z njima dobiti pomnoženih fragmentov.

Trem domnevno pozitivnim vzorcem TAA knjižnice smo določili nukleotidno zaporedje, vendar ni nobeden klon vseboval mikrosatelitskega zaporedja. Tudi pri določevanju nukleotidnega zaporedja desetim naključno izbranim klonom AT knjižnice nismo dobili zaporedij z mikrosatelitom. Mikrosatelita niso vsebovali še kloni ACA6, AGA10 in CAG3. Rezultati določevanja zaporedij po posameznih knjižnicah so podani v preglednici 11.



Slika 7: Primer ocenjevanja velikosti DNA insertov AGA knjižnice shranjene v mikrotitrski plošči (96 vzorcev, A₁ – H₁₂). Vzorec A₁ je plazmid brez inserta, ki pomnoži fragment dolžine 168 bp, VI in XIII sta dolžinska markerja.

Figure 7: Example of DNA inserts length screening in AGA library stored in microtiter plate (96 samples, A₁ – H₁₂). Sample A₁ is plasmid without insert, where band of 168 bp is amplified, VI and XIII are length markers .

Preglednica 11: Klone, katerim smo določili nukleotidno zaporedje, njihova dolžina v bp, mikrosatelitsko zaporedje, število klonov z istim DNA insertom, primernost za izdelavo začetnih oligonukleotidov in tip mikrosatelitske ponovitve klona glede na razdelitev predstavljeno v poglavju 2.1.1 Opisi in definicije.

Table 11: Sequenced clones, length in bp, microsatellite core motif, number of clones with identical sequence, their suitability for primer design and type of microsatellite according to definitions described in chapter 2.1.1 Descriptions and definitions.

Knjiž./ Klon	Dol. (bp)	Mikrosatelitsko zaporedje (5'-3')	Št. klonov	Uporabnost	Tip mikrosatelita
GA knjižnica					
GA1	459	(CT) ₃ N ₃ (TC) ₄ N ₆ (CT) ₆ T(TC) ₃	4	+	prekinjen
GA2	457	(CT) ₂ N ₂ (TC) ₁₇ (TC) ₄ C(CT) ₃	1	+	prekinjen
GA3	328	(GA) ₄ N ₇ (GA) ₂ A ₃ (GA) ₁₁	2	+	prekinjen
GA4	299	(AG) ₁₇	2	+	popoln

Se nadaljuje/It follows.

Nadaljevanje preglednice 11: Kloni, katerim smo določili nukleotidno zaporedje, njihova dolžina v bp, mikrosatelitsko zaporedje, število klonov z istim DNA insertom, primernost za izdelavo začetnih oligonukleotidov in tip mikrosatelitske ponovitve klona glede na razdelitev predstavljeno v poglavju 2.1.1 Opisi in definicije.

Continuation of table 11: Sequenced clones, length in bp, microsatellite core motif, number of clones with identical sequence, their suitability for primer design and type of microsatellite according to definitions described in chapter 2.1.1 Descriptions and definitions.

Knjiž./ Klon	Dol. (bp)	Mikrosatelitsko zaporedje (5'-3')	Št. klonov	Uporabnost	Tip mikrosatelita
GA5	566	(CT) ₄ N ₄ (CT) ₁₆	11	+	prekinjen
GA6	394	(CT) ₁₄	5	-	popoln
GA7	524	(TC) ₁₀ N ₈ (TC) ₁₄	2	+	prekinjen
GA8	363	(TC) ₉ C(CT) ₃ A ₄ C ₆ (CT) ₄ A ₂ (CT) ₂	1	+	prekinjen
GA9	342	(GA) ₁₄ GC(GA) ₄ A ₂ (GA) ₅	2	+	prekinjen
GA10	395	(TTC) ₂ (TC) ₈ G(CT) ₄	2	+	sest., prekinjen
GA12	326	(GA) ₁₈	1	+	popoln
GA13	398	(TC) ₄ N ₃ (CT) ₂ (CA) ₂ T(TC) ₉	1	+	sest., prekinjen
GA14	257	(CT) ₁₈	1	-	popoln
GA15	399	(CTT) ₄ (TC) ₄ N ₈ (TC) ₉	1	+	sest., prekinjen
GA16	442	(GA) ₂ N ₂ (GA) ₈ N ₄ (GA) ₃ N ₃ (GA) ₄	1	+	prekinjen
GA17	657	(GA) ₅ N ₁₁ (GA) ₁₆ (AT) ₂	1	+	sest., prekinjen
GA18	439	(CT) ₄ A(CT) ₃ N ₃ T ₃ (CT) ₇ N ₂ (CT) ₂	1	+	prekinjen
GA19	369	(TC) ₅ AGC ₃ A ₃ (CT) ₅ AACA(TC) ₃ AT (TC) ₃ TA(TC) ₃ G(CT) ₃ CA(CT) ₅	1	+	prekinjen
GA20	411	(CT) ₁₁	1	+	popoln
GA21	373	(GA) ₆ N ₂ (GA) ₄ A ₂ (GA) ₂ A ₂ (GA) ₄ N ₁₅ (GA) ₇ N ₃ (GA) ₃	1	+	prekinjen
GA22	413	(GA) ₁₀ A ₄ (GA) ₆	1	+	prekinjen
GA23	660	(CT) ₂₄	1	+	popoln
GA24	522	(GA) ₅ N ₃ A ₃ (GA) ₃ N ₃ A ₃ (GA) ₁₂ A(GA) ₆	1	+	prekinjen
GA25	347	(GA) ₁₀ N ₉ (AG) ₄ A ₂ G(GA) ₂ (GAAA) ₂	1	+	sest., prekinjen
GA26	519	(CT) ₈ T ₄ (CT) ₂ T ₂ (CT) ₅	1	+	prekinjen
GA27	483	(AG) ₂₃	1	+	popoln
GA28	256	(CT) ₂₁ (CA) ₈	1	+	sest., popoln
GA29	376	(CT) ₁₈ (CA) ₁₀	3+1GT	+	sest., popoln
Skupaj	11774		53/28		
GT knjižnica					
GT1	506	(GT) ₁₃ (GA) ₂₅	2	+	sest., popoln
GT2	603	(GT) ₁₄ (GA) ₁₂	3	+	sest., popoln
GT4	707	(TA) ₅ (TG) ₂₁	2	+	sest., popoln
GT5	473	(CT) ₁₃ (CA) ₃ (CT) ₂ (CA) ₁₁	3	+	sest., popoln
GT6	619	(CA) ₃ (CG) ₃ (CA) ₉	2	+	sest., popoln
GT7	408	(CA) ₁₆	1	+	popoln
GT8	576	(CT) ₉ (CA) ₁₀	1	+	sest., popoln
GT9	299	(GT) ₃ (GC) ₂ (GT) ₅ GC(GT) ₃ GC(GT) ₄ (GC) ₂ N ₄ (GT) ₂ N ₈ (GT) ₃	1	+	sest., prekinjen

Se nadaljuje/It follows.

Nadaljevanje preglednice 11: Kloni, katerim smo določili nukleotidno zaporedje, njihova dolžina v bp, mikrosatelitsko zaporedje, število klonov z istim DNA insertom, primernost za izdelavo začetnih oligonukleotidov in tip mikrosatelitske ponovitve klona glede na razdelitev predstavljeno v poglavju 2.1.1 Opisi in definicije.

Continuation of table 11: Sequenced clones, length in bp, microsatellite core motif, number of clones with identical sequence, their suitability for primer design and type of microsatellite according to definitions described in chapter 2.1.1 Descriptions and definitions.

Knjiž./ Klon	Dol. (bp)	Mikrosatelitsko zaporedje (5'-3')	Št. klonov	Uporabnost	Tip mikrosatelita
GT10	264	(CA) ₁₀	1	+	popoln
GT11	891	(CA) ₈ N ₈ (CA) ₁₃ (CT) ₉	1	+	sest., prekinjen
GT12	371	(GT) ₁₁ (AT) ₂	1	+	sest., popoln
GT13	479	(GC) ₃ (AC) ₁₅ (AT) ₅	1	-	sest., popoln
Skupaj	6196		19/12		
AT knjižnica		10 klonov, 8 uporabnih zaporedij, vsi brez MS-ja			
Skupaj	3803		10/8		
ACA knjižnica					
ACA1	565	(AAC) ₃ (CAC) ₂ (AAC) ₃ N ₁₂ (AAC) ₁₃	5	+	sest., prekinjen
ACA2	442	T ₈ (ATT) ₄ (GTT) ₆ N ₆ GTT(GTCACT) ₂ ATT(GTT) ₇	1	+	sest., prekinjen
ACA3	861	(CAA) ₁₅	1	+	popoln
ACA4	491	(TGT) ₁₆	3	+	popoln
ACA5	432	(TTG) ₆ T ₃ (TTG) ₅ TGG(TTG) ₅	1	+	prekinjen
ACA6	228	/	1		
ACA7	328	(TTG) ₁₀	1	+	popoln
ACA8	~920	350 bp se izmenjujejo (TTG) _n , (CTG) _n , (ATG) _n in (CTG) _n motivi	1	+	sest., prekinjen
Skupaj	4267		14/8		
AGA knjižnica					
AGA1	396	(TTC) ₁₉	1	+	popoln
AGA2	482	(TCC) ₃ T(CTT) ₁₅	1	+	sest., prekinjen
AGA3	275	(CTT) ₁₄	1	+	popoln
AGA4	351	(AAG) ₇ N ₈ (AAG) ₁₁ N ₂ (GAA) ₂ N ₃ (AAG) ₂ N ₂ (GAA) ₂ N ₃ (GAA) ₂ (GAA) ₂ (GAT) ₄ (GAA) ₅	1	+	sest., prekinjen
AGA5	409	(GAA) ₁₈	9	+	popoln
AGA6	469	(GAA) ₁₅ N ₃ (GAA) ₂	2	+	prekinjen
AGA7	198	(CAT) ₃ N ₃ (CTT) ₉ N ₃ (CTT) ₃	1	+	sest., prekinjen
AGA8	462	(GAA) ₁₉ N ₃ (GAA) ₃	1	+	prekinjen
AGA9	247	(CTT) ₃ N ₃ (CTT) ₂ (CAT) ₂ (CTT) ₁₅	1	+	sest., prekinjen
AGA10	159	/	1		
AGA11	751	(TTC) ₂₃	1	+	popoln
AGA12	566	(GAA) ₁₆	1	+	popoln
Skupaj	4765		21/12		

Se nadaljuje/It follows.

Nadaljevanje preglednice 11: Kloni, katerim smo določili nukleotidno zaporedje, njihova dolžina v bp, mikrosatelitsko zaporedje, število klonov z istim DNA insertom, primernost za izdelavo začetnih oligonukleotidov in tip mikrosatelitske ponovitve klona glede na razdelitev predstavljeno v poglavju 2.1.1 Opisi in definicije.

Continuation of table 11: Sequenced clones, length in bp, microsatellite core motif, number of clones with identical sequence, their suitability for primer design and type of microsatellite according to definitions described in chapter 2.1.1 Descriptions and definitions.

Knjiž./ Klon	Dol. (bp)	Mikrosatelitsko zaporedje (5'-3')	Št. klonov	Uporabnost	Tip mikrosatelita
CAG knjižnica					
CAG1	255	(TAC) ₄ (TGC) ₅ N ₆ (TAC) ₃ (TGC) ₂ (TAC) ₆ N ₄ (ACT) ₃ N ₃ (ACT) ₉ (GCT) ₇ (ACT) ₂ N ₃ (ACT) ₃	1	+	sest., prekinjen
CAG2	284	(TAG) ₉ N ₃ (TAG) ₂ ((CAG) ₂ GAG) ₂ (CAG) ₁₆ (TAG) ₄	6	-	sest., prekinjen
CAG3	539	/	1		
CAG4	562	od 31 baze naprej MS, različni 3n motivi, zaporedje brez 3' konca	1	-	sest., prekinjen
CAG5	251	(TGG) ₅ (TGC) ₅	1	+	sest., popoln
CAG6	410	od 20 baze naprej MS, različni 3n motivi, zaporedje brez 3' konca	1	-	sest., prekinjen
CAG7	467	od začetka 5' konca MS, različni 3n motivi, zaporedje brez 3' konca	1	-	sest., prekinjen
CAG8	520	od 50 baze naprej MS, različni 3n motivi, zaporedje brez 3' konca	1	-	sest., prekinjen
CAG9	650	pretežno TAG ponavljajoč motiv od 81 do 364 bp	1	+	sest., prekinjen
CAG10	~350	od 28 baze naprej MS, različni 3n motivi, zaporedje brez 3' konca	1	-	sest., prekinjen
CAG11	402	od 35 baze naprej MS, različni 3n motivi	1	-	sest., prekinjen
CAG12	~600	od 191 baze naprej MS, različni 3n motivi, zaporedje brez 3' konca	1	-	sest., prekinjen
Skupaj	5290		17/13		
TAA knjižnica					
Skupaj	1345	3 kloni 1-3, vsi brez MS-ja	3		
ACTC knjižnica					
ACTC1	353	(AGTG) ₇	2	+	popoln
ACTC2	214	(CT) ₂ (CTT) ₂ N ₄ (CACT) ₇ N ₄₃ (CT) ₉	4	-	sest., prekinjen
Skupaj	567		6/2		
Skupaj vse	38.007				

Nukleotidna zaporedja opisana v preglednici 11 so na voljo pri avtorju, zaporedja GA1, GA3, GA4, GA5, GA9, GA29, GT1, GT4, GT5, GT6, GT9, GT10, in GT12 pa so dostopna preko javne baze (akcesijske številke AF515712-AF515724). Primeri mikrosatelitskih nukleotidnih zaporedij, določenih z avtomatskim, laserskim sistemom, so prikazana na sliki 8.

4.1.7 Začetni oligonukleotidi

Na podlagi določenih nukleotidnih zaporedij smo s pomočjo programa Prime izdelali 20 parov začetnih oligonukleotidov za izbrana GA in GT zaporedja mikrosatelitskih ponovitev (preglednica 12).

Preglednica 12: Izdelani pari 20-ih začetnih oligonukleotidov z značilnimi karakteristikami; zaporedje začetnega oligonukleotida, mesto prileganja začetnega oligonukleotida v tarčnem DNA zaporedju, dolžina začetnega oligonukleotida, odstotek vsebnosti baz gvanina in citozina v začetnem oligonukleotidu, predvidena dolžina PCR produkta glede na tarčno DNA zaporedje in predvidena temperatura prileganja para začetnih oligonukleotidov, kot jo je izračunal program Prime.

Table 12: Pairs of 20 developed primers with their characteristics: sequence, annealing place in target DNA, length, percentage of guanine and cytosine bases, predicted length of fragment and theoretical annealing temperature as calculated by software Prime.

Št.	Lokus	5'-3' ^a	M ^b	L ^c	CG ^d	P ^e	T _a ^f
1	HIGA1	GGACCATTTTCAGCTCAAGAT	87-106	20	45,0	183	50,6
		CACAAATTTCCCCCTAAGTAT	269-249	21	42,9		
2	HIGA2	ACGGTTTTTGGATGCTGAG	258-275	18	50,0	196	52,1
		CCCTTAAGCACAAACAAGTATG	453-433	21	42,9		
3	HIGA3	TTTCACCAAATTTCCAAGTGC	2-22	21	38,1	152	52,3
		GGTGCCAAGGGATAGACAT	153-135	19	52,6		
4	HIGA4	CCAACACTAGGGTTTGCATC	64-83	20	50,0	226	51,9
		AGGCTCATCCCAGAAGTATG	289-270	20	50		
5	HIGA5	GTAAGTGCAAACCTTCAGAACAT	86-107	22	36,4	217	50,6
		GCTGGATGAAGTGAGGTAATT	302-282	21	42,9		
6	HIGA9	CAAACCTAGGAACAGAGTCAAGT	207-228	22	40,9	213	53,2
		CCAACGTAAAGCAACCAAC	419-401	19	47,4		
7	HIGA12	GGATGGGACTTTTTGACCTTTGA	8-30	23	43,5	227	53,2
		GGTTTCGACCCCAATGAATGGTA	234-213	22	50,0		
8	HIGA28	CGAGCCTCGGGATTTACTT	5-23	19	52,6	179	52,2
		CCAAAGCCTTCAATTCCTT	183-164	20	45,0		
9	HIGA29	TCCCTCTCATTTTTTTCACACC	52-72	21	42,9	192	54,4
		TCGGGGTCGATAATGGTTA	243-225	19	47,4		
10	HIGT1	CTTTGGAGGAAATAATGGCT	78-97	20	40,0	260	56,8
		AACATCTCACTTCTCTCCCTAA	337-316	22	40,9		
11	HIGT2	GTCCTTCGAGCAAACCTTATA	215-235	21	42,9	218	50,8
		TCACCCCTTATGCCCAATT	432-414	19	47,4		

Se nadaljuje/It follows.

Nadaljevanje preglednice 12: Izdelani pari 20-ih začetnih oligonukleotidov z značilnimi karakteristikami; zaporedje začetnega oligonukleotida, mesto prileganja začetnega oligonukleotida v tarčnem DNA zaporedju, dolžina začetnega oligonukleotida, odstotek vsebnosti baz gvanina in citozina v začetnem oligonukleotidu, predvidena dolžina PCR produkta glede na tarčno DNA zaporedje in predvidena temperatura prileganja para začetnih oligonukleotidov, kot jo je izračunal program Prime.

Continuation of table 12: Pairs of 20 developed primers with their characteristics: sequence, annealing place in target DNA, length, percentage of guanine and cytosine bases, predicted length of fragment and theoretical annealing temperature as calculated by software Prime.

Št.	Lokus	5'-3' ^a	M ^b	L ^c	CG ^d	P ^e	T _a ^f
12	HIGT4	TGGTAGTTATTTTGATTCTGTGC	423-445	23	56,3	195	50,7
		GCAATATTATCAGAAGCAGAAGC	617-595	23	39,1		
13	HIGT5	ATACCCCTCCTGTTTTTCTACC	146-167	22	45,5	208	54,7
		CGTCGGGTTCCAAAGGATT	353-335	19	52,6		
14	HIGT6	GATTGACGCTATGGACCTTATAT	51-73	23	39,1	141	51,9
		TCAACTGACACAAATTACGC	191-172	20	40,0		
15	HIGT7	TTGGTTACCAAAGCATTGAAC	81-101	21	38,1	181	51,6
		GAGAGTCATTCTCAAGAAAAGTC	261-239	23	39,1		
16	HIGT8	TGACTTGAGGCGTTGTTGTTA	230-250	21	42,9	227	53,7
		AGCACTTAAGGTCCTCGGAG	456-437	20	55,0		
17	HIGT9	TCACTGGGCTCTCCAATAG	3-21	19	52,6	198	53,3
		CTGTAAAAAGGAAAGAGCAGG	200-180	21	42,9		
18	HIGT10	GTAACATGATAGCATCAGCC	36-55	20	45,0	229	49,6
		TGTTCCCTTTGTTTTCTACC	264-245	20	40,0		
19	HIGT11	ACATGTAAACACAACCCAA	48-66	19	36,8	208	48,5
		AGAATAGGTTGCATTTTTATTFTA	255-233	23	21,7		
20	HIGT12	CTTCCGAAGACTCATTGAATCA	140-161	22	40,9	161	51,9
		GACGAGATTCTAAGAACCGAG	300-280	21	47,6		

^a Zaporedje začetnega oligonukleotida v 5'-3' smeri.

^b Mesto prileganja začetnega oligonukleotida v tarčnem DNA zaporedju.

^c Dolžina začetnega oligonukleotida.

^d Odstotek vsebnosti baz citozina in gvanina v začetnem oligonukleotidu.

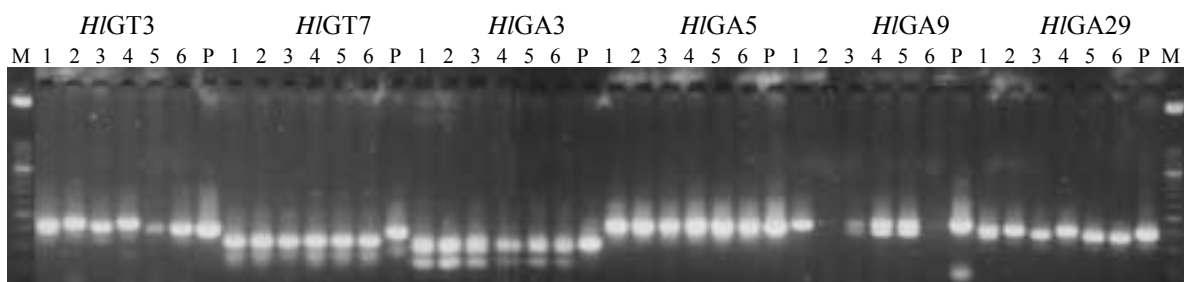
^e Predvidena dolžina PCR produkta glede na tarčno DNA zaporedje.

^f Predvidena temperatura prileganja para začetnih oligonukleotidov, kot jo je izračunal program Prime.

4.2 OPTIMIZACIJA POMNOŽEVANJA

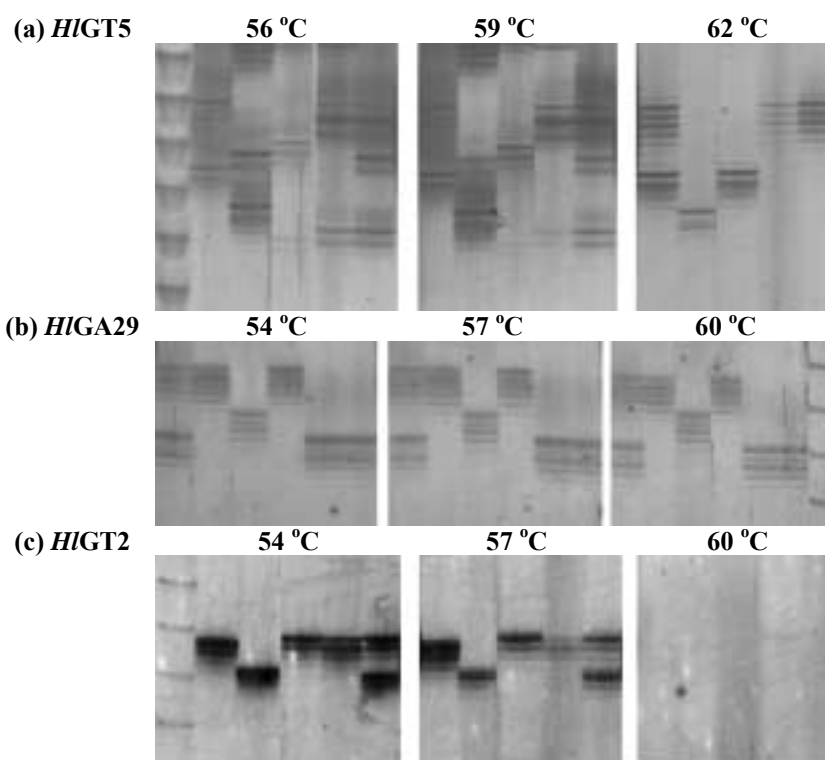
V prvi fazi smo s PCR pomnožili DNA 6-ih vzorcev hmelja s predvideno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov in 35-imi cikli pomnoževanja, rezultate pa preverili na 1,8-odstotnem agaroznem gelu. V vseh 20 primerih smo dobili pomnožene fragmente (slika 9).

Sledila je optimizacija pomnoževanja za prilagoditev ločevanju, detekciji in vrednotenju na denaturacijski PA elektroforezi. Določili smo optimalne pogoje s spreminjanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov in spreminjanjem števila ciklov pomnoževanja (slika 10) in kasneje po potrebi s spreminjanjem reakcijskih pogojev in pogojev pomnoževanja.



Slika 9: Primer začetnega pomnoževanja lokusov *HIGT3*, *HIGT7*, *HIGA3*, *HIGA5*, *HIGA9* in *HIGA29* pri 6-ih vzorcih hmelja (1-6, 'Savinjski Golding', K7, No3-38, 'Kirin', 'Ahil' in 'Brewers Gold') in plazmidu z insertom (P), na podlagi katerega so bili izdelani začetni oligonukleotidi. Na primeru lokusa *HIGT7* lahko opazimo razhajanje v dolžini med plazmidnim insertom in hmeljnimi vzorci.

Figure 9: An example of first amplification of loci *HIGT3*, *HIGT7*, *HIGA3*, *HIGA5*, *HIGA9* and *HIGA29* on 6 hop samples (1-6, 'Savinjski Golding', K7, No3-38, 'Kirin', 'Ahil' in 'Brewers Gold') and plasmid with corresponding DNA insert (P) which was used for primer developing. An example of locus *HIGT7* shows length polymorphism between plasmid insert and hop samples.



Slika 10: Vpliv temperature prileganja začetnih oligonukleotidov na pomnoževanje DNA pri lokusih (a) *HIGT5*, primer močnega vpliva spreminjanja temperature prileganja, predstavljene so tri različne T (56, 59 in 62 °C), (b) *HIGA29*, primer, kjer T od 54 do 60 °C nima vpliva na pomnoževanje in (c) *HIGT2*, kjer se pri 60 °C nič ne pomnoži.

Figure 10: Influence of annealing temperature on DNA amplification at loci (a) *HIGT5*, an example of strong dependence of annealing T on amplification, three different T are presented (56, 59 in 62 °C), (b) *HIGA29*, an example of small influence of annealing T on DNA amplification in the range from 54 to 60 °C and (c) *HIGT2*, where no amplification is obtained at 60 °C.

Z iskanjem kombinacije optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov in števila ciklov pomnoževanja smo uspeli pomnožiti mikrosatelitske lokuse pri 13 parih začetnih oligonukleotidov: *HIGA1*, *HIGA4*, *HIGA9*, *HIGA12*, *HIGA29*, *HIGT1*, *HIGT2*, *HIGT5*, *HIGT6*, *HIGT9*, *HIGT10*, *HIGT11* in pri *HIGT12*.

Pomnoževanje s parom *HIGA3* smo izboljšali v amonij-sulfatnem-BSA pufu (Jeffreys in sod., 1988).

Kompeticijo dolgih in kratkih alelov (Wattier in sod., 1998), ki je bila izražena pri pomnoževanju lokusa *HIGT4*, smo uspešno preprečili s podaljšanjem pomnoževanja pri 72 °C na 2 min.

Za pomnoževanje s pari začetnih oligonukleotidov *HIGA2*, *HIGA28*, *HIGT7* in *HIGT8* pa smo določili pogoje PCR s postopnim nižanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov v začetnih ciklih ("touch down").

Preglednica 13: Pogoji pomnoževanja za izdelane pare začetnih oligonukleotidov.

Table 13: Amplification conditions for developed primer pairs.

Št.	Lokus	Protokol	N	T _A (°C)
1	<i>HIGA1</i>	N ^a	25	56
2	<i>HIGA2</i>	TD ^b	20+9	65↓
3	<i>HIGA3</i> ^c	N	25	60
4	<i>HIGA4</i>	N	28	26
5	<i>HIGA9</i>	N	26	55
6	<i>HIGA12</i>	N	27	60
7	<i>HIGA28</i>	TD	20+6	65↓
8	<i>HIGA29</i>	N	26	57
9	<i>HIGT1</i>	N	28	53
10	<i>HIGT2</i>	N	26	54
11	<i>HIGT4</i> ^d	N	26	57
12	<i>HIGT5</i>	N	29	60
13	<i>HIGT6</i>	N	26	53
14	<i>HIGT7</i>	TD	20+8	65↓
15	<i>HIGT8</i>	TD	20+6	65↓
16	<i>HIGT9</i>	N	32	55
17	<i>HIGT10</i>	N	26	55
18	<i>HIGT11</i>	N	26	55
19	<i>HIGT12</i>	N	26	56

^a PCR protokol, kjer je bila temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov v vseh ciklih enaka.

^b "Touch down" PCR protokol, kjer se je temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov v prvih 20-ih ciklih zniževala za 0,7 °C/cikel iz začetnih 65 °C, in se nato nadaljevala pri 55 °C.

^c Za ta lokus smo pri pomnoževanju uporabljali optimiziran pufer.

^d Čas pomnoževanja je bil podaljšan na 2 min.

Par začetnih oligonukleotidov *HIGA5*, pa je še kljub spreminjanju reakcijskih pogojev (DMSO, višanje in nižanje koncentracije Mg⁺⁺ ionov, spreminjanje količine matrične

DNA) pomnožili v vseh primerih do 15 fragmentov enake intenzitete, ki so bili posledica zdrsa polimeraze. Vrednotenje polimorfizma tega lokusa je bilo tako nemogoče.

Skupno pomnoževanju DNA je bilo: (1) čas pri posameznih temperaturah (45 sec/94 °C, 30 sec pri optimalni temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (T_A , preglednica 13), in pomnoževanje 1 min 30 sec pri 72 °C, razen pri paru *HIGT4*) in (2) reakcijski pogoji (standarden PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3)], razen za par *HIGA3* [20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,15 mg/ml BSA, 10 mM β-merkaptotanol, 2,5 mM MgCl₂], 0,2 mM koncentracija vsakega dNTP-ja, 0,5 μM koncentracija vsakega začetnega oligonukleotida in 0,5 enote *Taq* DNA polimeraze). Število ciklov (N, preglednica 13) smo prilagodili glede na intenziteto pomnoževanja za vsak par posebej.

V vseh primerih smo tudi z enakimi pogoji preizkusili pomnoževanje lokusov pri vrsti *Humulus japonicus*. Alele smo pomnožili le pri lokusu *HIGA9*, kjer je bil vzorec heterozigot z aleloma 181 in 199 bp. Nobenega od teh dveh alelov nismo zasledili pri vrsti *H. lupulus*.

4.2.1 Analiza mikrosatelitskega polimorfizma

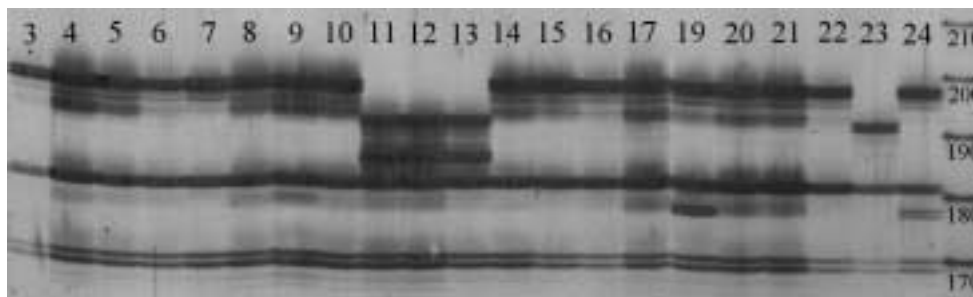
Z 19-imi pari začetnih oligonukleotidov smo uspešno pomnožili DNA fragmente pri 40-ih analiziranih akcesijah hmelja. Po optimizaciji nismo med ponovitvami PCR reakcij zasledili nespecifičnosti ali morebitnih neponovljivosti.

Pri 13-ih parih začetnih oligonukleotidov smo zaznali pričakovan elektroforetski vzorec za kodominanten markerski sistem ali pomnožen fragment pri domnevnem homozigotu ali pa pomnožitev dveh fragmentov pri domnevnem heterozigotu. To smo zasledili pri lokusih: *HIGA1*, *HIGA3*, *HIGA4*, *HIGA9*, *HIGA29*, *HIGT1*, *HIGT2*, *HIGT4*, *HIGT5*, *HIGT6*, *HIGT9*, *HIGT10* in *HIGT12*. Lokus *HIGA1* je bil pri 40-ih analiziranih akcesijah monomorfen, pri vseh smo pomnožili fragment dolžine 183 bp.

Pri ostalih 6-ih parih pa smo določili pomnoževanje treh ali več fragmentov pri eni akcesiji, kar ponavadi kaže na pomnoževanje dodatnega lokusa, ki ima določeno podobnost zaporedja z lokusom, na podlagi katerega smo razvili začetne oligonukleotide ali pa na dupliciran lokus.

Pri paru *HIGA2* smo skupno pomnožili 8 fragmentov v območju 170-196 bp (slika 11). Pri posamezni akcesiji smo določili 3 (pri 30-ih) ali 4 fragmente (pri 10-ih). Vse analizirane hmeljne rastline s trialelnim profilom, razen ene, so imele identične DNA fragmente: 196, 182 in 170 bp. Ruska moška hmeljna akcesija 253/95 pa je imela namesto 196 bp prisoten 190 bp fragment (slika 11, vzorec 23). Ostali štiri polimorfni DNA fragmenti, 186, 184, 180 in 178 bp, so se pojavili pri 10-ih 4-alelnih akcesijah. Fragment 178 bp je prisoten pri ameriškem kultivarju 'Brewers Gold' ter pri treh moških akcesijah (No3-38 – slika 11, vzorec 19, 106/32 – slika 11, vzorec 24 in 31/107), od katerih je akcesija 31/107 njegov potomec. Fragment 180 bp se je pomnožil le pri japonskem ('Kirin I') in kitajskem

kultivarju ('Ging Dao Do Hua'). Ostale fragmente smo pomnožili le v ruskih (evroazijskih) akcesijah: fragment 184 bp je značilen za rusko moško akcesijo 253/1, fragmenta 186 in 190 bp pa smo pomnožili v treh ženskih akcesijah (K5, K7, K11 – slika 11, vzorci 11, 12 in 13), slednjega (190 bp) pa še pri moškem hmelju 253/1 in 253/95 (slika 11, vzorec 23).

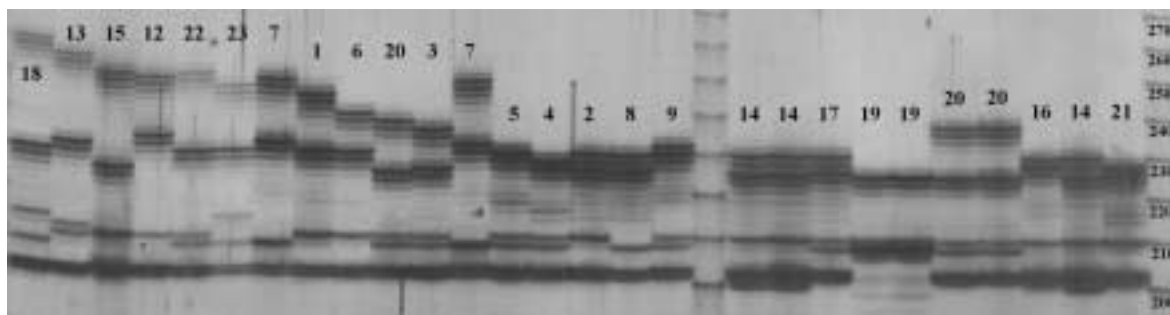


Slika 11: Primer pomnoževanja DNA fragmentov pri lokusu *HIGA2* pri 21 akcesijah hmelja, kjer smo pri posamezni akcesiji zaznali 3 ali 4 fragmente. Številke vzorcev so enake številkam akcesij iz preglednice 3.

Figure 11: Example of amplification DNA fragments at locus *HIGA2* in 21 hop samples, where 3 or 4 fragment where detected in sample. Sample numbers are the same as those of accessions in table 3.

Izredno zanimiv elektroforetski profil smo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov *HIGA12* (slika 12). Skupno smo pomnožili kar 23 dolžinskih polimorfizmov v območju 201-260 bp. Prvi set 16-ih fragmentov dolžin 225-260 bp kaže izrazito mikrosatelitski vzorec, ki je posledica zdrsa DNA polimeraze med pomnoževanjem lokusa. Značilnost tega seta so tudi fragmenti s sodim in lihim številom baznih parov (npr. slika 12, daljši aleli vzorcev 13 - K11 256 bp, 15 – A16 251 bp, 12 – K7 250 bp in 22 – 35P01 251 bp), čeprav naj bi bil glavni mutacijski mehanizem mikrosatelitskih lokusov v skrajševanju ali dodajanju enote ponovitve mikrosatelita. V tem primeru dinukleotidnega mikrosatelita bi pričakovali 2 bp razlike med fragmenti. Domnevamo, da je omenjen set dejanski mikrosatelitski lokus, saj je 29 analiziranih akcesij (74 %) na območju od 225 do 260 bp heterozigotov in 10 homozigotov (pri kitajskem kultivarju 'Ging Dao Do Hua' pa po več ponovitvah nismo uspeli s pomnoževanjem). Ostalih 7 fragmentov pa je razdeljenih na še dva domnevna lokusa v območju od 201 do 214 bp.

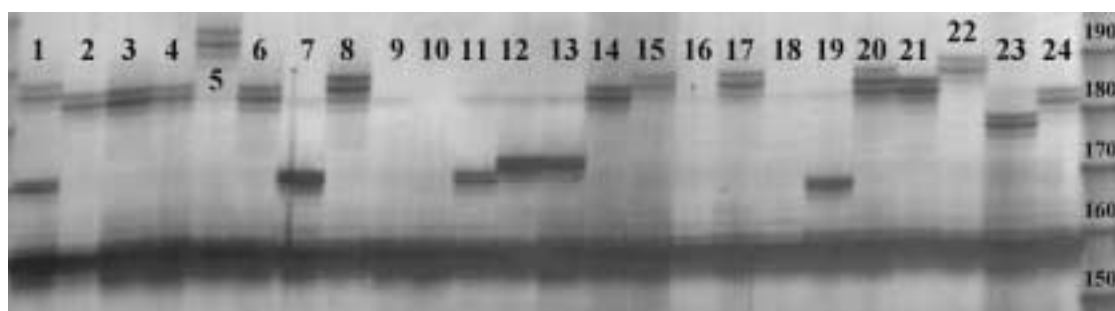
Podobno situacijo smo dobili tudi pri začetnih oligonukleotidih *HIGA28*, kjer smo pomnožili 15 DNA fragmentov s tipičnim mikrosatelitskim vzorcem (236-188 bp), poleg tega pa še v območju okrog 180-176 bp fragmente, ki pa jim zaradi premočne intenzitete pomnoževanja in domnevnega prekrivanja z dejanskimi mikrosatelitskimi aleli nismo uspeli točno določiti dolžine. Dvanajst analiziranih akcesij ni imelo fragmenta v mikrosatelitskem območju, od tega 9 kultivarjev. Lahko so domnevni homozigoti za ničti alel ali pa se dejanski alel prekriva z drugim pomnoževalnim območjem. Trinajst akcesij je imelo v tem območju dva fragmenta, med njimi kultivarja 'HallertauerMTF' in 'Chang Bei 2', in so domnevni heterozigoti, ostali pa so imeli pomnožen en fragment.



Slika 12: Primer pomnoževanja DNA fragmentov pri lokusu *HIGA12*, kjer smo s segregacijsko analizo dokazali obstoj dveh lokusov. Prvi lokus, *HIGA12a*, je bil najpolimorfnejši lokus v naši analizi z 18-imi različnimi aleli. Številke vzorcev so enake številkam akcesij iz preglednice 3.

Figure 12: Example of amplification DNA fragments at locus *HIGA12*, where two loci were confirmed with segregation analysis. First locus, *HIGA12a* is the most polymorphic one in our analysis, where 18 different alleles were detected. Sample numbers are the same as those of accessions in table 3.

Pri *HIGT7* paru začetnih oligonukleotidov smo pomnožili v vseh akcesijah fragment dolžine 158 bp, poleg tega pa še 9 značilnih mikrosatelitskih fragmentov v območju od 169 do 195 bp (slika 13). V tem primeru pri 13-ih analiziranih akcesijah nismo pomnožili nobenega mikrosatelitskega fragmenta, le dve ženski divji akcesiji, 41P36 (slika 13, vzorec 1, 187:171 bp) in R16 (slika 13, vzorec 20, 187:185 bp), pa sta imeli po dva značilna mikrosatelitska fragmenta.

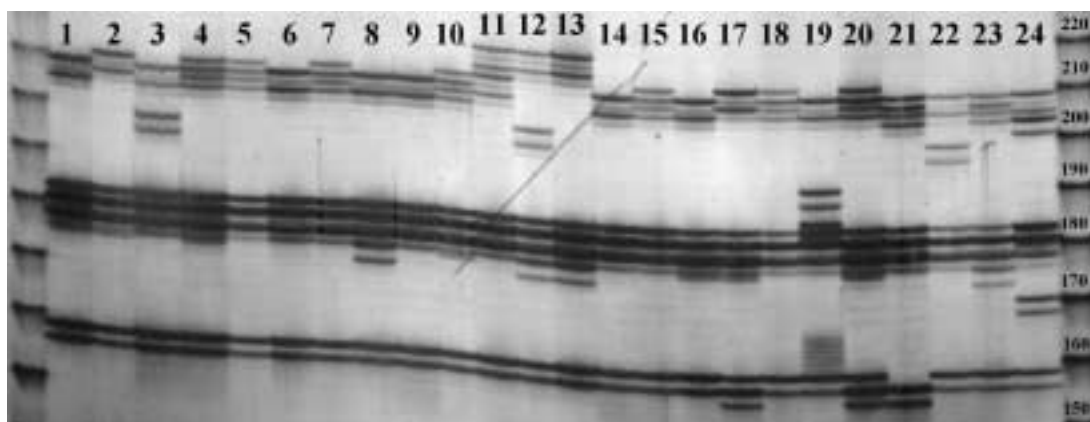


Slika 13: Primer pomnoževanja DNA fragmentov pri lokusu *HIGT7*, kjer smo pri vseh akcesijah zaznali fragment 158 bp, poleg tega pa še dva (1 in 20), enega (2, 3, 4...) ali nobenega fragmenta (9, 10, 16...) z značilnim mikrosatelitskim fragmentom. Številke vzorcev so enake številkam akcesij iz preglednice 3.

Figure 13: Example of DNA amplification at locus *HIGT7*, where fragment 158 bp was amplified in all analysed hop accessions and beside that two (1 and 20), one (2, 3, 4...) or no (9, 10, 16...) fragments with distinctive stutter pattern. Sample numbers are the same as those of accessions in table 3.

Pri začetnih oligonukleotidih *HIGT8* smo pomnožili 8 DNA fragmentov v območju od 203 do 280 bp. Pri štirih analiziranih akcesijah smo zaznali 3 pomnožene fragmente (106/32, 31/107, 'Ahil', 'Wye Target'), pri dveh pa 4 (kultivarja 'Kirin I' in 'Brewers Gold'), vedno le v kombinaciji z 206 in 203 bp fragmentoma. Trije daljši in krajši fragment so imeli sodo število bp (280, 256, 246 in 206), medtem ko smo štirim določili liho število bp (233, 231,

229 in 203). Predvidena dolžina pomnoževanja iz podatkov nukleotidnega zaporedja je bila 227 bp.



Slika 14: Primer pomnoževanja DNA fragmentov pri lokusu *HIGT11*, kjer smo zaznali zapleten elektroforetski profil. Številke vzorcev so enake številkam akcesij iz preglednice 3.

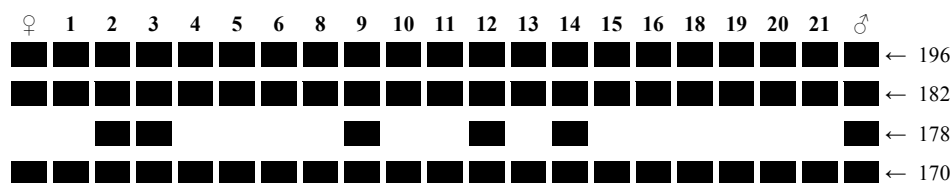
Figure 14: Example of DNA amplification at locus *HIGT11* with complex electrophoretic profile. Sample numbers are the same as those of accessions in table 3.

Dokaj nenavadno pomnoževanje pa smo opazili pri *HIGT11* parih začetnih oligonukleotidov (slika 14), kjer so se fragmenti nahajali v treh dolžinskih območjih, ki so se raztezala od 156 do 216 bp. Prvo območje so sestavljali jasni fragmenti od 190 do 216 bp, kjer smo določili 7 fragmentov, sledili so slabše ločeni in močno pomnoženi fragmenti od 176 do 183 bp, ki so se med sabo razlikovali tudi le za 1 bp. Sledil je 170 bp fragment, odkrit pri 6-ih akcesijah, ter fragmenta 156 in 158 bp. Slednji ni bil prisoten edino pri ruski moški akcesiji R21 (slika 14, vzorec 21 je brez 158 bp fragmenta), 156 bp pa je bil določen pri 7-ih vzorcih.

4.2.2 Segregacijska analiza

Pri 6-ih parih začetnih oligonukleotidov (*HIGA2*, *HIGA12*, *HIGA28*, *HIGT7*, *HIGT8* in *HIGT11*) smo zaznali elektroforetske vzorce, ki so odstopali od pričakovanega profila za kodominanten mikrosatelitski markerski sistem. Da bi dobili dodatne informacije o povezavi DNA fragmentov, smo v analizo vključili dve družini križancev. Pri družini križanja 'Yeoman' × 3/3 (kultivar × slovenski divji moški hmelj) smo analizirali 22 potomcev in 19 potomcev križanja 241/8 × No3-38 (ženska linija × japonski moški hmelj).

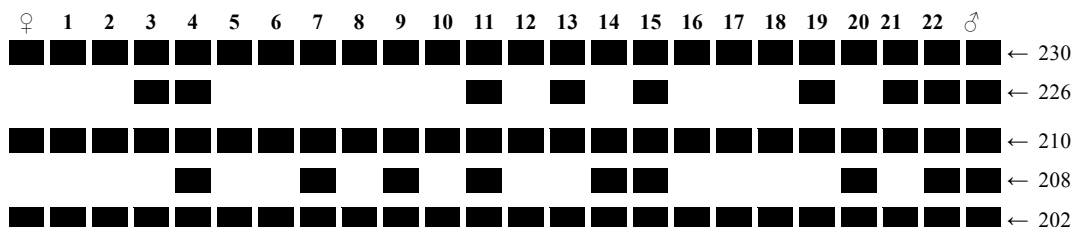
Pri lokusu *HIGA2* je bilo prvo križanje 'Yeoman' × 3/3 neinformativno, saj sta imela oba starša identičen elektroforetski profil (196:182:170), ki se je izrazil tudi pri vseh 22-ih potomcih. Pri drugem križanju pa je imel japonski moški hmelj No3-38 še dodaten 178 bp fragment, ki se je dedoval pri 5-ih potomcih, kar je približno četrtnina analiziranih potomcev (slika 15, vzorci 2, 3, 9, 12 in 14). Tudi tu ni prišlo do razcepa pri ostalih treh fragmentih, zato ne moremo govoriti o povezanosti fragmenta 178, s katerim od njih. Locus je zaradi svoje nizke informativnosti neuporaben.



Slika 15: Razcep alelov lokusa *HIGA2* križanja 241/8 × No3-38.

Figure 15: Segregation of alleles at locus *HIGA2* for cross 241/8 × No3-38.

Uporabnost analize potomstva se je pokazala na primeru lokusa *HIGA12*, kjer smo dokazali obstoj dveh neodvisnih lokusov in določili alel prvega lokusa, ki se dolžinsko prekriva z aleli drugega lokusa. Z odkritimi 23-imi aleli je to najbolj polimorfen lokus naše analize. Pri prvem križanju je imel kultivar 'Yeoman' pomnožene tri fragmente: alel 230 bp, za katerega smo domnevali, da je dejanski mikrosatelitski alel, poleg tega je imel še DNA fragmenta pri 210 in 202 bp. Moški 3/3 pa je imel pomnoženih 5 fragmentov, domnevna mikrosatelitska alela 230 in 226 bp ter fragmente 210, 208 in 202 bp. Iz analize potomstva (slika 16) je razvidno, da so domnevni mikrosatelitski aleli dejansko neodvisni aleli, saj smo zaznali oba možna genotipa 230:230 (slika 16, 14 rastlin) in 230:226 (slika 16, 8 rastlin: 3, 4, 11, 13, 15, 19, 21 in 22). Fragmenta 210 in 208 bp zopet kažeta dedovanje skupnega lokusa, saj smo tudi v tem primeru dobili oba možna genotipa: homozigota 210:210 (14 rastlin) in heterozigota 210:208 (8 rastlin). Alel 208 se je pojavljal tako v kombinaciji 230:230 in 230:226 prvega lokusa, kar kaže na njuno nepovezanost. Vsi potomci so podedovali fragment 202 bp, ki po vsej verjetnosti predstavlja tretji lokus, ki se pomnoži s tem parom začetnih oligonukleotidov.

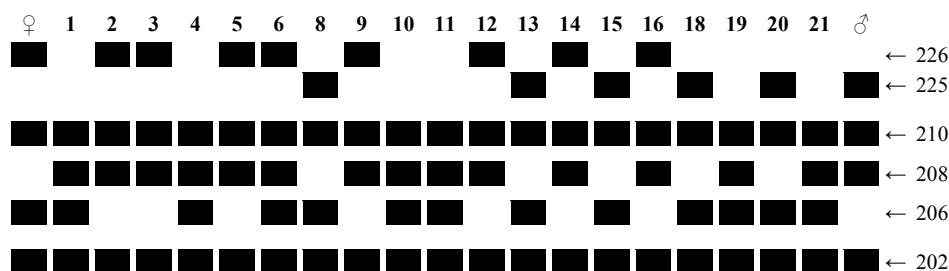


Slika 16: Razcep alelov lokusa *HIGA12* križanja 'Yeoman' × 3/3.

Figure 16: Segregation of alleles at locus *HIGA12* for cross 'Yeoman' × 3/3.

V primeru križanja 241/8 × No3-38 pa smo potrdili prekrivanje dveh alelov mikrosatelitskega lokusa z aleli drugega lokusa (slika 17). Pri liniji 241/8 smo pomnožili štiri fragmente: 226 (domnevni mikrosatelitski alel), 210, 206 in 202 bp, pri moškem hmelju No3-38 pa 4 fragmente: 225 (domnevni mikrosatelitski alel), 210, 208 in 202 bp. Pri analizi potomstva bi pričakovali heterozigotnost vseh 19-ih potomcev za alela 226:225. Vendar smo dobili pri 8-ih potomcih elektroforetski profil 226, pri 5-ih elektroforetski profil 225, 6 potomcev pa ni imelo nobenega izmed navedenih alelov (ničti elektroforetski profil). Torej je možnost, da sta oba starša heterozigota z ničtim alelom za mikrosatelitski lokus. Pri dedovanju fragmenta 206 pri starševski liniji 241/8 in 208 pri očetovski liniji No3-38 pridemo do ugotovitve, da alela pripadata prvemu lokusu: alel 206 je prisoten

samo v ničtem elektroforetskem profilu in v kombinaciji z 225 ali 208 alelom in nikoli v kombinaciji z 226 alelom. Enako velja za alel 208, ki ni nikoli prisoten v kombinaciji z 225 alelom, ampak le v ničtem elektroforetskem profilu, ter v kombinaciji z 226 ali 206 alelom. Sporno je le, da ne najdemo pa genotipa 226:225, ki bi po teoriji alelov istega lokusa moral biti tudi prisoten ($226:206 \times 225:208 \rightarrow 226:225, 226:208, 225:206, 208:206$). Verjetno bi bilo potrebno analizirati večje število potomcev, saj je pri hmelju močno izražena kompetitivnost peloda, kar se kaže v razhajanju med pričakovanimi in dejanskimi genotipskimi razmerji. Alela 208 in 206 kažeta nekoliko močnejši vzorec pomnožitve v primerjavi z drugim lokusom, kar bi bil lahko tudi znak za razlikovanje teh dveh lokusov. To je pomembno, saj smo pri prvem križanju dokazali, da ima drugi lokus tudi alel 208 bp. Prekrivanje alelov zagotovo zmanjšuje vrednost lokusa za identifikacijske študije, je pa lokus zagotovo primeren pri kartiranju (analiza potomstva), kjer lahko odkrijemo vzorec dedovanja. Tudi pri analizi teh potomcev smo pri vseh določili fragment 202 bp, brez razcepa. Po ugotovitvi prekrivanja alelov domnevamo, da se pojavlja alel prvega lokusa z drugim lokusom pri naslednjih analiziranih akcesijah: pri japonskem moškem No3-38 alel 208 bp (dokazano z analizo potomstva, tudi slika 12, vzorec 19), pri moški liniji 106/32 alel 206 bp ter pri kultivarjih 'Wye Target', 'Kirin I', 'Brewers Gold' in 'Pride of Ringwood' alel 206 bp.



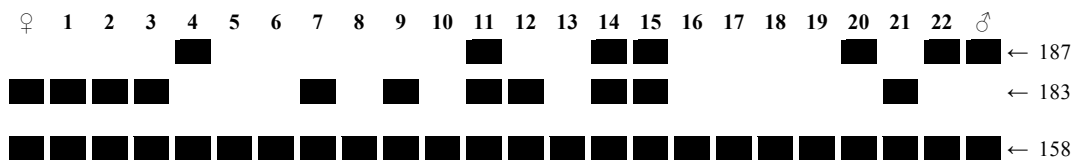
Slika 17: Razcep alelov lokusa *HIGA12* križanja 241/8 \times No3-38.

Figure 17: Segregation of alleles at locus *HIGA12* for cross 241/8 \times No3-38.

Pri paru začetnih oligonukleotidov *HIGA28* pa zaradi neinformativnosti izbranih staršev nismo uspeli določiti morebitne uporabnosti lokusa. Pri križanju 'Yeoman' \times 3/3 sta oba starša imela alel 180 bp z izrazito mikrosatelitskim vzorcem, ki ga je podedovalo vseh 22 potomcev. Pri drugem križanju smo pri liniji 241/8 zaznali enak mikrosatelitski alel 180 bp, pri japonskem moškem No3-38 pa alel 232 bp in alel 178, ki pa ni imel izrazito mikrosatelitskega vzorca. Alel 232 so podedovali trije potomci (10, 13 in 15) od 19-ih analiziranih, pri alelu 178 bp pa nismo uspeli ugotoviti nobenega dedovanjskega vzorca, ker ga je v vseh primerih prekril močnejši alel 180 bp.

Analiza potomstva s *HIGT7* parom začetnih oligonukleotidov je potrdila pričakovano prisotnost ničtih alelov in pomnoževanje dodatnega lokusa. Pri prvem križanju je imel 'Yeoman' prisoten alel 183 in 158 bp, 3/3 pa 187 in 158 bp (slika 18). Vseh 22 potomcev je podedovalo fragment 158 bp, kar kaže na nepovezanost z daljšima aleloma. Sedem potomcev je podedovalo alel 183 bp, trije alel 187, trije so podedovali oba alela (187:183),

osem pa jih je bilo brez omenjenih dveh alelov, torej so bili homozigoti za ničta alela, ki sta bila prisotna v obeh starših.



Slika 18: Razcep alelov lokusa *HIGT7* križanja 'Yeoman' × 3/3.

Figure 18: Segregation of alleles at locus *HIGT7* for cross 'Yeoman' × 3/3.

Pri potomcih drugega križanja je bila ženska linija heterozigot z dvema aleloma na mikrosatelitskem lokusu (187:183), pri japonskem moškem pa smo določili 169 bp alel (slika 19). Oba starša sta imela tudi alel dodatnega lokusa (158 bp). Pri potomcih lepo vidimo razcep alelov matere, moti pa dejstvo, da niti eden izmed 19 potomcev ni podedoval očetovega 169 bp alela. Torej lahko zaključimo, da je na tem lokusu heterozigot z ničtim alelom, neprisotnost alela pri potomcih pa lahko razložimo s kompeticijo peloda in premajhnim številom analiziranega potomstva.



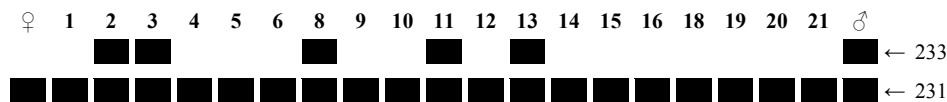
Slika 19: Razcep alelov lokusa *HIGT7* križanja 241/8 × No3-38.

Figure 19: Segregation of alleles at locus *HIGT7* for cross 241/8 × No3-38.

Na omenjenem mikrosatelitskem lokusu (*HIGT7*) smo odkrili 9 različnih mikrosatelitskih alelov. Vendar brez analize križancev ne moremo govoriti o homozigotnosti ali heterozigotnosti analiziranih rastlin, razen v primeru detekcije obeh alelov v akcesijah 41P36 (slika 13, vzorec 1, 187:171 bp) in R16 (slika 13, vzorec 20, 187:185 bp). Je pa lokus zagotovo primeren za analizo potomstva pri kartiranju.

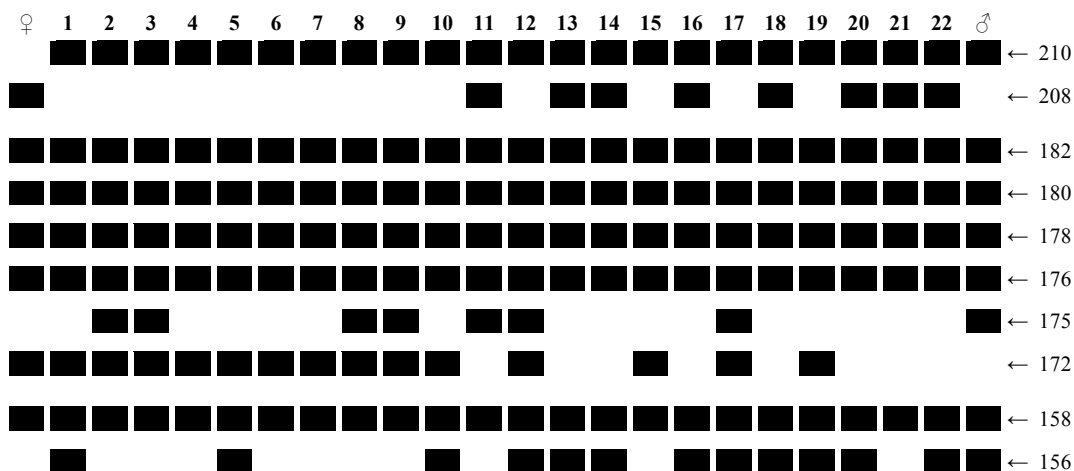
Neinformativnost staršev je bila prisotna pri lokusu *HIGT8*, kjer nobeden od staršev ni imel alela 206 ali 203 bp, ki sta se dodatno pomnožila pri 6 analiziranih hmeljnih rastlinah. Križanje 'Yeoman' × No3-38 je bilo popolnoma neinformativno, saj smo pri obeh starših zaznali le alel 231 bp, ki ga je podedovalo vseh 22 potomcev brez kakršnegakoli razcepa. Pri drugem križanju pa je bil oče No3-38 heterozigot z dvema aleloma (233:231), ženska linija pa homozigot za 231 bp alel (slika 20). Določili smo pričakovan razcep s 14-imi homozigotnimi (231:231) potomci in 5-imi heterozigoti (233:231). Uporabo lokusa

omejuje prisotnost dveh fragmentov, ki se pojavljata z ostalimi aleli, je pa primeren pri kartiranju.



Slika 20: Razcep alelov lokusa *HIGT8* križanja 241/8 × No3-38.

Figure 20: Segregation of alleles at locus *HIGT8* for cross 241/8 × No3-38.



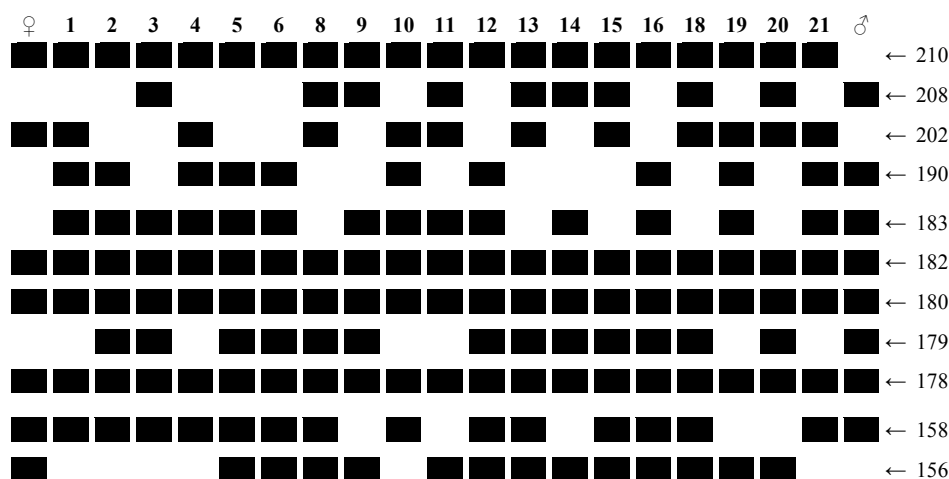
Slika 21: Razcep alelov lokusa *HIGT11* križanja 'Yeoman' × 3/3.

Figure 21: Segregation of alleles at locus *HIGT11* for cross 'Yeoman' × 3/3.

Dedovanje fragmentov pomnoženih s parom začetnih oligonukleotidov *HIGT11* smo uspeli rešiti samo delno. Pri prvem križanju (slika 21) smo pri kultivarju 'Yeoman' pomnožili 7 DNA fragmentov: 208 bp, ki kaže značilen mikrosatelitski vzorec, sledijo fragmenti 182, 180, 178 in 176 bp, ki po vsej verjetnosti niso vsak posamezen fragment. Značilno za njih je, da so močnejše pomnoženi, zato je tudi možnost, da se tu prekrivajo fragmenti identičnih dolžin. Sledita DNA fragmenta pri 172 in 158 bp. Pri moški liniji pa smo zaznali 8 fragmentov: 210 bp, fragmenti 182, 180, 178 in 176 bp, poleg tega pa je prisoten še fragment 175 bp, ki je rezultat zdrsa alela, ki je po vsej verjetnosti zamaskiran z 178 bp alelom. Sledita fragmenta 158 in 156 bp. Pri analizi 22-ih potomcev smo ugotovili naslednje: fragmenta kultivarja 'Yeoman' 208 in 172 bp sta alela istega lokusa, saj se dedujeta po kodominantnih pravilih. Fragment 172 bp je prisoten pri potomcih brez alela 208 bp (slika 21, 14 rastlin) in obratno (slika 21, 8 rastlin). Divji moški hmelj 3/3 je bil homozigoten za alel 210 bp, saj so ga podedovali vsi potomci. Fragmenti 182, 180, 178 in 176 so bili prisotni tudi pri vseh potomcih, medtem ko je pri fragmentu 175 bp prišlo do razcepa in ga je podedovalo 7 potomcev (slika 21, rastline 2, 3, 8, 9, 11, 12 in 17). Vendar z njegovim dedovanjem nismo uspeli uskladiti nobenega drugega fragmenta. Vsi potomci

imajo prisoten fragment 158 bp, 12 pa jih ima prisoten tudi fragment 156 bp. Omenjena fragmenta bi lahko bila zopet alela drugega lokusa.

Pri drugem križanju smo pri ženski liniji 241/8 zaznali 7 pomnoženih DNA fragmentov: 210, 202, 182, 180 in 178 bp, ter fragmenta 158 in 156 bp. Pri japonskem moškem hmelju pa smo pomnožili 8 DNA fragmentov naslednjih dolžin: 208, 190, 183, 182, 180, 179, 178 in 158 bp (slika 22). Predvidevali smo, da sta fragmenta 210 in 202 bp linije 241/8 alela istega lokusa (kot pri prvem križanju alela 208 in 172 bp), vendar so vsi analizirani potomci podedovali alel 210 bp, kar kaže na njegovo homozigotnost. Alel 202 bp je podedovalo 11 potomcev, kar kaže na njegovo heterozigotnost, vendar nismo uspeli odkriti alela, ki bi bil z njim povezan. Lahko obstaja kot ničti alel, je pa verjetnost, da je zamaskiran v fragmentih 182-178 bp. Pri očetovski liniji pa pride do razcepa med aleloma 208 in 190 bp, torej sta alela istega lokusa. Alel 208 je podedovalo 9, alel 190 bp pa 10 potomcev (slika 22). Prav tako pride do razcepa med aleloma 183 in 179 bp, vendar med njima ni povezave in tudi nista povezana s kakšnim drugim DNA fragmentom. Alel 183 bp je podedovalo 14, alel 179 bp pa 13 potomcev (slika 22). Hipoteza lokusa z aleloma 158 in 156 bp aleloma se pri tem križanju zanika. Linija 241/8 je heterozigot za alela, moška linija pa homozigot za 158 bp alel. Pri takem križanju bi dobili razcep za genotipe 158:158 in 158:156. V našem primeru pa smo poleg 8-ih 158:156 elektroforetskih profilov določili tudi 5 elektroforetskih profilov 156 in 6 elektroforetskih profilov 158. Vendar alela nista povezana z nobenim od alelov, za katere nismo uspeli odkriti para. Začetna oligonukleotida sta kot taka torej le delno uporabna pri analizi križancev (kartiranju), pa še pri tej uporabi moramo biti pazljivi. Uporabnost za DNA tipiziranje akcesij pa zmanjšujejo aleli 183-178 bp, kjer je nemogoče dobiti precizno ločevanje.



Slika 22: Razcep alelov lokusa *HIGT11* križanja 241/8 × No3-38.

Figure 22: Segregation of alleles at locus *HIGT11* for cross 241/8 × No3-38.

4.2.3 Karakterizacija mikrosatelitskih markerjev

Od 20-ih analiziranih parov začetnih oligonukleotidov smo po analizi potomstva skupno določili 14 parov, za katere veljajo pravila kodominantnega markerskega sistema: *HIGA3*, *HIGA4*, *HIGA9*, *HIGA12*, *HIGA29*, *HIGT1*, *HIGT2*, *HIGT4*, *HIGT5*, *HIGT6*, *HIGT8*, *HIGT9*, *HIGT10* in *HIG12*. Skupno to predstavlja 15 lokusov, ker smo s parom *HIGA12* pomnožili dva neodvisna lokusa.

Dolžinskim polimorfizmom (alelom) (slika 23) posameznih lokusov smo določili dolžine v bp s pomočjo dolžinskega markerja in v nekaterih primerih s pomočjo fragmentov, ki so bili posledica zdrsa pomnoževanja s *Taq* DNA polimerazo (preglednica 14). Pri akcesijah hmelja, kjer smo pomnožili samo en alel, smo predpostavljali, da so za tisti alel homozigotne. Navzočnost ničtih alelov se kaže v primanjkljaju heterozigotnih posameznikov, dokažemo pa jih lahko samo s segregacijsko analizo potomstva.

S 14-imi pari začetnih oligonukleotidov smo skupno pomnožili 15 lokusov, pri katerih smo določili 112 različnih alelov, povprečno 7,5 alela na lokus. Dva alela smo zaznali pri lokusu *HIGT6* in kar 18 različnih alelov pri lokusu *HIGA12*. V skupini 25-ih divjih akcesij smo določili 107 alelov (96 % vseh, preglednica 16), v skupini 15-ih kultivarjev pa le 58 (52 % vseh).

V prilogi B so predstavljeni genotipi 40-ih analiziranih akcesij hmelja (aleli v bp) pri 15-ih analiziranih mikrosatelitskih lokusih, ob predpostavki, da ni bil nikjer prisoten ničti alel.

Lokus *HIGA1* je bil monomorfen, saj smo pri vseh analiziranih akcesijah pomnožili alel 183 bp, lokusa *HIGT7* in *HIGA28* imata ob pomnoževanju dodatnih fragmentov prisotne ničte alele (pri prvem smo zaznali 9 in pri drugem 15 domnevnih alelov), pri lokusih *HIGT11* in *HIGA2* pa nismo uspeli ugotoviti principov dedovanja mnogih fragmentov. Pri lokusu *HIGA9* pa smo z enakimi pogoji pomnoževanja določili tudi dva alela pri vrsti *H. japonicus*.

4.2.4 Vrednotenje podatkov

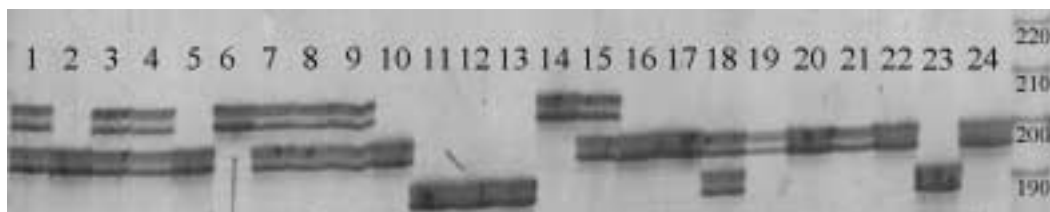
Iz podatkov 15-ih mikrosatelitskih lokusov smo iz frekvenc alelov (preglednica 14, slika 24, priloga C) določili nekatere statistične vrednosti za 40 analiziranih akcesij hmelja (preglednica 17). Določili smo tudi genotipsko specifične alele (preglednica 15) in genotipske frekvence glede na posamezne lokuse (slika 25).

4.2.4.1 Frekvence alelov

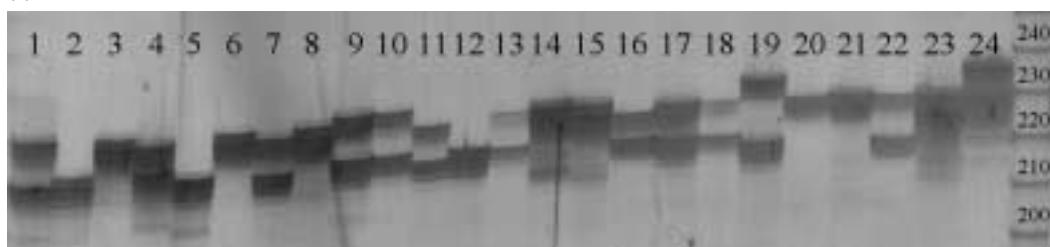
Frekvence alelov posameznih lokusov so predstavljene grafično na sliki 24, natančne vrednosti pa tabelarno v prilogi C. Analizirane hmeljne akcesije smo razdelili v dve podskupini: divje akcesije (25 rastlin) in kultivarji (15 rastlin). Vrednosti števila posameznega alela so predstavljene nad stolpičnimi grafi na sliki 24. Število alelov po skupinah je predstavljeno v preglednici 16.

Frekvence alelov lokusa *HIGA3* se gibljejo od 0,0125 za genotipsko specifičen alel 160 bp (No3-38) do 0,7625 za alel 154 bp, ki se med 40 analiziranimi akcesijami pojavi 61-krat. Divje akcesije imajo 5, kultivarji pa 4 od skupaj 6-ih alelov. Japonski kultivar 'Kirin I' in kitajski kultivar 'Ging Dao Do Hua' imata alel 146 bp, ki smo ga opazili le pri njiju.

(a) *HIGT9*



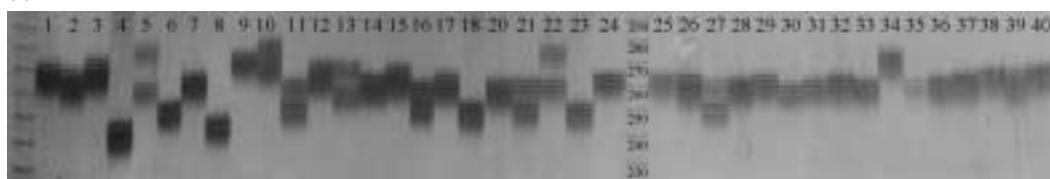
(b) *HIGA4*



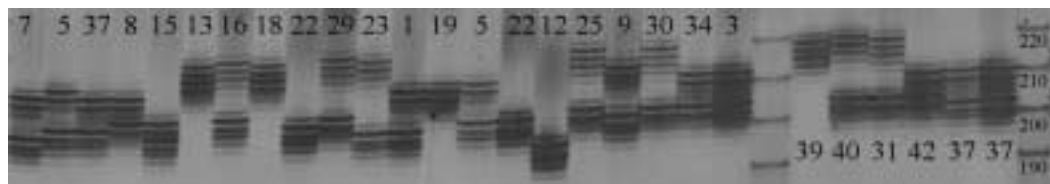
(c) *HIGT12*



(d) *HIGT1*



(e) *HIGT5*



Slika 23: Primeri pomnoženih dolžinskih polimorfizmov pri petih mikrosatelitskih lokusih hmelja. Fragmenti uporabljenega dolžinskega markerja se razlikujejo za 10 bp. Številke vzorcev so enake številkam akcesij iz preglednice 3.

Figure 23: Examples of amplified length polymorphisms at five microsatellite loci of hop. Fragments of used marker are in 10 bp increments. Sample numbers are the same as those of accessions in table 3.

Preglednica 14: Aleli petnajstih analiziranih lokusov in njihove dolžine v bp.

Table 14: Alleles of 15 analysed microsatellite loci and their length in bp.

Pri lokusu *HIGA4* smo skupno določili 9 alelov, najvišjo frekvenco ima alel 230 bp (0,425), najnižjo (0,0125) pa genotipsko specifična alela 226 bp (253/95) in 234 bp (No3-38). Sedem alelov smo določili pri kultivarjih (brez 226 in 234 bp), alel 240 bp pa imata zopet samo kultivarja 'Kirin I' in 'Ging Dao Do Hua'.

Od skupno 9 alelov pri lokusu *HIGA9* smo samo 4 zaznali v skupini analiziranih kultivarjev. Genotipsko specifičen alel 353 bp, ki po dolžini odstopa od ostalih alelov (naslednji 229 bp), ima samo ženska akcesija 20P14 iz Hrvaške. Najpogostejša alela tega lokusa sta alela 215 bp (0,275) in 217 bp (0,4875), torej 76 % celokupne vrednosti odpade samo na ta dva alela. Prvi je pogostejši v skupini kultivarjev, drugi pa v skupini divjih akcesij. Alel 225 bp je prisoten le v dveh akcesijah, v ženski akcesiji iz Srbije (33P26) in v moški ruski (kavkaški) akcesiji (253/95), enako alel 219 bp v ženski akcesiji 27P04 (Bosna in Hercegovina, homozigot) in v ruskem moškem hmelju R16. Alel 221 bp je bil odkrit le v ženskih ruskih (kavkaških) akcesijah K5 (homozigot) in K7. Alel 201 bp je skupen ruski ženski akcesiji A12 in kitajskemu kultivarju ('Ging Dao Do Hua').

Od 18-ih alelov lokusa *HIGA12a* jih je kar polovica genotipsko specifičnih – odkritih le v divjih akcesijah (preglednica 15). Le tretjina alelov (6) je značilna za skupino kultivarjev. Najpogostejši so trije aleli tega lokusa: 230 bp (0,3205), 226 bp (0,218) in 228 bp (0,1154). Značilni za ta lokus so aleli z lihim in sodim številom bp (225, 245, 247, 249 in 251). Pri lokusu *HIGA12b* je imela ženska ruska (kavkaška) akcesija genotipsko specifičen alel 212 bp, medtem ko smo alel 214 bp določili le pri dveh ruskih moških akcesijah 253/1 in 253/95. Večina (96%) vrednosti frekvenc se je porazdelilo na alela 210 bp (0,75) in 208 bp (0,211).

Od štirih alelov lokusa *HIGA29* smo jih tri zaznali v skupini analiziranih kultivarjev. Alel 182 bp je prisoten le pri ženskih akcesijah 32P02 (Srbija) in 40P19 (Makedonija). Najpogostejša alela tega lokusa sta 196 bp (0,4342) in 186 bp (0,3947).

Od 13-ih alelov lokusa *HIGT1* so trije genotipsko specifični za tri divje akcesije (preglednica 15). Pri kultivarjih smo določili le 5 alelov. Najpogostejši aleli tega lokusa so 262 bp (0,28205), 264 bp (0,20513) in 260 bp (0,10256). Alel 280 bp je bil skupen slovenski in srbski ženski divji akcesiji (02P09 in 34P16), alel 258 bp ruskima akcesijama K11 in R16, alel 246 bp akcesijama 27P04 (Bosna in Hercegovina) in 33P26 (Srbija).

Vseh 5 alelov lokusa *HIGT2* je prisotnih tako v divjih akcesijah kot v kultivarjih. Najpogostejša alela tega lokusa sta 212 bp in 218 bp s frekvenco 0,30769, alel 214 bp pa se pojavi le 5-krat (0,0641).

Pri lokusu *HIGT4* smo skupno odkrili 11 alelov, 4 smo zaznali v skupini kultivarjev in 10 v skupini divjih akcesij. Najpogostejši so trije aleli tega lokusa: 203 bp (0,29487), 201 bp (0,20513) in 197 bp (0,17949). Alel 197 bp se 13-krat pojavi pri kultivarjih in le 1-krat pri slovenskem moškem hmelju 3/3. Lokus ima tri genotipsko specifične alele z najnižjo frekvenco (preglednica 15). Alel 239 bp je prisoten le v dveh ruskih moških akcesijah (253/1 in 253/95). Enako je alel 237 bp prisoten le v ruskih (kavkaških) ženskih akcesijah K5, K7 in K11 (homozigot).

Od 12-ih alelov lokusa *HIGT5* jih ima skupina kultivarjev 7, alel 286 bp je specifičen za japonski kultivar ('Kirin I') in ta po dolžini nekoliko odstopa od glavnine alelov (naslednji alel je 220 bp). Najpogostejša alela lokusa sta 204 in 210 bp z enako frekvenco (0,25641). Alel 196 bp se pojavi le v dveh ruskih (kavkaških) ženskih akcesijah K5 in K7 (homozigot), enako je alel 218 bp značilen za ruske akcesije (253/95, 253/1 in K11). Alel 203 bp je prisoten le v slovenski ženski akcesiji 07P02 in kitajskem kultivarju ('Chang Bei No.1'). Značilno za ta in 219 bp alel je tudi, da imata liho število bp. Alel 214 bp, ki se pojavi 4-krat je značilen za ruske akcesije 253/1, A12, K11 in slovensko akcesijo 07P02.

Le dva alela smo zaznali pri lokusu *HIGT6*, alel 123 bp se je pojavil le 4-krat: v ruskih akcesijah (A12 in A16) in v hrvaški in bosanski akcesiji (13P01 in 27P04). Vsi kultivarji so bili na tem lokusu homozigoti za alel 143 bp.

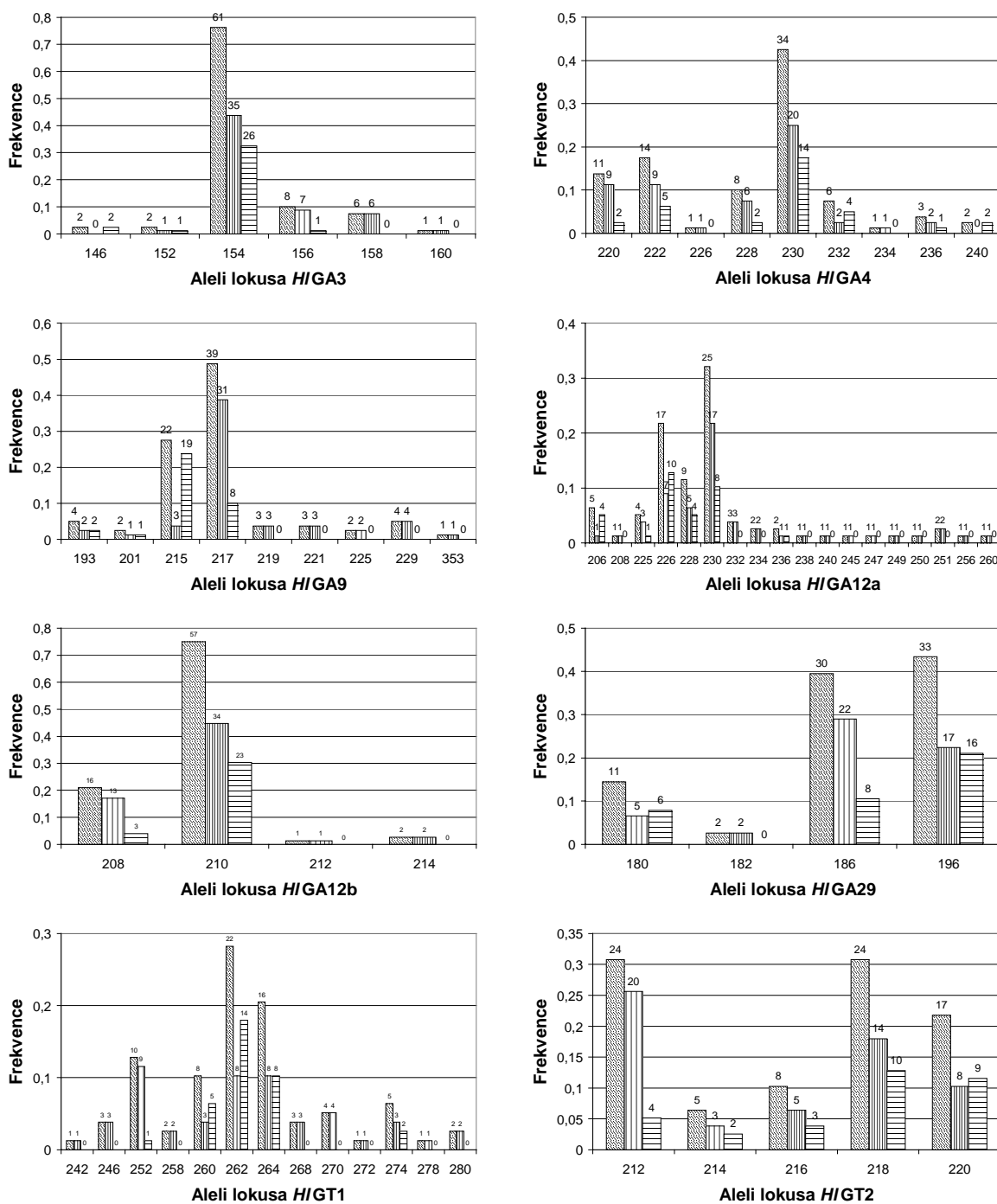
Trije aleli lokusa *HIGT8* imajo liho in trije sodo število bp. Dva alela sta genotipsko specifična (preglednica 15), 280 bp za kultivar 'Wye Target' in 246 bp za moško akcesijo 106/32. Najpogostejši je alel 231 bp (0,6625), alel 229 bp pa smo odkrili le v divjih akcesijah.

Vse 3 alele lokusa *HIGT9* smo odkrili tako v divjih akcesijah kot v kultivarjih. Najpogostejši je 200 bp alel s frekvenco 0,67949.

Od treh alelov lokusa *HIGT10* je alel 237 bp genotipsko specifičen za japonsko moško akcesijo No3-38 (preglednica 15). Najpogostejši je alel 229 bp (0,825).

Pri lokusu *HIGT12* so bili vsi kultivarji homozigotni za alel 163 bp, ostalih 6 alelov smo določili v divjih akcesijah. Dva alela (147 in 171 bp) sta bila genotipsko specifična (preglednica 15), alel 167 bp se je pojavil le v ruskih akcesijah (K5 in 253/95), enako alel 169 bp (K7, K11, 253/1 in 253/95).

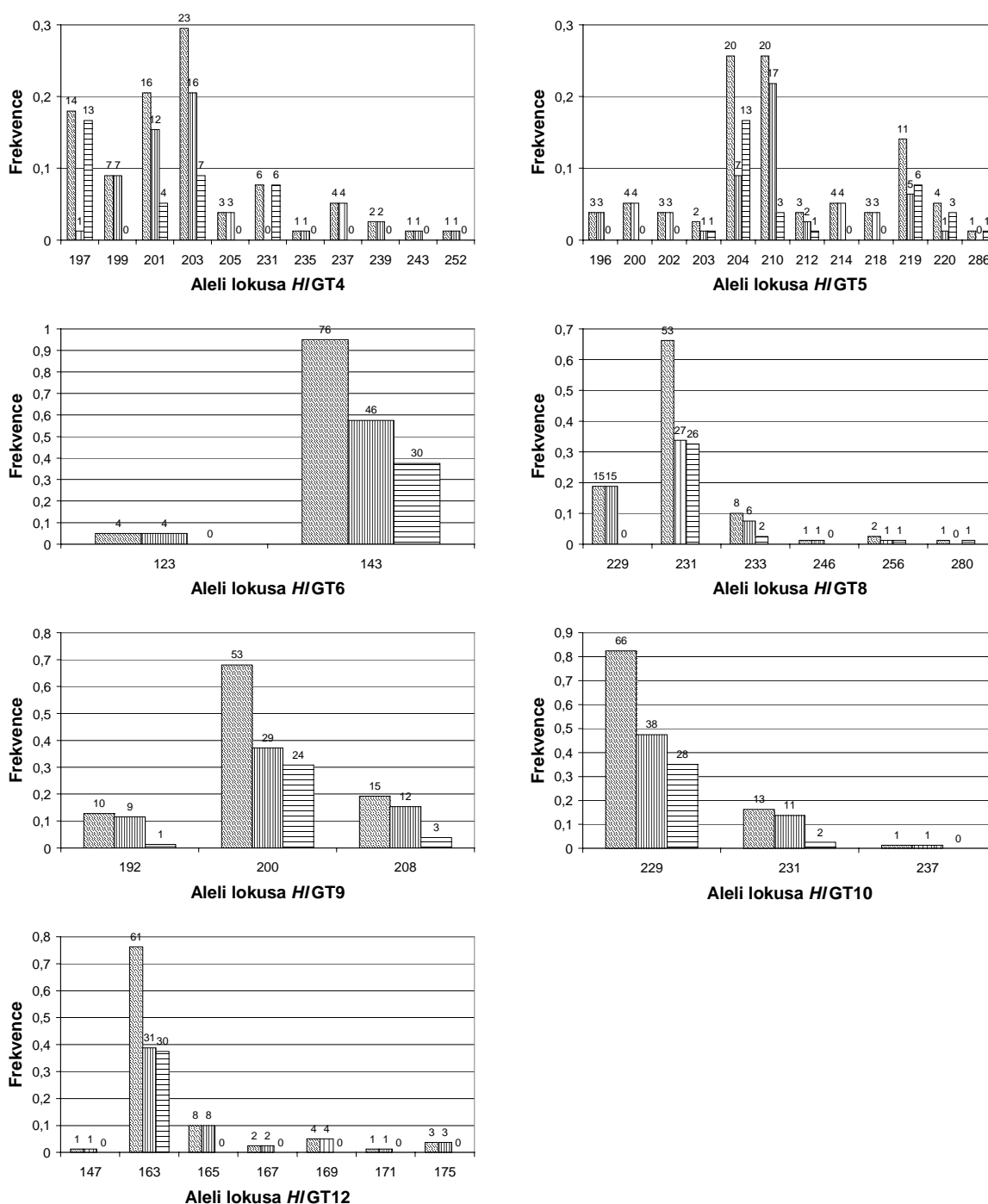
Med 112 pomnoženimi aleli smo odkrili pri 11 lokusih 26 specifičnih alelov, ki so bili navzoči le pri eni od analiziranih akcesij (preglednica 15) in zato primerni za njihovo identifikacijo. Po spolu so bili genotipsko specifični aleli razdeljeni na pol, čeprav smo analizirali le 10 moških akcesij. Največ genotipsko specifičnih alelov (9) smo odkrili pri lokusu *HIGA12a*, po 3 smo odkrili pri lokusih *HIGT1* in *HIGT4*, po dva pri lokusih *HIGA4*, *HIGT8* in *HIGT12* ter po enega pri lokusih *HIGA3*, *HIGA9*, *HIGA12b*, *HIGT5* in *HIGT10*. Pet genotipsko specifičnih alelov smo odkrili pri japonski moški akcesiji No3-38, po 3 pri ruski moški akcesiji 253/95 in ruski (kavkaški) ženski akcesiji K11 in po dva pri ruski (kavkaški) ženski akcesiji K7 in pri ženskih akcesijah 41P36 (Makedonija) in 20P14 (Hrvaška). Po en genotipsko specifičen alel sta imeli ženski akcesiji 40P19 (Makedonija) in 27P04 (Bosna in Hercegovina) ter moške akcesije 35P01 (Srbija), 253/1 (Rusija), R16 (Rusija), 4/4 (Slovenija) in 106/32 (Slovenija). Samo dva kultivarja 'Kirin I' (Japonska) in 'Wye Target' (Velika Britanija) sta imela po en specifičen alel.



Se nadaljuje/It follows.

Slika 24: Frekvence alelov posameznih lokusov. Prvi stolpični graf predstavlja frekvenco alela v skupini 40-ih analiziranih akcesij hmelja, druga dva pa njuni relativni frekvenci pri skupini divjih akcesij (25) in skupini kultivarjev (15). Številke nad stolpci predstavljajo, kolikokrat smo posamezen alel določili ob predpostavki, da je osebek s samo enim alelom po lokusu zanj homozigoten.

Figure 24: Frequency of alleles at 15 loci. First bar in graph represents frequency of allele in group of 40 analysed accessions of hop, second and third bars are relative frequencies for group of wild accessions (25) and group of cultivars (15). Numbers above bars are allele counts, with the assumption that a plant with only one allele per locus is homozygous.



Nadaljevanje slike 24: Frekvence alelov posameznih lokusov. Prvi stolpčni graf predstavlja frekvenco alela v skupini 40-ih analiziranih akcesij hmelja, druga dva njuni relativni frekvenci pri skupini divjih akcesij (25) in skupini kultivarjev (15). Številke nad stolpci predstavljajo, kolikokrat smo posamezen alel določili ob predpostavki, da je osebek s samo enim alelom po lokusu zanj homozigoten.

Continuation of figure 24: Frequency of alleles at 15 loci. First bar in graph represents frequency of allele in group of 40 analysed accessions of hop, second and third bars are relative frequencies for group of wild accessions (25) and group of cultivars (15). Numbers above bars are allele counts, with the assumption that a plant with only one allele is homozygous.

Preglednica 15: Genotipsko specifični aleli.

Table 15: Genotype specific alleles.

Lokus	Alel	Akcesija	Lokus	Alel	Akcesija
<i>HIGA3</i>	160	No3-38	<i>HIGA12b</i>	212	K11
<i>HIGA4</i>	234	No3-38	<i>HIGT1</i>	278	35P01
	226	253/95		272	41P36
<i>HIGA9</i>	353	20P14		242	27P04
<i>HIGA12a</i>	260	253/1	<i>HIGT4</i>	252	K7
	256	K11		243	4/4
	250	K7		235	253/95
	249	20P14	<i>HIGT5</i>	286	'Kirin I'
	247	253/95	<i>HIGT8</i>	280	'Wye Target'
	245	41P36		246	106/32
	240	40P19	<i>HIGT10</i>	237	No3-38
	238	R16	<i>HIGT12</i>	171	K11
	208	No3-38		147	No3-38

Dedovanje posameznih alelov smo lahko pri ostalih lokusih preverili na primeru kultivarja 'Ahil', ki je potomec kultivarja 'Brewers Gold' in slovenske moške hmeljne akcesije 3/3. Pri 12-ih lokusih se aleli dedujejo po pričakovanjih, pri treh lokusih pa smo odkrili razhajanje. Pri lokusu *HIGA9* je 'Brewers Gold' heterozigot (193:215), moški hmelj 3/3 pa homozigot (217:217). Potomec 'Ahil' je homozigot za alel 215. Možnost eksperimentalne napake je tu izključena. Pri ostalih dveh lokusih pa dopuščamo možnost eksperimentalne napake. Pri lokusu *HIGT1*, ki je izredno nagnjen k pomnoževanju fragmentov, ki so posledica zdrsa (glej sliko 23), smo določili homozigotnost 'Brewers Golda' (262:262) in genotip 260:264 za akcesijo 3/3. 'Ahilu' smo določili homozigotnost (262:262), vendar dopuščamo možnost, da je alel 260 bp zamaskiran v zdrsnjenih fragmentih. Podobno je pri lokusu *HIGT4*, kjer je 'Brewers Gold' homozigot (197:197) ter 3/3 heterozigot (203:197). Za kultivar 'Ahil' pa smo določili homozigotno stanje (203:203). Dedovanje smo lahko po materni strani preverili še pri kultivarjih 'Aurora' in 'Vojvodina', ki sta prvogeneracijska potomca kultivarja 'Northern Brewer'. V vseh 15-ih primerih sta potomca imela alel kultivarja 'Northern Brewer'.

Z alelnim polimorfizmom smo uspeli ločiti vseh 40 analiziranih akcesij. Za njihovo ločevanje so potrebni minimalno trije lokusi. Z alelnim polimorfizmom lokusov *HIGA12a* in *HIGT1* smo ločili 37 analiziranih akcesij, moški genotip 3/3 in kultivarja 'Savinjski Golding' in 'Vojvodina' pa imajo na teh dveh lokusih identičen profil, zato je za njihovo ločevanje potrebno vključiti še alelni polimorfizem lokusa *HIGA9*.

4.2.4.2 Frekvence genotipov

Pri analiziranih akcesijah hmelja smo določili še porazdelitev posameznih genotipov glede na lokuse in nato porazdelitev pri divjih akcesijah hmelja in kultivarjih (genotipske frekvence, slika 25, preglednica 16). Pri 15-ih lokusih smo skupno določili 172 genotipov (povprečno 11,5), največ pri lokusu *HIGA12a* (25), kjer smo odkrili tudi največ alelov (18) in le dva genotipa pri lokusu *HIGT6* z le dvema aleli (preglednica 16). Pri divjih akcesijah (25) smo skupno določili 147 (85 % vseh) različnih genotipov, pri kultivarjih (15) pa 78 (45 % vseh).

Pri lokusu *HIGA3* smo odkrili 8 genotipov (38 % možnih). Najvišjo frekvenco ima homozigoten genotip 154:154 (25), trije genotipi pa se pojavljajo samo enkrat: 154:158 (253/1), 154:160 (No3-38) in 158:158 (K7). Pri kultivarjih smo odkrili 4 različne genotipe, 7 pa pri divjih akcesijah. Genotip 146:154 je značilen za japonski kultivar 'Kirin I' in kitajski kultivar 'Ging Dao Do Hua'. Genotip 156:158 je bil odkrit le v ruskih akcesijah (K5, K11 in 253/95).

Štirinajst genotipov lokusa *HIGA4* predstavlja 31 % vseh možnih genotipov. Dva genotipa se pojavita samo enkrat pri divjih akcesijah 220:234 (No3-38) in 226:230 (253/95). Največkrat se pojavita homozigoten genotip 230:230 (8) in genotip 222:230 (7). Osem genotipov se pojavi v skupini kultivarjev in 12 pri divjih akcesijah. Japonski in kitajski kultivar ('Kirin I' in 'Ging Dao Do Hua') imata zopet enak genotip, značilen le za njiju (230:240).

Za lokus *HIGA9* je značilno nizko število genotipov pri kultivarjih (5) v primerjavi z vsemi odkritimi genotipi (15). Enajst genotipov se pojavi samo enkrat, genotip 201:215 pri kultivarju 'Ging Dao Do Hua', ostali so značilni za divje akcesije (193:217 – No3-38, 201:217 – A12, 217:219 – R16, 217:225 – 33P26, 217:353 – 20P14, 219:219 – 27P04, 221:221 – K5, 221:229 – K7, 225:229 – 253/95 in 229:229 – 253/1). Skupno smo pri divjih akcesijah odkrili 13 genotipov.

Lokus *HIGA12a* ima največ odkritih genotipov (25 od možnih 171). Osemnajst genotipov se pojavi samo enkrat, od tega trije pri kultivarjih (206:228 – 'Wye Target', 226:226 – 'Coobs' in 228:236 – 'Hallertauer Mtf.'), petnajst pa pri divjih akcesijah, kar predstavlja 75 % analiziranih divjih akcesij hmelja (208:225 – No3-38, 225:238 – R16, 226:236 – 13P01, 226:251 – A16, 228:228 – 27P04, 228:234 – K5, 230:232 – 07P02, 230:240 – 40P19, 230:245 – 41P36, 230:247 – 253/95, 230:251 – 35P01, 230:260 – 253/1, 232:249 – 20P14, 232:256 – K11 in 234:250 – K7). Najpogostejši genotip lokusa je heterozigot 226:230 (alela z najvišjo frekvenco), ki se pojavi 9-krat.

Dva genotipa od petih lokusa *HIGA12b* se ne pojavita pri kultivarjih. Genotip 210:212 je značilen za akcesijo K11. Najpogostejši genotip lokusa je homozigot 210:210, ki se pojavi pri 24-ih hmeljnih rastlinah.

Pri lokusu *HIGA29* smo odkrili sedem genotipov, homozigot 180:180 je značilen za kultivar 'Brewers Gold'. Najpogostejši so štirje genotipi lokusa: 186:186 in 196:196 (9-krat), 186:196 (8-krat) in 180:196 (7-krat).

Preglednica 16: Število določenih alelov in genotipov na lokus pri vseh analiziranih akcesijah hmelja ter njihovo število pri divjih akcesijah in kultivarjih.

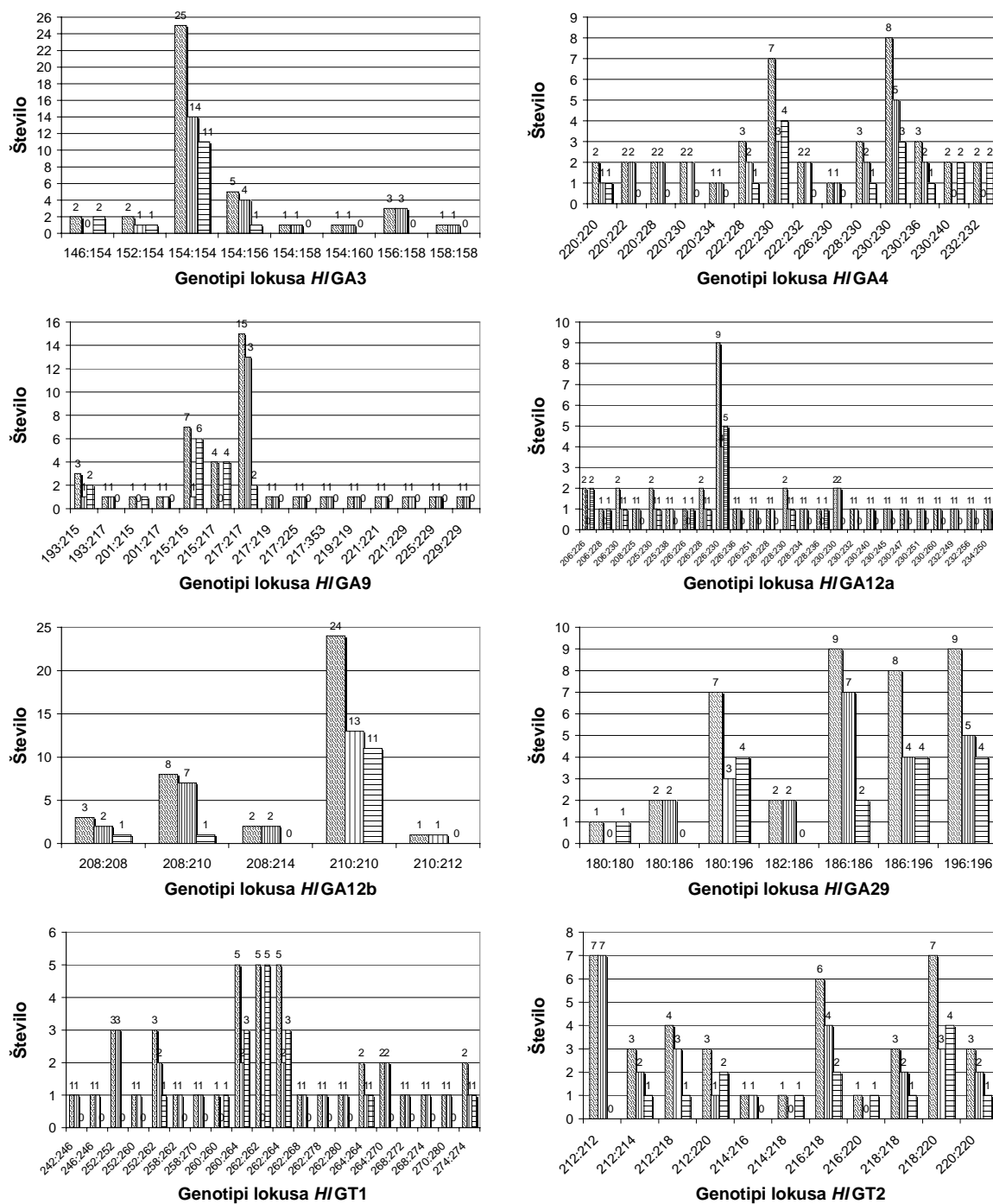
Table 16: Number of detected alleles and genotypes at locus in all analysed hop accessions and their values in groups of wild accessions and cultivars.

Lokus	Aleli			Genotipi			T. Št. ^a
	Divji	Kultivarji	Vsi	Divji	Kultivarji	Vsi	
<i>HIGA3</i>	5	4	6	7	4	8	21
<i>HIGA4</i>	8	7	9	12	8	14	45
<i>HIGA9</i>	9	4	9	13	5	15	45
<i>HIGA12a</i>	18	6	18	21	9	25	171
<i>HIGA12b</i>	4	2	4	5	3	5	10
<i>HIGA29</i>	4	3	4	6	5	7	10
<i>HIGT1</i>	13	5	13	18	7	20	91
<i>HIGT2</i>	5	5	5	9	9	11	15
<i>HIGT4</i>	10	4	11	14	8	19	66
<i>HIGT5</i>	11	7	12	16	9	21	78
<i>HIGT6</i>	2	1	2	2	1	2	3
<i>HIGT8</i>	5	4	6	7	4	8	21
<i>HIGT9</i>	3	3	3	5	3	5	6
<i>HIGT10</i>	3	2	3	4	2	4	6
<i>HIGT12</i>	7	1	7	8	1	8	28
Skupaj	107	58	112	147	78	172	

^a Teoretično število vseh možnih genotipov (vse možne kombinacije alelov).

Pri lokusu *HIGT1* z 20-imi genotipi smo odkrili 12 specifičnih genotipov, eden je homozigoten kultivar 'Osvaldov klon 72' (260:260), vsi ostali so divje akcesije (242:246 – 27P04, 246:246 – 33P26, 252:260 – 4/4, 258:262 – R16, 258:270 – K11, 262:268 – A16, 262:278 – 35PO1, 262:280 – 02P09, 268:272 – 41P36, 268:274 – 13P01 in 270:280 – 34P16). Najpogostejši so trije genotipi tega lokusa z enako pogostostjo (5-krat): 260:264, 262:264 in homozigot 262:262, ki je prisoten le pri kultivarjih.

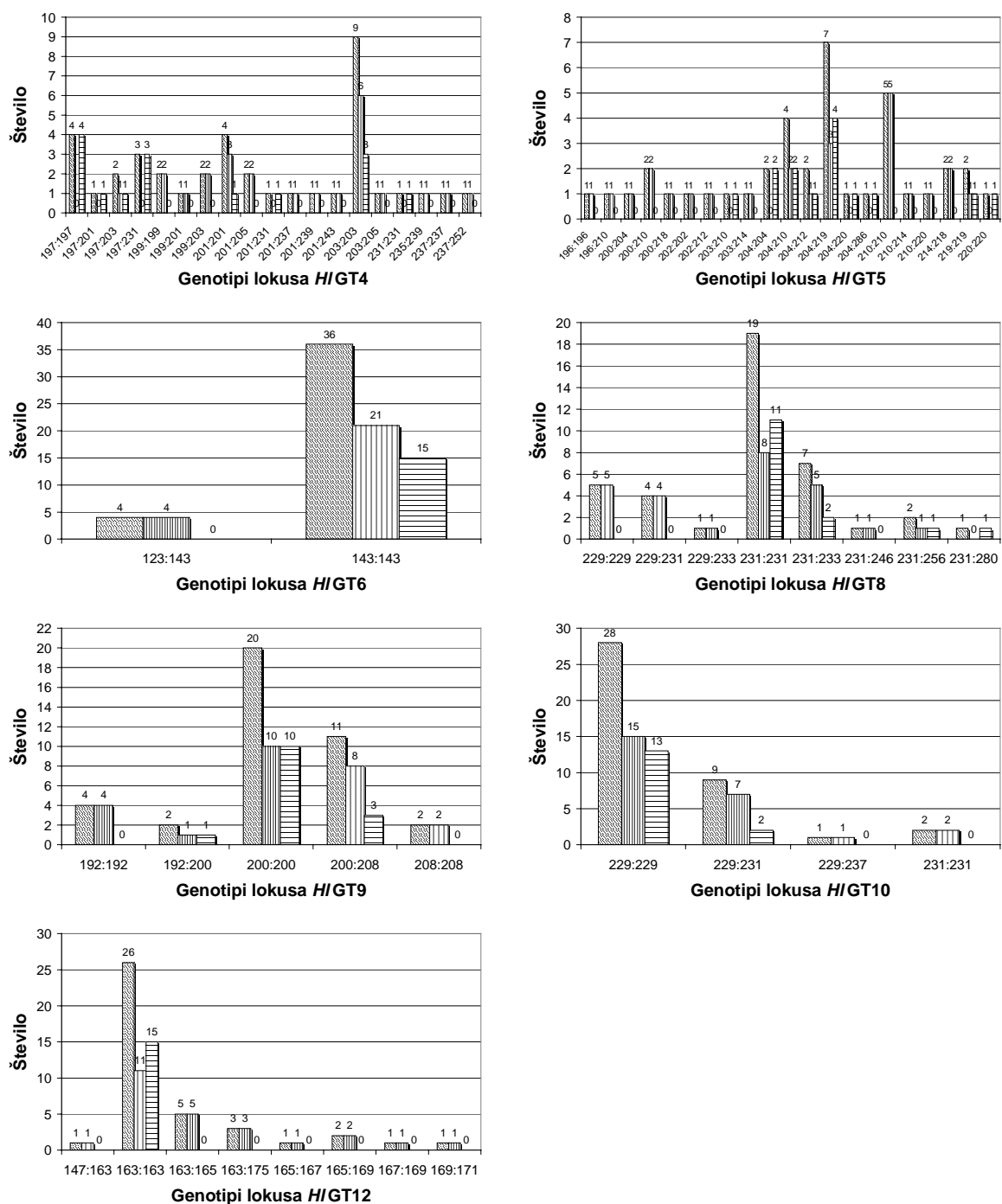
Pri lokusu *HIGT2* smo zaznali 9 genotipov v obeh skupinah, skupno 11 genotipov. Dva specifična sta kultivarja 'Halleratuer Mtf.' (214:218) in 'Northern Brewer' (216:220), eden pa je določen pri divjih akcesijah (R16, 214:216). Najpogostejši so trije genotipi tega lokusa, homozigot 212:212 (7-krat), ki je značilen le za divje akcesije, 218:220 (7-krat) in 216:218 (6-krat).



Se nadaljuje/It follows.

Slika 25: Porazdelitev genotipov na posameznih lokusih. Prvi stolpcični graf predstavlja število genotipov v skupini 40-ih analiziranih akcesij hmelja, druga dva pa sta števili genotipov za skupino divjih akcesij (25) in skupino kultivarjev (15).

Figure 25: Genotype frequencies at analysed loci. First bar in graph represents number of genotypes in group of 40 analysed hop accessions, the other two are numbers of genotypes for group of wild accessions (25) and group of cultivars (15).



Nadaljevanje slike 25: Porazdelitev genotipov na posameznih lokusih. Prvi stolpični graf predstavlja število genotipov v skupini 40-ih analiziranih akcesij hmelja, druga dva pa sta števili genotipov za skupino divjih akcesij (25) in skupino kultivarjev (15).

Continuation of figure 25: Genotype frequencies at analysed loci. First bar in graph represents number of genotypes in group of 40 analysed hop accessions, the other two are numbers of genotypes for group of wild accessions (25) and group of cultivars (15).

Od 19-ih genotipov lokusa *HIGT4* jih je 11 specifičnih, trije so kultivarji 'Savinjski Golding' (197:201), 'Aurora' (201:231) in homozigot 'Kirin I' (231:231), ostalih osem pa divje akcesije, šest od njih iz Rusije (199:201 – A12, 201:237 – K5, 201:239 – 253/1, 201:243 – 4/4, 203:205 – 34P16, 235:239 – 253/95, 237:237 – K11 in 237:252 – K7). Najpogostejši genotip je homozigot 203:203 (9-krat). Genotipa 197:197 (4-krat) in 197:231 (3-krat) sta prisotna le pri kultivarjih. Dva genotipa sta le pri divjih akcesijah, homozigotni (199:199) sta ruski (kavkaški) akcesiji R16 in R21, heterozigotni (201:205) pa ruska (A16) in bosanska akcesija (27P04).

Pri lokusu *HIGT5* smo skupno odkrili 21 (27 % možnih) genotipov, 13 od tega jih je specifičnih. Šestnajst različnih genotipov smo odkrili v divjih akcesijah in 9 v kultivarjih. Specifični genotipi pri kultivarjih so štiri (203:210 – 'Chang Bei No.1', 204:220 – 'Northern Brewer' 204:286 – "Kirin I" in 220:220 – 'Wye Target'), pri divjih akcesijah pa devet (196:196 – K7, 196:210 – K5, 200:204 – A16, 200:218 – 253/95, 202:202 – 35PO1, 202:212 – 02P09, 203:214 – 07P02, 210:214 – A12 in 210:220 – 27P04). Najpogosteje se pojavi genotip 204:219 (7-krat). Homozigoten genotip 204:204 je značilen za kultivarja 'Coobs' in 'Pride of Ringwood', genotipa 200:210 in 214:218 pa le za dve divji akcesiji.

Homozigot 143:143 lokusa *HIGT6* smo zaznali v 90 % analiziranih akcesij (36-krat), vsi kultivarji so imeli ta genotip. Štiri heterozigote (123:143) smo zaznali pri divjih akcesijah.

Od 8-ih genotipov lokusa *HIGT8* so štiri prisotni pri kultivarjih, genotip 231:280 le pri kultivarju 'Wye Target'. Značilna za divje akcesije sta genotipa 229:233 (R21) in 231:246 (106/32). Samo pri divjih akcesijah smo določili še genotipa 229:229 (5-krat) in 229:231 (4-krat). Skupno smo zaznali sedem genotipov pri divjih akcesijah. Najpogostejši genotip lokusa je homozigot 231:231 (19-krat).

Od 5-ih genotipov lokusa *HIGT9* so trije prisotni pri kultivarjih, vsi pa pri divjih akcesijah. Najpogostejša genotipa lokusa sta homozigot 200:200 (20-krat) in 200:208 (11-krat).

Specifičen genotip lokusa *HIGT10* 229:237 ima japonska divja akcesija No3-38, homozigoten genotip 231:231 pa je prisoten le pri dveh ruskih akcesijah (A12 in 253/1). Skupno smo zaznali štiri genotipe, vse pri divjih akcesijah in dva pri kultivarjih. Najpogostejši genotip je homozigot 229:229, opažen v 28-ih hmeljnih rastlinah.

Pri lokusu *HIGT12* (8 genotipov) so bili vsi kultivarji identični s homozigotnim genotipom 163:163, ki je bil v celoti določen pri 26-ih rastlinah. Štiri genotipi so specifični za akcesije No3-38 (147:163), K5 (165:167), 253/95 (167:169) in K11 (169:171). Genotip 165:169 je značilen za ruski akcesiji K7 in 253/1.

4.2.4.3 Parametri variabilnosti

Iz razmerja med heterozigotnimi in vsemi analiziranimi akcesijami smo določili dejansko heterozigotnost, iz frekvenc alelov pa pričakovano heterozigotnost, vrednost PIC,

verjetnost enakosti genotipov in število učinkovitih alelov na lokus. Iz razmerja heterozigotnosti smo določili še oceno frekvence ničtih alelov na posamezen lokus. Posamezne vrednosti za skupino analiziranih 40-ih akcesij in vrednosti za skupino divjih akcesij in skupino kultivarjev so predstavljene v preglednici 17.

4.3 ISKANJE PODOBNOSTI V GENSKI BANKI ZAPOREDIJ

Iskanje podobnosti določenih DNA zaporedij z DNA in proteinskimi zaporedji je potekalo s pomočjo BLAST servisa lociranega na WWW strežniku kot je opisano v poglavju 3.2.5.8.1 Iskanje podobnosti v podatkovnih bazah zaporedij. Rezultati se nanašajo na 26. avgust 2002.

Skupno smo dobili 12 zadetkov, ki kažejo na določeno stopnjo podobnosti z že objavljenimi DNA in/ali proteinskimi zaporedji. Zanimivo je predvsem to, da večina zaporedij iz AT in TAA knjižnice, v kateri nismo določili nobenega mikrosatelitskega zaporedja, kaže določeno stopnjo podobnosti z retrotranspozonskimi proteinskimi zaporedji. Rezultati iskanja, kjer smo z mikrosatelitskimi kloni odkrili določeno stopnjo podobnosti z DNA ali proteinskimi zaporedji, so predstavljeni v prilogi D.

Pri zaporedju AT1 (465 bp) smo s prevedenim DNA zaporedjem v šest možnih proteinskih zaporedij (BLASTX) odkrili stopnjo podobnosti v proteinski bazi zaporedij (nr) z domnevnim poliproteinom retroelementa iz *Arabidopsis thaliane*. Bralni okvir -2 našega zaporedja 149-3 se je ujema s proteinskim zaporedjem 585-633 (39 % identičnost, 54 % pozitivnih aminokislin (AK) in še bralni okvir -3 280-158 se je ujema s proteinskim zaporedjem 543-581 (39 % identičnost, 53 % pozitivnih aminokislin). Vmesni presledek 9-ih baz (3 AK) je v razmerju s proteinskim presledkom treh aminokislin. Vmes se je zamenjal bralni okvir, kar pa je lahko posledica napake v določanju nukleotidnega zaporedja. Nukleotidi 185, 186 in 187 kodirajo v tem bralnem okvirju stop kodon, ki je lahko posledica napake pri določanju nukleotidnega zaporedja ali degeneriranosti zaporedja. Poleg tega zaporedja so določeno stopnjo identičnosti kazala še proteinska zaporedja iz *Arabidopsis* in riža, vse v podobnem območju za poliprotein retroelementov.

Enako je zaporedje AT2 (502 bp) kazalo določeno stopnjo podobnosti (BLASTX) s proteinom kodiranim z genom za reverzno transkriptazo iz špinače (bralni okvir -1, nukleotidi 97-2 s proteinskim zaporedjem 98-129 in bralni okvir -2, nukleotidi 288-160 s proteinskim zaporedjem 37-77). Vmes sta večji vrzeli (62 baz oz. 20 AK), ki pa sta po dolžini skladni. Tudi tu se zamenja bralni okvir. Določeno zaporedje je po kvaliteti slabše, saj 39-im (7,9 %) bazam nismo uspeli določiti natančne nukleotidne vrednosti. Pri drugi podobni regiji sta v tem bralnem okvirju dva stop kodona na mestu 178 in 250. Tudi to zaporedje kaže stopnjo podobnosti z retrotranspozonskimi poliproteini iz *Arabidopsis* in riža. Podobnosti z zaporedji z enakim bralnim okvirjem (-1 in -2) (TBLASTX) in v enakem območju smo odkrili tudi v prevedeni EST bazi pri rastlinah: *Medicago truncatula*, koruza in pšenica, kar lahko kaže na ekspresijo zaporedja.

Preglednica 17: Dejanska in pričakovana heterozigotnost (H_o , H_e), vrednost PIC, verjetnost enakosti genotipov (PI), število efektivnih alelov na lokus (n_e) in ocena frekvence ničtih alelov (r) pri vseh 40-ih analiziranih akcesijah hmelja (Vsi), pri skupini divjih akcesij (D) in pri skupini kultivarjev (CV).

Table 17: Observed and expected heterozygosity (H_o , H_e), PIC value, probability of identity (PI), number of effective alleles (n_e) and null allele estimates (r) for all 40 analysed hop accessions (Vsi), for group of wild accessions (D) and for group of cultivars (CV).

Domnevnemu poliproteinu retroelementa iz *Arabidopsis* je podobno zaporedje AT3 (427 bp), v dveh območjih, med katerima se zamenja bralni okvir. Med območjema je v obeh zaporedjih razdalja približno enaka - 14 baz oz. 5 AK. Prvo območje ima stop kodon na mestu 100, drugo pa na koncu zaporedja na mestih 402 in 417, kar je verjetno posledica nepravilno določenega zaporedja. Enaka območja podobnosti smo določili tudi v prevedeni EST bazi z zaporedji iz pšenice, riža, bora, soje, ječmena, sladkorne pese, sirka in *Arabidopsis*.

Za zaporedje AT5 (289 bp) pa je značilno, da je od 132-e baze naprej kazalo visoko stopnjo podobnosti (85 %) z zaporedji iz DNA (nr) baze, npr. z genomskimi zaporedji kromosomov 4 in 10 iz riža ter z retrotranspozonom *TfcI* (40-103 z območjem 843-780 84 %) iz *Fritillaria camtschaticensis* (AF219177) in gypsy-tip retrotranspozonom iz riža (AB014740) (77-106 93 % in 142-212 83 %). Zaporedje prevedeno v protein (BLASTX) je v celoti visoko podobno z retrotranspozonskimi proteinskimi zaporedji poliproteina, vmes se edino med bazama 109 in 111 zamenja bralni okvir, kar je verjetno posledica ekperimentalne napake. Podobna proteinska zaporedja so določili pri rižu, sirku in ananasu. Podobnost v enakem območju (enak bralni okvir) smo določili še v prevedeni EST bazi pri pšenici, rižu, solati, ječmenu, paradižniku, koruzi, sirku, boru in soji.

Tudi prevedeno zaporedje AT6 (520 bp, BLASTX, bralni okvir -3) kaže v celotni dolžini delno podobnost (31-odstotna identičnost in 61 % pozitivnih AK) s proteinskimi zaporedji poliproteina retroelementa iz *Arabidopsis*, pese in pri tobaku z domnevno integrazo (tudi protein retroelementa). Podobnosti v enakem območju smo odkrili tudi v prevedeni EST bazi.

Za zaporedje AT7 (582 bp) smo ugotovili, da je kodiran v kloroplastnem genomu in kaže visoko stopnjo podobnosti (96 %) na ravni DNA molekule (BLASTN) z intronom gena za NADH dehidrogenazo podenote B, ki je ohranjena pri večini rastlinskih vrst (npr.: koruza, ječmen, pšenica, tobak, špinača, *Cercidiphyllum japonicum*, *Atropa belladonna*, *Populus tomentosa*, *Oenothera elata*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* in še mnogo drugih). Zadnji del zaporedja (577-545 bp) pa kaže podobnost tudi na ravni proteina z začetkom eksona 2.

Prevedeno zaporedje AT9 (BLASTX, 537 bp) kaže največjo stopnjo podobnosti (identičnost 48 %, pozitivne AK 71 %) z domnevnim proteinom iz *Arabidopsis* v bralnem okvirju -1. V enakem območju in bralnem okvirju kaže zaporedje podobnost s poliproteini retrotranspozona iz *Arabidopsis*, riža, sirka in koruze.

Tudi prevedeno zaporedje iz TAA knjižnice (TAA4-13, 398 bp) kaže na podobnost s poliproteinskim zaporedjem retrotranspozona iz *Arabidopsis*. Enako podobnost smo odkrili tudi z zaporedji iz riža in koruze. Enako velja za zaporedje TAA4-12 (434 bp). Premik bralnega okvirja in stop kodon bi bila lahko posledica napake pri določevanju nukleotidnega zaporedja. Tudi pri ostalih zadetkih so zaporedja podobna v obeh bralnih okvirjih in po celotni dolžini zaporedja (riž, ananas, sirek in koruza).

Zaporedje AGA11 (751 bp) je v primerjavi s proteinskimi zaporedji kazalo od 295-tega bp delno podobnost z domnevnim proteinom (*Arabidopsis thaliana*) odgovornim za odpornost na bolezn, vmes se je zamenjal bralni okvir (+1, +3). Podobna zaporedja so prisotna še pri fižolu, rižu, boru in koruzi (protein odgovoren za odpornost na rjo). Zaporedja s podobnostjo v enekem območju in z nekoliko višjo podobnostjo (~60 %) smo odkrili tudi v prevedeni EST bazi (TBLASTX).

Zanimiv primer smo odkrili z iskanjem podobnosti v proteinski bazi zaporedij s prevednim (BLASTX) zaporedjem klona AGA12 (566 bp). Zaporedje je na ravni proteina kazalo visoko podobnost (identičnost 63 %, pozitivnih AK 87 %) z genom za T7 bakteriofagni tip RNA polimeraze iz *Nicotiana sylvestris* (BAB69431). Hmeljno zaporedje kaže podobnost z eksonoma 2 in 3 (slika 26). Glede na tobakovo zaporedje manjka eksonu 2 32 AK, čeprav nekatere druge primerjave kažejo določeno stopnjo podobnosti od 190-e baze dalje (~10 AK). Ekson 3 je popoln, le da je v njem na mestu 484 bp prisoten stop kodon. Sklepamo, da je mikrosatelitsko zaporedje (AAG)₁₆ (84-131 bp) v prvem intronu gena. Visoko stopnjo podobnosti smo odkrili še v podobnem območju in istih bralnih okvirjih z DNA odvisno RNA polimerazo kodirano v mitohondriju iz *Chenopodium album* (CAA69305), z RNA polimerazo kodirano v mitohondriju iz *Nicotiana sylvestris* (CAC95019), z RNA polimerazo kodirano v mitohondriju in kloroplastu iz tobaka (CAC95020), z RNA polimerazo G iz pšenice (AF091838), z RNA polimerazo podobni T7 polimerazi iz koruze (AF127021) in še mnogo drugih.

Podenota B topoizomeraznega gena 6 iz *Arabidopsis* pa je kazala največjo stopnjo podobnosti, tako na ravni DNA kot na ravni proteina (slika 27), s klonom GT2 (603 bp). Pri primerjavi DNA zaporedja z DNA bazo (nr) smo ugotovili, da del zaporedja kaže visoko stopnjo podobnosti (82 %) z mRNA zaporedjem gena za podenoto B topoizomeraze 6. Na ravni proteina pa je omenjena podobnost še mnogo višja, preko 90 %. Po primerjavi zaporedja z genomskim zaporedjem kromosoma 3 *Arabidopsis* (AB025629) smo ugotovili, da se zaporedje hmelja ujema z zaporedji eksonov 9, 10 in 11 gena iz *Arabidopsis* (slika 27). Hmeljni klon ima samo del eksona 9, medtem ko sta eksona 10 in 11 polne dolžine. V intronih 9 in 10 ni bilo nikakršnega nukleotidnega ujemanja, je pa pri hmelju v domnevnem intronu 10 prisotno sestavljeno dinukleotidno mikrosatelitsko zaporedje (GT)₁₄(GA)₁₂, ki ga *Arabidopsis* nima.

Po primerjavi GT2 nukleotidnega zaporedja z EST bazo smo odkrili še podobna zaporedja pri rodu *Medicago truncatula* (2 zaporedji), *Stevia rebaudiana* (1 zaporedje), pšenici (1 zaporedje) in šest pri *Arabidopsis*u. Poravnavi hmeljnega zaporedja (nukleotidnega in proteinskega) s temi zaporedji, napravljenimi s ClustalX 1.81 programom, sta predstavljeni na slikah 28 in 29.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V nalogi smo uspešno izdelali postopek za izdelavo obogatene mikrosatelitske knjižnice hmelja, ki temelji na hibridizacijski selekciji. Skupno smo določili nukleotidno zaporedje 143-im klonom in na podlagi izbranih zaporedij izdelali 20 lokusno specifičnih parov začetnih oligonukleotidov. Določili smo optimalne pogoje pomnoževanja in jih preizkusili na 40-ih akcesijah hmelja in skupini hmeljnih križancev. Razprava je predstavljena v nadaljevanju.

5.1 IZDELAVA POSTOPKA OBOGATENE MIKROSATELITSKE KNJIŽNICE HMELJA

Prvi korak izdelave knjižnice je cepitev DNA na dolžino, ki je primerna za določanje nukleotidnega zaporedja v enem koraku (do 1000 bp). Postopek je možno izvesti s pomočjo ultrazvoka ali pa z uporabo kombinacije različnih RE. V našem primeru smo preizkusili 6 različnih RE in štiri njihove kombinacije. Pri testiranju kombinacij teh RE smo vedno uporabili RE *NheI*, ker z uporabljenim SNX linkerjem vnesemo na konec fragmenta to restrikcijsko mesto, zato moramo za uspešno kloniranje fragmentov v vektor in preprečitev združevanja v himerne DNA molekule s predhodno restrikcijo uničiti vsa njegova prepoznavna mesta v genomski DNA (čeprav za uspešnost razreza ni pomemben). RE *XmnI*, ki prepreči združevanje topih koncev dveh linkerjev, pa nismo vključili v restrikcijo, ker ima malo prepoznavnih mest v genomu hmelja in napravi top konec, ki ga ne moremo uničiti. Preizkusili smo 4 različne kombinacije RE in šele pri kombinaciji, ki je imela poleg RE *NheI* prisotne vse tri RE s prepoznavnim zaporedjem 4 bp (*AluI*, *HaeIII* in *RsaI*), smo dobili večino restrikcijskih fragmentov v območju pod 1000 bp. Tudi fragment nerazrezane genomske DNA pri tej kombinaciji ni bil več viden. Ostale tri kombinacije so imele prisotno genomske DNA (najmočnejši fragment pri kombinaciji 1, slika 2, vzorec 8). Poleg tega so bili prisotni tudi restrikcijski fragmenti daljši od 1000 bp.

Izbrana kombinacija RE *NheI+AluI+HaeIII+RsaI* je bila tudi najboljša pri izolaciji mikrosatelitov iz tropskega drevesa (Hamilton in sod., 1999). Pri testiranju iste kombinacije pri oljki smo ugotovili, da so trije RE s prepoznavnim zaporedjem 4 bp premalo za cepitev genomske DNA. Primerno dolžino restrikcijskih fragmentov smo dobili, ko smo kombinaciji dodali še RE *Sau3A* (4 bp prepoznavno zaporedje) (Bandelj, neobjavljeno). Podatki o uporabi kombinacij RE so različni. Tako so Ostrander in sod. (1992) za razrez genomske DNA psa uporabili zmes treh in dveh RE s prepoznavnim zaporedjem 4 in 6 bp. Za vrsto ptice je najboljše rezultate dala kombinacija dveh RE s 4 in 6 bp prepoznavnim zaporedjem, pri vrstah primatov pa so uporabljali zmes dveh in enega RE s prepoznavnim zaporedjem 4 in 6 bp (Hamilton in sod., 1999). Paetkau (1999) pa je uporabil za tri živalske vrste zmes treh RE s 4 bp prepoznavnim zaporedjem, vendar je še vedno dodatno izoliral fragmente iz gela v območju od 550 do 350 bp.

Prav tako pa naj bi izbira RE pogojevala količino in vrsto nadalje izoliranih mikrosatelitskih ponovitev (Hamilton in Fleischer, 1999). Za namene populacijskih genetskih študij naj bi mikrosatelitske lokuse izolirali iz čim večjega deleža genoma, tako

da dobimo povprečno sliko njegovih evolucijskih dogodkov. Temu pogoju pa zadostimo prav z razrezom DNA z več RE. Enakomerna razporeditev lokusov v genomu ni nujno potrebna, npr. pri analizah starševstva, lahko pa z uporabo več RE povečamo število in raznovrstnost izoliranih mikrosatelitskih lokusov.

Postopku sledi poliranje DNA fragmentov, da uničimo štrleče enojne konce fragmentov, ki jih v našem primeru napravi RE *NheI*. Uporabili smo encim mung nukleazo, ki odstrani omenjene konce in s tem tudi uniči restrikcijsko mesto. V ta namen lahko še uporabimo katerokoli polimerazo s 3'-5' nukleazno aktivnostjo. Avtorji so uporabili Klenow fragment DNA polimeraze I (Ostrander in sod., 1992) ali T4 DNA polimerazo (Karagyzov in sod., 1993), ki lahko restrikcijska mesta ali zapolnita ali uničita. V primeru, da moramo restrikcijsko mesto odstraniti pa uporabimo mung nukleazo (Hamilton in sod., 1999).

Na konce razrezanih genomskih DNA fragmentov je potrebno z ligacijo vnesti linkerje, da dobimo mesta, ki nam pozneje služijo v PCR reakciji kot mesta prileganja začetnih oligonukleotidov. Ponavadi pa z njimi vnesemo tudi restrikcijska mesta za lažje nadaljnje kloniranje fragmentov v vektorje po postopku obogatitve. Linkerji, ki se najpogosteje uporabljajo v literaturi so navedeni v preglednici 2. V našem primeru smo uporabili SNX linker, ki so ga razvili Hamilton in sod. (1999). Omogoča topo ligacijo na fragmente DNA, njegova prednost pred drugimi linkerskimi zaporedji je v tem, da z njim vnesemo dve restrikcijski mesti, najpomembnejša lastnost je pa ta, da pri dimerizaciji dveh linkerjev nastane restrikcijsko mesto *XmnI*, ki ga omenjeni encim v postopku ligacije stalno cepi in s tem zagotavlja reakciji zadostno število monomernih molekul (slika 30).

(a)

StuI ***NheI***
 5'- CTAAGG[∇]CCTTG[∇]CTAGCAGAAGC -3'
 3'- AAAAGATTCC[∇]GGAACGATC[∇]GTCTTCGp -5'

(b)

XmnI
 5'- CTAAGGCCTTGCTAGCAGAAGC[∇]GCTTCTGCTAGCAAGGCCTTAGAAAA -3'
 3'- AAAAGATTCCGGAACGATCGTCTTCG[∇]CGAAGACGATCGTTCCGGAATC -5'

Slika 30: DsSNX linker (a) z restrikcijskimi mesti *StuI* in *NheI* (podčrtano, shematsko prikazana cepitev), rev del linkerja je fosforiliran na 5'-koncu; (b) v primeru nastanka SNX dimera v postopku ligacije se ustvari restrikcijsko mesto *XmnI*.

Figure 30: dsSNX linker (a) with restriction sites *StuI* and *NheI* (underlined, schematically shown restriction sites), reverse part of linker is 5' phosphorylated; (b) in the case of SNX dimer formation during ligation *XmnI* restriction site is formed.

Za selektivno hibridizacijo je potrebno na koščke najlonskih membran pritrditi mikrosatelitske sonde. V PCR smo za 6 ponovitev (2 di-, 3 tri- in 1 teranukleotidno) izdelali dolge mikrosatelitske sonde iz komplementarnih začetnih oligonukleotidov. Dve sondi s 100-odstotnim deležem A/T (AT in TAA) pa se v PCR s *Taq* DNA polimerazo nista podaljšali, vendar smo ju uspeli podaljšali s Klenowim encimom. Medtem ko sta se zaporedji pri uporabi Klenowega encima podaljševali enakomerno (večina fragmentov iste dolžine), so se fragmenti v PCR podaljševali neenakomerno. Podobno sta avtorja

(Schlötterer in Tautz, 1992) odkrila tudi za T7 DNA polimerazo. To razlagata z dejstvom, da po koncu podaljševanja, T7 DNA polimeraza ostane pritrjena na molekulo DNA več ciklov in se zato lahko le-ta podaljša dlje kot pri drugih molekulah. Po avtorjih reakcija doseže vrh po 2 urah, ko so porabljene vse komponente. Dolžina produkta je tudi odvisna od nagnjenosti zaporedja k proizvodnji zdrsa. Kljub temu da smo reakcijo inkubirali 16 ur, se je tudi v našem primeru dolžina TAA zaporedja ustavila pri 350 bp, kar je primerljivo z objavljenimi 400 bp. Prednost PCR podaljševanja sond je predvsem pri trinukleotidnih ponovitvah, saj smo pri ACA sondah dobili glavnino fragmentov pri 250 bp (Klenow encim 120 bp), pri AGA 350 bp (Klenow encim 250 bp) in 150 bp pri CAG sondah (Klenow encim le 50 bp) (slika 3).

Večina avtorjev uporablja pri lovljenju mikrosatelitov s sondami pritrjenimi na membrane začetne oligonukleotide dolge od 25 do 30 bp. Odločitev o uporabi dolgih mikrosatelitskih sond za lovljenje lokusov se je porodila iz članka o izolaciji mikrosatelitov človeka (Armour in sod., 1994) in komentarjev izdelave obogatene mikrosatelitske knjižnice čebule (Fischer in Bachmann, 1998). Avtorja sta sicer uporabila za lovljenje mikrosatelitskih lokusov biotinske sonde, ki sta jih potem vezala s pomočjo streptavidin magnetnega kompleksa. V delu razlagata prednost te metode pred uporabo sond, pritrjenih na membrane. Pri vezavi sonde na membrano nastane kovalentna vez med bazo DNA molekule in površino membrane. Ker je proces vezave sonde na membrano naključen, je lahko tako dinukleotidna sonda, dolga 30 bp, na membrano vezana z 1-14 vezmi (na par ponovitve, dejansko je lahko vezana s 30-imi vezmi). Pri hibridizaciji se zato število dostopnih prostih mikrosatelitskih parov giblje od enega do 14, kar predstavlja izredno široko teoretično temperaturno območje hibridizacije (med 15 in 77 °C). To lahko predstavlja problem pri uporabi ostrejših pogojev hibridizacije. Z uporabo dolgih ponovitev, kot v našem primeru, pa imamo večjo verjetnost, da so pri hibridizaciji na voljo daljše, neprekinjene ponovitve. Uporabo dolgih mikrosatelitskih sond, pritrjenih na membrane, pri lovljenju opisujejo Armour in sod. (1994). Izdelali pa so jih s težavnejšim dvostopenjskim postopkom. V začetku so iz dvoverižnih kratkih oligonukleotidov (vse trinukleotidne ponovitve) z mikrosatelitskim zaporedjem v postopku ligacije napravili do 200 bp dolge sonde, ki so jih nato podaljšali v PCR. Na ta način so dobili do 1000 bp dolge sonde. Za nekatere tri- in tetranukleotidne ponovitve pa so uporabili že znane, zelo dolge mikrosatelitske lokuse človeka, ki so jih pomnožili v PCR in produkte uporabili kot sonde za lovljenje. Postopek izdelave dolgih sond z ligacijo dvoverižnih oligonukleotidov za potrebe hibridizacijskega tipiziranja ponovljivih zaporedij minisatelitov je podrobno opisan (Vergnaud, 1989, Ledwith in sod., 1990).

Prednost uporabe dolgih mikrosatelitskih sond smo dokazali v primerjalnem lovljenju fragmentov z dolgimi sondami in z začetnimi oligonukleotidi (GA)₁₅. Enaka količina PCR-obogatenih fragmentov obeh obravnavanj je v postopku hibridizacije točkovnega odtisa pokazala dvakrat močnejši signal pri fragmentih, ulovljenih z dolgimi mikrosatelitskimi sondami (slika 5a).

Skupno smo izdelali obogatene knjižnice za 8 mikrosatelitskih ponovitev, tri za dinukleotidne ponovitve (GA, GT in AT), štiri za trinukleotidne ponovitve (TAA, ACA, AGA in CAG) ter eno za tetranukleotidno ponovitev (ACTC). V vseh primerih, razen pri AT knjižnici, smo preverili in primerjali s hibridizacijo točkovnega odtisa intenziteto signala pri ulovljeni frakciji z genomsko DNA in razen pri TAA knjižnici dobili močnejše hibridizacijske signale, ki so potrjevali vsebnost ulovljenih mikrosatelitskih zaporedij. Pri TAA knjižnici smo dobili signala pri genomski in ulovljeni DNA približno enake intenzitete. To lahko pomeni, da ulovljeni fragmenti nimajo večji delež TAA ponovitev kot genomska DNA. Pri AT knjižnici pa zaradi samokomplementarnosti sonde hibridizacija ni bila izvedljiva. Skupno smo hibridizacijsko preverili 9018 klonov, vrednosti po posameznih knjižnicah so predstavljene v preglednici 10. Delež pozitivnih klonov, ugotovljen s hibridizacijskim preverjanjem, se je gibal od najvišjih 37 % pri GA knjižnici in 35 % pri GT knjižnici do samo 2 % pri ACTC knjižnici. Ostali deleži so bili vsi med 20 in 30 %: AGA 28 %, ACA 29 % in CAG 23 %. Edino pri knjižnici TAA nismo dobili nobenega pozitivnega signala, kar smo predhodno domnevali že med hibridizacijo točkovnega odtisa, kjer sta bila hibridizacijska signala genomske in ulovljene DNA po intenziteti približno enaka. Povprečna stopnja obogatitve, vključno s TAA knjižnico, je znašala 27 %. Deleži obogatitve po literarnih podatkih zelo variirajo, od 20 do 95 %. Stopnja je odvisna predvsem od tehnike obogatitve, ki so jo uporabili, in od števila korakov obogatitve. Ponavadi se uporabi 1 ali 2 koraka obogatitve, v dveh korakih pa se še dodatno poveča delež klonov z mikrosatelitskimi inserti. V svojem postopku obogatitve s pomočjo sond pritrjenih na membrane so Karagyzov in sod. (1993) po dveh krogih selekcije dobili okrog 40 % klonov z mikrosatelitsko ponovitvijo. Edwards in sod. (1996) so poročali, da je po direktnem določevanju nukleotidnega zaporedja 50-70 % klonov vsebovalo mikrosatelitsko ponovitev. V postopku Armourja in sod. (1994) pa so dobili 30 % klonov, ki so vsebovali mikrosatelitske ponovitve. Pri hibridizacijski selekciji s pomočjo biotin-streptavidin- magnetnega kompleksa pa poročajo avtorji o nekoliko višjem deležu klonov z mikrosatelitskimi inserti. Kandpal in sod. (1994) poročajo o 80 % in 60 % deležu klonov za CA in CAG ponovitve. Refseth in sod. (1997) so dosegli do 78 % klonov v knjižnici. Fischer in Bachmann (1998) poročata o več kot 60 % klonov, ki so vsebovali mikrosatelitsko ponovitev, Hamilton in sod. (1999) pa od 20 do 95 % pozitivnih klonov pri različnih vrstah. Kljub temu da delež obogatitve našega postopka ni ravno med najvišjimi objavljenimi, se moč postopka izkaže ravno v primerjavi med klasično izdelavo knjižnice in knjižnico, izdelano z obogatitvenim postopkom. Klasično knjižnico hmelja so izdelali Brady in sod. (1996) za GA in GT ponovitve. Primerjava njihovih in naših rezultatov je predstavljena v preglednici 18.

Pri primerjavi se dejansko pokaže moč in smiselnost uporabe obogatitvenega postopka. V primeru GA knjižnice smo hibridizacijsko preverili 70-krat manj kolonij kot Brady in sod. (1996), vendar smo določili 2-krat več pozitivnih kolonij. V primeru GT knjižnice, pa smo preverili 78-krat manj kolonij in pri tem zaznali kar 16-krat več pozitivnih kolonij kot pri izdelavi klasične genomske knjižnice hmelja. Te številke zagotovo opravičujejo uporabo

obogatitvenega postopka, čeprav zahteva v začetku nekoliko višji finančni vložek, ki se povrne pri preverjanju manjšega števila kolonij.

Preglednica 18: Primerjava rezultatov klasičnega postopka izolacije mikrosatelitov (Brady in sod., 1996) in obogatitvenega postopka selektivne hibridizacije.

Table 18: Comparison of results obtained by classical microsatellite isolation method (Brady *et al.*, 1996) and enriched library construction by means of selective hybridisation.

Knjižnica	Preverjenih kolonij	Št. pozitivnih	Razmerje	
			Preverjenih	Pozitivnih
Klasična	GA	195000	70:1	1:2
Obogatena		2790		
Klasična	GT	79800	78:1	1:16
Obogatena		1020		

Kot smiseln korak pred določevanjem nukleotidnega zaporedja se je pokazalo tudi preverjanje dolžine insertov v PCR. Z njim smo ocenili dolžino inserta, izločili prekratke inserte, ki ne bi bili primerni za izdelavo začetnih oligonukleotidov in izločili vse klone podobnih dolžin, za katere smo predpostavljali, da vsebujejo isti insert. Nekateri avtorji uporabljajo v tem koraku še boljšo tehniko, kjer potrdijo tudi prisotnost mikrosatelita v klonu in ocenijo dolžino obrobnihih regij, na podlagi katerih dobijo informacijo o primernosti za izdelavo začetnih oligonukleotidov (Waldbieser, 1995). Vendar pa ta korak zahteva pripravo več PCR reakcij za vsak klon, kar se že približa ceni določevanja nukleotidnega zaporedja.

Nukleotidno zaporedje smo skupno določili 143-im klonom, od tega 53-im klonom iz GA, 19-im iz GT, 10-im iz AT, 14-im iz ACA, 21-im iz AGA, 17-im iz CAG, trem iz TAA in 6-im iz ACTC knjižnice.

Naključno izbrani kloni iz AT in TAA knjižnic (13 bakterijskih klonov) niso vsebovali mikrosatelitskega zaporedja, prav tako pa tudi ne po en klon iz ACA, AGA in CAG knjižnice. Na podlagi rezultatov določevanja nukleotidnega zaporedja lahko zaključimo, da metoda ni primerna oz. potrebuje še nadaljnjo optimizacijo za izolacijo dinukleotidnih AT in trinukleotidnih TAA mikrosatelitskih ponovitev in verjetno tudi ostalih A/T mikrosatelitskih zaporedij. Razlog je po vsej verjetnosti v nizki temperaturi taljenja oz. hibridizacije teh ponovitev, pa tudi morda v problemih pri pomnoževanju zaporedij z visokim deležem A/T v PCR (Su in sod., 1996). Izolacija teh zaporedij bi bila zelo zaželena, saj so dokazali, da vsebuje genomsko DNA rastlin največji delež prav dinukleotidnih AT ponovitev (Morgante in sod., 2002), pa tudi trinukleotidne TAA ponovitve naj bi spadale med najpogostejša trinukleotidna zaporedja (Morgante in Olivieri, 1993). V literaturi najdemo podatke o uspešni izolaciji trinukleotidnih TAA ponovitev, npr. pri pšenici so se izkazali za najpogostejše in najbolj polimorfne, vendar so bili izolirani s pomočjo klasičnega postopka izdelave knjižnice (Song in sod., 2002). Motiv

TAA so uspešno izolirali iz obogatene mikrosatelitske knjižnice s pomočjo hibridizacijske biotin-streptavidin hibridizacijske selekcije iz citrusov (Kijas in sod., 1994), vendar so dobili le dve nukleotidni zaporedji, uporabni za pomnoževanje v PCR reakciji (Kijas in sod., 1995). TAA motiv so pri hibridizacijski selekciji uporabljali tudi Hamilton in sod. (1999), vendar niso poročali o uspešnosti izolacije teh lokusov. Omenjeni mikrosatelitski ponovitvi so v svojem postopku hibridizacijske selekcije s pomočjo mešanice sond pritrjenih na membrane uporabili tudi Edwards in sod. (1996), vendar niso poročali o ulovljenih mikrosatelitih z AT ali TAA ponovitvami. Enak postopek z AT in TAA sondama poleg 8-ih drugih motivov so uporabili tudi pri izolaciji mikrosatelitov iz tauschijevega egilopsa (*Aegilops tauschii*), vendar tudi tu niso ulovili niti enega AT mikrosatelita, eno zaporedje pa je imelo kratek (TAA)₅ mikrosatelitski motiv (Guyomarc'h in sod., 2002). Po njihovem mnenju je razlog, da v obogateni knjižnici ni teh zaporedij, predvsem v samokomplementarnosti, ki prepreči hibridizacijo na membrane.

Pri ostalih 6-ih mikrosatelitskih ponovitvah smo določili nukleotidno zaporedje 130-im klonom, ki so kazali pozitiven hibridizacijski signal. Od teh jih je 127 vsebovalo mikrosatelitsko ponovitev (98 %), to je vsi kloni iz GA, GT in ACTC knjižnice, pri vsaki trinukleotidni knjižnici pa smo določili nukleotidno zaporedje enemu klonu (ACA6, AGA10 in CAG3), ki ni vseboval mikrosatelitske ponovitve. To predstavlja zanemarljiv delež v primerjavi z vsemi pozitivnimi kloni in je verjetno posledica nepravilno ovrednotenega hibridizacijskega signala ali nepravilno izbrane kolonije iz petrijevke.

Problem, ki se pojavi pri obogateni mikrosatelitski knjižnici, je ponovljivost (presežek) posameznih klonov. To pomeni, da se določeni kloni v knjižnici pojavijo večkrat, kar smo zaznali tudi v našem primeru (preglednica 19 in preglednica 11).

Preglednica 19: Ponovljivost vseh klonov v 6-ih izdelanih mikrosatelitskih knjižnicah.

Table 19: Redundancy of analysed clones in 6 microsatellite libraries.

Knjižnica	Št. vseh	Št. enkratnih	Pogostnost [%]
GA	53	28	47
GT	19	12	37
ACA	14	8	43
AGA	21	12	43
CAG	17	12	29
ACTC	6	2	67
Skupaj	130	74	43

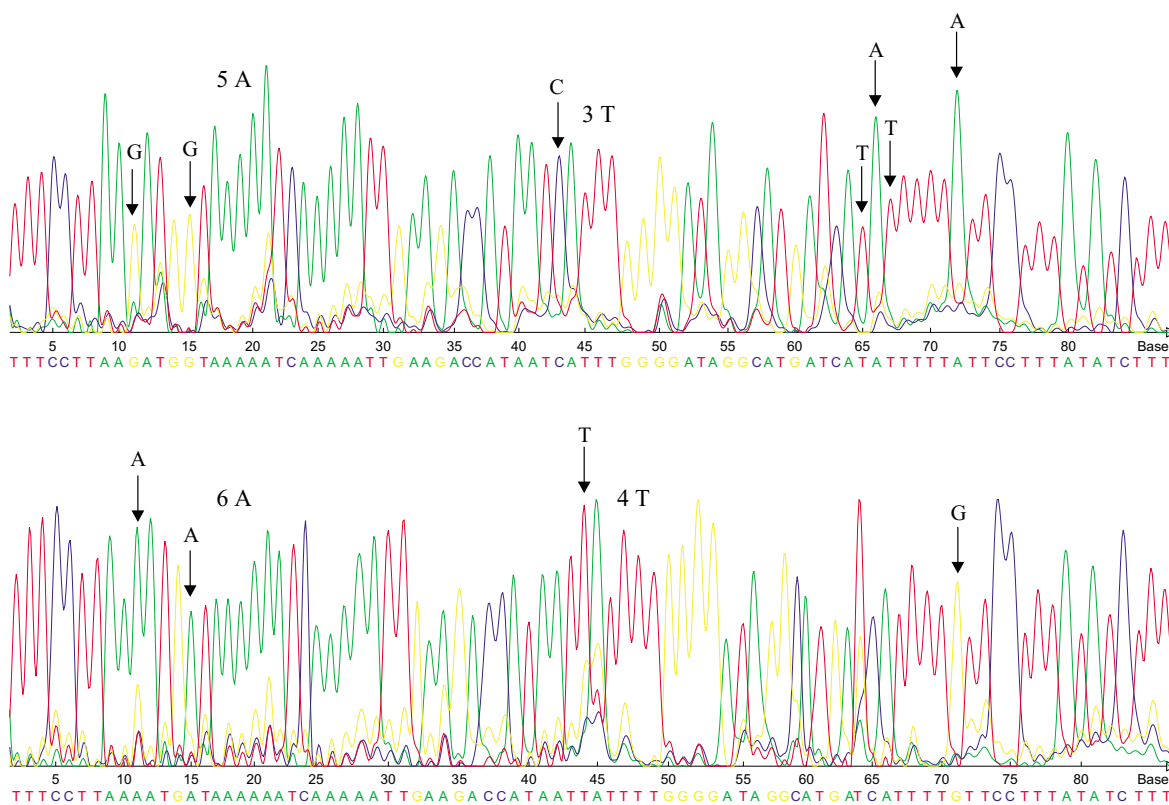
Problem je bil najizrazitejši pri ACTC zaporedju, pri katerem smo hkrati dosegli tudi najnižjo stopnjo obogatitve. Nukleotidno zaporedje smo določili 6-im klonom, vendar smo dobili samo dve enkratni zaporedji (ACTC1 se je pojavilo 2-krat, ACTC2 pa 4-krat), kar predstavlja 67-odstotno pogostnost. Najnižja je bila ponovljivost pri CAG knjižnici (29 %), sledila je GT knjižnica s 37 %, nato ACA in AGA knjižnici s 43 % in GA knjižnica s

47 %. Omenjene številke vsekakor predstavljajo določen problem, ker pride pri določevanju nukleotidnega zaporedja po 20-ih klonih do določene zasičenosti in se enkratni kloni pojavljajo vedno redkeje. Problem so predstavljali samo določeni kloni z visoko ponovljivostjo v knjižnici. Tako se je npr. klon GA5 v knjižnici pojavil kar 11-krat, GA6 5-krat, GA1 in GA29 4-krat, medtem ko se je 5 klonov GA knjižnice pojavilo po 2-krat (preglednica 11). Ostalih 19 klonov se je pojavilo le 1-krat (68 %). Podobno je tudi v ostalih knjižnicah: dva GT klona sta se pojavila 3-krat (GT2 in GT5), trije pa 2-krat (GT1, GT4 in GT6). Sedem klonov GT knjižnice pa se je pojavilo enkrat (58 %). Pri ACA knjižnici, kjer smo določili 8 enkratnih zaporedij, je celoten presežek odpadel na dva klona, ACA1 (pojavil se je 5-krat) in ACA4 (pojavil se je 3-krat). Enako je bilo v AGA knjižnici, le da se je tu klon AGA5 ponovil kar 9-krat, AGA6 pa dvakrat. Ostalih 10 klonov (83 %) pa se je pojavilo po enkrat. Celotna ponovljivost CAG knjižnice pa je odpadla le na klon CAG2, ki se je ponovil 6-krat. Ponovljivost v knjižnici je nezaželena, saj močno vpliva na stroške določevanja nukleotidnega zaporedja. Če izdelamo novo knjižnico, ponavadi z njo izoliramo tudi povsem nove klone (Nataša Štajner, neobjavljeno). Naši podatki o presežku spadajo nekje v sredino objavljenih literaturnih podatkov. Tako so Ashkenazi in sod. (2001) poročali le o 18-ih ponovitvah enakih zaporedij med 200-imi analiziranimi kloni. Tudi pri izdelavi obogatene knjižnice oljke poročajo o 46-odstotni ponovljivosti (Carriero in sod., 2002), medtem ko pri tauschijevem egilopsu med 750-imi kloni poročajo o 25-odstotni ponovljivosti (Guyomarc'h in sod., 2002). Yu in sod. (2002) so pri obogateni knjižnici sončnice, izdelane po postopku Edwardsa in sod. (1996), med 970 kloni, ki so jim določili zaporedje, dobili 27 % unikatnih. Zanimivo pa je delo avtorjev (Paniego in sod., 2002), ki so izdelali klasično genomsko knjižnico sončnice in določili nukleotidno zaporedje 1200-im klonom. Poročajo, da je bilo 50 % klonov ponovljenih, torej so dobili 600 enkratnih zaporedij. Na podlagi tega lahko sklepamo, da ponovljivost določenih klonov ni le lastnost obogatenih knjižnic. Ponovljivost je lahko do določene mere tudi zaželjena, saj nam določevanje nukleotidnega zaporedja istih klonov omogoča odpravljanje napak in nejasnosti pri vprašljivih nukleotidnih regijah. Obenem pa nam določevanje nukleotidnega zaporedja več klonov odkrije dodatno raven polimorfizma – informacijo o polimorfizmu posameznih nukleotidov (SNP⁵⁸). Vendar moramo biti pri vrednotenju teh polimorfizmov pazljivi, ker so bili DNA fragmenti dvakrat pomnoženi v PCR s *Taq* DNA polimerazo, za katero je znano, da ima višji nivo napačnega vstavljanja nukleotidov pri podvojevanju matrice (Cline in sod., 1996). Pri nekaterih primerih smo odkrili nekaj SNP, primer pri ponovitvi GA7 je predstavljen na sliki 31. Zanimivo je tudi, da smo sestavljeno zaporedje GA29 [(CT)₁₈(CA)₁₀], ki smo mu določili nukleotidno zaporedje 4-krat, odkrili 3-krat v GA in enkrat v GT knjižnici.

Brez upoštevanja ponovljenih zaporedij (87 enkratnih zaporedij vključno z zaporedji iz AT in TAA knjižnic) je skupna dolžina določenega nukleotidnega zaporedja 38.007 bp (preglednica 11). Povprečna dolžina inserta tako znaša 437 bp. Kot zanimivost naj povemo, da je bilo 4. novembra 2002 v GenBank javno objavljenih le 58 DNA zaporedij

⁵⁸ Angl. Single Nucleotide Polymorphism.

hmelja v skupni dolžini 75.105 bp. Največ nukleotidnega zaporedja smo določili v GA knjižnici (11.774 bp), dve zaporedji ACTC knjižnice pa sta imeli skupno dolžino 567 bp. Najkrajše nukleotidno zaporedje je bilo zaporedje AGA10 (klon brez mikrosatelita) dolgo 159 bp, najdaljše pa zaporedje ACA8 dolgo približno 920 bp. Točne dolžine tega klona nismo uspeli določiti, ker vsebuje izredno dolg mikrosatelit (v skupni dolžini okrog 350 bp) in mu je tehnično težko določiti natančno zaporedje. Pri določevanju nukleotidnega zaporedja smo naleteli na kar nekaj težav, ki so povezane predvsem z lastnostjo DNA fragmentov. V naši nalogi smo določevali DNA zaporedje le dsDNA matricam (plazmidi) s pomočjo cikličnega določevanja z encimom termo sekvenazo. Največjo težavo so predstavljali kloni CAG knjižnice, kjer smo samo pri zaporedjih CAG3 (brez mikrosatelita) in CAG5 (sestavljen, popoln mikrosatelit, 10 ponovitev) uspeli določiti kvalitetno zaporedje v eni reakciji. Pri ostalih 9-ih zaporedjih pa smo imeli težave določiti natančno zaporedje. Po našem prepričanju je razlog v izredno dolgih mikrosatelitskih ponovitvah teh fragmentov, ki so dolgi tudi nekaj 100 bp (slika 32), saj smo na podoben problem naleteli pri zaporedju ACA8, ki je tudi imelo dolg mikrosatelit.

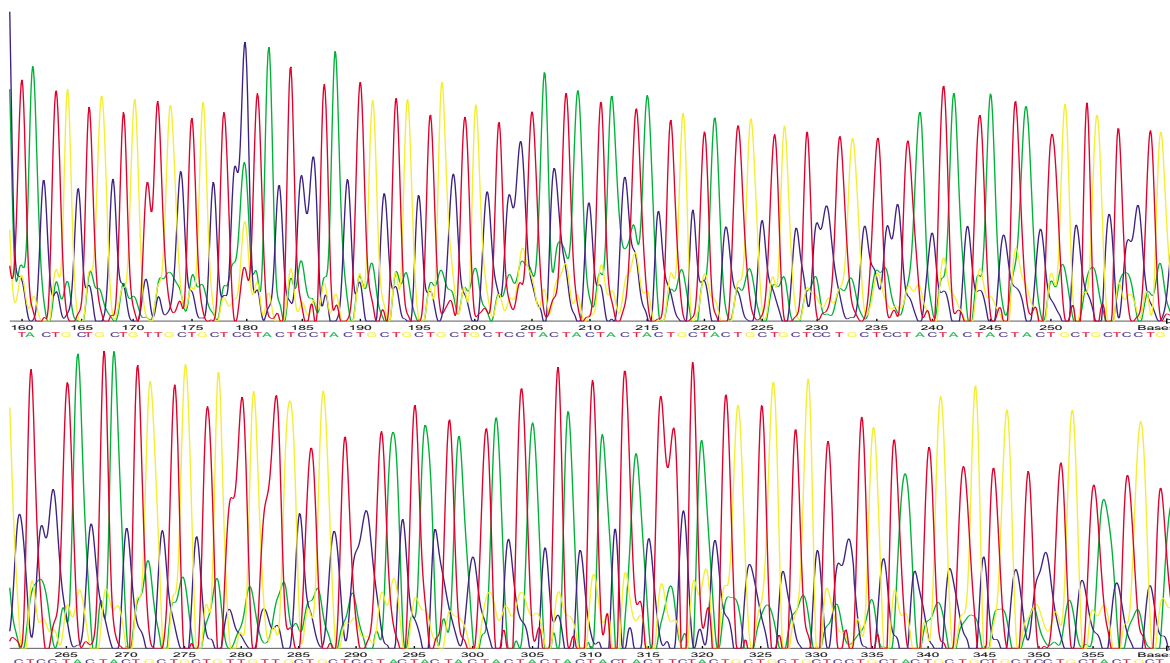


Slika 31: Odkriti SNP polimorfizmi in TAT insercija na označenih nukleotidnih mestih pri vzorcih A8 in E10 klona GA7.

Figure 31: SNP polymorphisms discovered and TAT insertion in marked nucleotide positions in samples A8 and E10 of GA7 clone.

Po našem mnenju lahko dolga mikrosatelitska zaporedja vplivajo na sekundarno strukturo DNA zaporedja, hkrati pa predstavljajo težavno regijo encimu. Kljub temu da ciklični

protokol uporablja visoke temperature (cikel denaturacije DNA) smo v nekaterih primerih preizkusili še dodatek do 5-odstotnega DMSO-ja, ki še dodatno oslabi stabilne regije DNA. Vendar je dodajanje DMSO-ja (1, 2,5 in 5 %) k reakciji kakovost signalov slabšalo in povsem zavrlo reakcijo pri 5 %.



Slika 32: Primer izredno dolgega trinukleotidnega mikrosatelitskega zaporedja kлона CAG4 iz obogatene knjižnice.

Figure 32: An example of long trinucleotide microsatellite of CAG4 clone from enriched library.

Tudi dodajanje termostabilne topoizomeraze (Thermo Fidelase, Fidelity Systems Inc.), ki povsem razvije dvovertično DNA, ni imelo vpliva na kakovost reakcije, zato menimo, da na kakovost določevanja nukleotidnega zaporedja vpliva mikrosatelitsko zaporedje v smislu delovanja na encim (vpliv na hitrost reakcije, inhibicija). Problemi so bili izredno izraziti pri klonih iz GA knjižnice, ki so imeli dolgo in neprekinjeno mikrosatelitsko ponovitev. V primeru, da smo določevali zaporedje GA strani (rezultat komplementaren CT mikrosatelit), je v večini primerov prišlo do kompresije signala (signal prisoten za vse štiri baze v isti točki), čemur je nato najpogosteje sledilo izničenje signala, kar je kazalo na ustavitev reakcije. V primeru, da smo določevali nukleotidno zaporedje CT strani (rezultat GA) pa problem ni bil tako izrazit in je v večini primerov polimeraza prešla skozi mikrosatelitsko regijo (slika 33). Zato bi bilo pri GA klonih zaželeno imeti podatek o orientaciji mikrosatelita v plazmidu.

Nekateri avtorji tudi poročajo o izrazitem pojavu združenih klonov v mikrosatelitskih knjižnicah, to je, da se dva neodvisna lokusa združita v postopku ligacije. Poročajo pa tudi, da klon brez 5' ali 3' obrobne regije služi kot začetni oligonukleotid mikrosatelitskemu zaporedju drugega DNA fragmenta in nastane himera z nepravilnimi obrobni regijami (Koblížková in sod., 1998). Začetni oligonukleotidi napravljeni iz takih zaporedij so

Preglednica 20: Odkriti tipi mikrosatelitov po posameznih genomskih knjižnicah.

Table 20: Types of microsatellites discovered in developed genomic libraries.

Tip MS ^a / Knjižnica	Popoln	Prekinjen	Sestavljen popoln	Sestavljen prekinjen	Skupaj
GA	7	14	2	5	28
Max	GA23 ^b (CT) ₂₄	GA2 (TC) ₁₇ ^c	GA28 (CT) ₂₁ (CA) ₈	GA17 (GA) ₁₆	
Min	GA20 (CT) ₁₁	GA19 (CT) ₅	GA29 (CT) ₁₈ (CA) ₁₀	GA10 (TC) ₈	
GT	2	0	8	2	12
Max	GT7 (CA) ₁₆		GT1 (GT) ₁₃ (GA) ₂₅	GT11 (CA) ₁₃	
Min	GT10 (CA) ₁₀		GT12 (GT) ₁₁ (AT) ₂	GT9 (GT) ₅	
ACA	3	1	0	3	7
Max	ACA4 (TGT) ₁₆	ACA5 (TTG) ₆		ACA1 (AAC) ₁₃	
Min	ACA7 (TTG) ₁₀			ACA2 (GTT) ₇	
AGA	5	2	0	4	11
Max	AGA11 (TTC) ₂₃	AGA8 (GAA) ₁₉		AGA9, AGA2 (CTT) ₁₅	
Min	AGA3 (CTT) ₁₄	AGA6 (GAA) ₁₅		AGA7 (CTT) ₉	
CAG	0	0	1	10 ^d	11
Max			CAG5 (TGG) ₅ (TGC) ₅		
Min					
ACTC	1	0	0	1	2
Max	ACTC1 (AGTG) ₇			ACTC2 (CACT) ₇	
Min					
SKUPAJ ^e	18 (25%)	17 (24%)	11 (15%)	25 (35%)	71
Max	GA23 (CT) ₂₄	AGA8 (GAA) ₁₉	GT1 (GT) ₁₃ (GA) ₂₅	GA17 (GA) ₁₆	
Min	ACTC1 (AGTG) ₇	GA19 (CT) ₅	CAG5 (TGG) ₅ (TGC) ₅	GT9 (GT) ₅	

^a Tip mikrosatelita, kot je razloženo v poglavju 2.1.1 Opisi in definicije.

^b Mikrosatelitski klon, kot je prikazan v preglednici 11.

^c Pri prekinjenem in sestavljenem prekinjenem tipu mikrosatelita je v preglednici predstavljen le najdaljši del ponovitve.

^d Pri CAG klonih nismo uspeli točno določiti nukleotidnega zaporedja.

^e V rubriki skupaj so mikrosatelitska zaporedja razporejena v maksimalni in minimalni razdelek po številu ponovitev in ne po dolžini, npr. tatranukleotidna ponovitev (AGTG)₇ je krajša po številu ponovitev od dinukleotidne ponovitve (CT)₁₁, čeprav je po številu bp daljša.

odkrili večino (83 %) popolnih mikrosatelitov. Z nižjo hibridizacijsko temperaturo smo znižali ostrost pogojev in s tem dovolili določena neujemanja med sondo in matrično DNA. Posledično smo zato izolirali večji delež prekinjenih ponovitev. Pri izdelavi knjižnice moramo zato ekperimentalno odkriti pravo hibridizacijsko temperaturo, saj je predvsem od nje odvisen tip in dolžina mikrosatelitskih ponovitev v knjižnici. Podroben pregled odvisnosti tipa in dolžine mikrosatelitske ponovitve od hibridizacijskih pogojev so pri sladkornem trsu natančno podali Cordeiro in sod. (1999). Najdaljši del prekinjene ponovitve smo odkrili v AGA knjižnici [(GAA)₁₉] in najkrajšega v GA knjižnici [(CT)₅]. Sestavljenih mikrosatelitskih ponovitev iz popolnih zaporedij smo odkrili 11 (15 %), od tega jih je bilo 8 iz GT knjižnice, 2 iz GA in eden iz CAG knjižnice. Najdaljši je bil GT klon, sestavljen iz skupno kar 38-ih GT in GA ponovitev, najkrajši pa klon iz CAG knjižnice iz skupno 10-ih TGG in TGC ponovitev.

Pri izdelavi mikrosatelitske knjižnice je najpomembnejši korak izbira pravilne hibridizacijske temperature selekcije mikrosatelitov in temperature hibridizacijskega pregleda kolonij. Prenizka temperatura vpliva na visok delež prekinjenih in kratkih ponovitev, ki so običajno manj polimorfne. Pri previsoki temperaturi pa izoliramo popolne tipe mikrosatelitov z več ponovitvami osnovnega motiva, le da je njihovo število v knjižnici znatno nižje. Verjetno pa je temperatura hibridizacije delno odvisna tudi od preiskovanega organizma. Zato je izredno pomembno, da eksperimentalno določimo prave temperaturne pogoje, pri katerih dobimo zadostno število dovolj dolgih, predvsem popolnih mikrosatelitov.

5.2 POMNOŽEVANJE MIKROSATELITSKIH LOKUSOV HMELJA

Nukleotidna zaporedja, katera so imela vsaj 20-30 bp dolge obrobne regije (zaporedje na 5' in 3' strani mikrostalita), smo označili kot primerna za izdelavo začetnih oligonukleotidov (preglednica 11). V GT knjižnici smo določili 26 takih zaporedij (93 % vseh), v GA knjižnici 11 (92 %), v ACA knjižnici 7 (88 %, en klon je bil brez mikrosatelitske ponovitve), v AGA knjižnici 11 (92 %, en klon je bil brez mikrosatelitske ponovitve), v ACTC knjižnici pa je bil en klon primeren za izdelavo para začetnih oligonukleotidov (50 %). Zaradi omenjenih težav pri določevanju nukleotidnega zaporedja klonov CAG knjižnice, sta le 2 klona (17 %) primerna za izdelavo para začetnih oligonukleotidov. Večina klonov te knjižnice kaže na to, da je nukleotidno zaporedje brez 3' obrobne regije.

Na podlagi izbranih 9-ih nukleotidnih GA zaporedij in 11-ih GT zaporedij smo s pomočjo programa Prime izdelali 20 parov začetnih oligonukleotidov (preglednica 12). Predvidena dolžina PCR produkta se je gibala od 141 bp pri paru začetnih oligonukleotidov *HIGT6* do 260 bp pri paru začetnih oligonukleotidov *HIGT1*. Povprečna predvidena dolžina 20-ih produktov je 200,6 bp in vsi so v območju, ki je primeren za ločevanje z denaturacijsko PA elektroforezo. Večina začetnih oligonukleotidov je imela delež baz C in G v željenem območju od 45 do 55 % z manjšim odstopanjem pri nekaterih parih do 38 %. Edino par začetnih oligonukleotidov *HIGT11* je imel nizek odstotek baz C in G, *HIGT11-for* 36,8 % in *HIGT11-rev* le 21,7 %.

V prvi fazi testiranja začetnih oligonukleotidov z DNA 6-ih vzorcev hmelja in kontrolnega plazmida pri predvideni teoretični temperaturi prileganja in ločevanju pomnoženih fragmentov z agaroznim gelom smo pri vseh 20-ih parih uspešno pomnožili DNA. Pri večini primerov se je dolžina fragmenta iz kontrolnega plazmida ujemala z dolžino fragmenta iz kultivarja 'Savinjski Golding'. Viden primer razhajanja je pri lokusu *HIGT7* (slika 9). To lahko razložimo z dejstvom, da fragmente DNA pred kloniranjem in določevanjem nukleotidnega zaporedja dvakrat pomnožimo v PCR, kjer nastajajo *in vitro* mutacije mikrosatelitskih ponovitev, zato je velika verjetnost, da se določena dolžina mikrosatelita razlikuje od dejanske dolžine. V drugi fazi optimizacije pa smo prilagodili pomnoževanje lokusov ločevanju z denaturacijsko PA elektroforezo in barvanju s srebrom. V tej fazi smo predvsem variirali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov in število ciklov pomnoževanja. Samo s spreminjanjem teh dveh parametrov smo dobili jasen elektroforetski vzorec pri 13-ih lokusih (65 %). Pri lokusu *HIGA3* smo dobili jasnejši profil s pomnoževanjem v amonij-sulfatnem-BSA reakcijskem pufu. Pri lokusu *HIGT4*, pri katerem se najdaljši alel razlikuje od najkrajšega za 55 bp, je bila potrebna podaljšana inkubacija (2 min namesto 1,5 min) pri 72 °C, da smo dobili nedvoumno pomnožene dolge alele. Pojav je znan tudi iz literature in ga avtorji imenujejo kompeticija kratkega alela, ker pomnoževanje krajšega alela izpodrine pomnoževanje daljšega (Wattier in sod., 1998). Pri štirih lokusih (*HIGA2*, *HIGA28*, *HIGT7* in *HIGT8*) pa smo dobili najboljše pomnoževanje z visoko začetno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov, ki smo jo vsak cikel spustili nižje ("touch down" protokol). Pri vseh štirih parih začetnih oligonukleotidov smo dobili elektroforetski profil, ki je odstopal od pravil za kodominanten markerski sistem (pojav več kot dveh fragmentov pri diploidnem analiziranem osebku). Par začetnih oligonukleotidov *HIGA5* pa je vedno (spreminjanje raznovrstnih parametrov) pomnožil vzorec zdrsnjenih fragmentov, ki so zamaskirali dejanske alele. Locus ima prekinjen mikrosatelit z 20-imi CT ponovitvami in ni najdaljši med analiziranimi. Po vsej verjetnosti bi bilo potrebno za uspešno pomnoževanje na novo izdelati par začetnih oligonukleotidov v drugem delu obrobnih regij.

Samo v primeru lokusa *HIGA9* pa smo pomnožili alela tudi pri sorodni vrsti *H. japonicus*, kar lahko kaže na ohranitev lokusa med vrstama. Pri ostalih lokusih bi bilo potrebno preizkusiti ohlapnejše pogoje pomnoževanja.

5.3 ANALIZA MIKROSATELITSKEGA POLIMORFIZMA

Uspešno pomnoževanje in jasen elektroforetski vzorec smo dobili pri 19-ih (95 %) parih začetnih oligonukleotidov. Te lokuse smo nato analizirali pri 40-ih akcesijah hmelja.

S 13-imi pari začetnih oligonukleotidov (65 % vseh, *HIGA1*, *HIGA3*, *HIGA4*, *HIGA9*, *HIGA29*, *HIGT1*, *HIGT2*, *HIGT4*, *HIGT5*, *HIGT6*, *HIGT9*, *HIGT10* in *HIGT12*) smo pomnožili pričakovan vzorec, se pravi en alel pri homozigotnem ali dva pri heterozigotnem osebku. Pri 6-ih parih (*HIGA2*, *HIGA12*, *HIGA28*, *HIGT7*, *HIGT8* in *HIGT11*) pa smo zasledili odstopanja od tega pravila, ker smo pomnožili 3 ali več fragmentov pri analizirani

hmeljni rastlini. Taki primeri so dobro znani in opisani v literaturi in so lahko posledica ancestralnih duplikacij kromosomov ali pa so posledica aloploidnega ali poliploidnega značaja rastlinske vrste. Tako je kar 29 % izoliranih mikrosatelitov pri jablani kazalo večlokusni elektroforetski profil (Guilford in sod., 1997). S segregacijsko analizo so dokazali pomnoževanje dveh neodvisnih lokusov. Po njihovem mnenju je genom jablane aloploiden, ker ima v družini rožnic največje število kromosomov. Tako naj bi vseboval več kromosomov skupnih prednikov, s tem pa razlagajo tudi pojav večlokusnih mikrosatelitov. O večlokusni amplifikaciji poročajo še pri lucerni (Diwan in sod., 1997), sladkem krompirju (Buteler in sod., 1999) in aktinidiji (Huang in sod., 1998). Pri aktinidiji je 20 % začetnih oligonukleotidov pomnožilo dva lokusa. To govori v prid tezi, da so obstoječe diploidne vrste aktinidije poliploidnega izvora. Pri sladkem krompirju je 30 % začetnih oligonukleotidov pomnožilo več lokusov, kar je po njihovem mnenju posledica duplikacij kromosomov pri prednikih. Tudi pri pšenici, ki je heksaploid, so v nekaterih primerih pomnožili več lokusov (Bryan in sod., 1997).

V našem primeru je 30 % izdelanih začetnih oligonukleotidov kazalo večlokusen značaj. Alo- ali avtopoliploiden značaj hmelja je po vsej verjetnosti izključen, tako da ti primeri večlokusnega pomnoževanja kažejo na določeno stopnjo homologije zaporedja z izoliranim lokusom ali pa so lahko posledica duplikacij. V takih primerih lahko segregacijska analiza potomcev razjasni povezanost določenih alelov, zato smo jo opravili tudi v našem primeru. Analiza je prišla najbolj do izraza pri izredno informativnem lokusu *HIGA12* (23 fragmentov), kjer smo dokazali pomnoževanje dveh lokusov. Na tem lokusu smo pomnožili še monomorfen fragment, ki je po vsej verjetnosti tretji lokus. Pri lokusu *HIGT7* smo s segregacijsko analizo dokazali obstoj ničtih alelov in pomnoževanje dodatnega monomorfnega lokusa. Skupno smo pri prvem lokusu pomnožili 9 alelov. Kar 13 analiziranih akcesij je bilo na tem lokusu homozigotnih za ničti alel, le dve akcesiji pa sta bili heterozigotni. Glede na to, da je lokus kljub pojavu ničtih alelov zelo polimorfen (mikrosatelit (CA)₁₆), bi bilo smiselno napraviti nov par začetnih oligonukleotidov v drugih predelih obrobne regije. Ničti aleli so ponavadi posledica mutacij v obrobni regijah, ki preprečijo uspešno vezavo začetnih oligonukleotidov (Callen in sod., 1993). Pri lokusu *HIGT8* zaradi neinformativnosti staršev nismo uspeli razjasniti dedovanja 206 in 203 bp fragmentov, ki so se pojavili pri 6 analiziranih hmeljnih rastlinah. So pa se ostali aleli dedovali po pričakovanih, zato smo alela 206 in 203 bp izključili iz nadaljne statistične analize. Delne povezave med DNA fragmenti smo lahko določili pri lokusu *HIGT11*, vendar je zaradi kompleksnosti vzorca njegova uporabnost omejena. Pri tem lokusu so prisotni tudi fragmenti, ki se med seboj ločijo le za 1 bp in predstavljajo oviro pri vrednotenju. Pri sestavljenem mikrosatelitskem lokusu *HIGA28* smo določili skupno 15 DNA fragmentov, ki bi bili po značilnem pomnoževanju z zdrsom lahko mikrosatelitski aleli, vendar so bili starši obeh križanj neinformativni, prisotno pa je bilo tudi prekrivanje alelov. Enako kot pri lokusu *HIGT7* domnevamo, da so tudi pri tem lokusu prisotni ničti aleli. Zaradi velikega števila odkritih DNA fragmentov, ki so mikrosatelitski aleli, bi bilo smiselno izdelati nov par začetnih oligonukleotidov. Pri lokusu *HIGA2* pa nismo uspeli ugotoviti povezanosti polimorfnega fragmenta 178 bp, s katerimkoli drugim fragmentom,

poleg tega pa je tudi polimorfnost tega lokusa bila zelo nizka, saj je imelo 73 % akcesij identičen elektroforetski profil. Lokus je kot tak nezanimiv za nadaljne študije.

Pri lokusu *HIGA1* smo pri vseh analiziranih akcesijah pomnožili samo en alel pričakovane dolžine (183 bp). Ta vsebuje prekinjen mikrosatelit z najdaljšo posamezno mikrosatelitsko ponovitvijo, dolgo 12 bp, ostale štiri enote pa imajo skupaj 16 ponovitev. Prekinitve so po vsej verjetnosti stabilizirale lokus tako, da ta ni podvržen mutacijam. Glede na to, da smo v analizo vključili različne hmeljne genotipe, lahko trdimo, da je lokus monomorfen in neuporaben za analizo dednine hmelja.

Skupno število začetnih oligonukleotidov, ki pomnožijo v PCR jasen, kodominanten mikrosatelitski vzorec, je 14 (70 % izdelanih začetnih oligonukleotidov), lokusov pa 15, ker pri paru *HIGA12* pomnožimo dva lokusa. Pri slednjem moramo biti previdni, ker pride do prekrivanja alelov, vendar je lokus izredno uporaben, saj smo skupno zaznali kar 22 različnih alelov. Skupno smo pri 15-ih lokusih pomnožili 112 alelov, kar predstavlja povprečno 7,5 alelov na lokus. Pri naši predhodni raziskavi hmelja s štirimi mikrosatelitskimi lokusi smo določili povprečno 8 alelov na lokus (Jakše in sod., 2001). Število se ujema z literaturnimi podatki, objavljenimi za heterozigotne, trajne vrste. Pri jablani so povprečno zaznali 4,5, 8,2 in 12,1 alelov na lokus (Guilford in sod., 1997; Gianfranceschi in sod., 1998; Hokanson in sod., 1998), pri vinski trti 8,4 in 6 (Thomas in Scott, 1993) in pri kiviju 12,1 (Huang in sod., 1998).

Samo dva alela smo odkrili pri lokusu *HIGT6*, kar omejuje njegovo uporabnost, kar 18 alelov pa pri lokusu *HIGA12a*, ki je tako najbolj polimorfen.

Dolžine alelov so se gibale v pričakovanem dolžinskem območju s sodimi oz. lihimi dolžinami bp (glede na to, da so mikrosateliti z dinukleotidnimi ponovitvami), kot smo ga določili iz zaporedja, izoliranega iz knjižnice. Vendar smo samo pri 5-ih lokusih dejansko odkrili alel enake dolžine kot smo mu jo določili na podlagi nukleotidnega zaporedja klona (pri lokusih *HIGA3*, *HIGA4*, *HIGT1*, *HIGT2* in *HIGT10*). Pri ostalih lokusih pa alela dolžine, določene na podlagi zaporedja iz knjižnice, nismo odkrili. Pojav lahko pojasnimo z dejstvom, da so bili DNA fragmenti 2-krat pomnoženi v PCR in tako izpostavljeni možnim *in vitro* mutacijam, predvsem v predelih mikrosatelita. Lahko smo določili zaporedje klona z *in vitro* skrajšanim ali podaljšanim mikrosatelitskim zaporedjem.

V primerih dveh lokusov smo zaznali dva alela, katerih dolžina je odstopala od povprečne dolžine ostalih alelov. Pri lokusu *HIGA9* je bil to alel 353 bp (iz ženske akcesije 20P14), ostalih 8 alelov tega lokusa pa je razporejenih v območju od 193 do 229 bp. Alel 286 bp lokusa *HIGT5* (cv. 'Kirin I') pa odstopa od območja ostalih 11-ih alelov, ki se nahajajo v območju od 196 do 220 bp.

Pri treh lokusih pa smo odkrili še zanimiv pojav, da se pojavijo tako aleli s sodim kot z lihimi številom bp. Tako smo pri lokusu *HIGA12a* odkrili 5 alelov (28 % vseh) z lihimi številom bp (225, 245, 247, 249 in 251 bp), ki se od prejšnjega ali nadaljnega alela razlikujejo le za 1 bp. Enak pojav dveh alelov z lihimi številom bp (203 in 219 bp) smo

odkrili še pri lokusu *HIGT5* (17 % vseh) in treh alelov s sodim številom bp (246, 256 in 280 bp) pri lokusu *HIGT8* (50 % vseh). Pojav je verjetno posledica mononukleotidnih sprememb v obliki insercij ali delecij v obrobni regiji. V takih primerih se pokaže izredna uporabnost denaturacijske poliakrilamidne elektroforeze, ki ločuje 1 bp natančno (slika 23, lokus *HIGT5*, primerjaj alele akcesij 13 – K11 218 : 214 in 16 – 4/4 219 : 204). Podoben pojav alelov s sodim in lihim številom bp na dveh lokusih so odkrili tudi pri vrsti evkaliptusa *Eucalyptus siberi* (Glaubitz in sod., 2001). Avtorji predvidevajo, da so glavni vir 1 bp razlik med aleli spremembe A in T poli zaporedij, ki so prisotne v obrobni delih pri teh dveh lokusih. Tudi v našem primeru ima zaporedje GA12 ponovitev 5-ih timinov, zaporedje GT5 pa ponovitev 7-ih timinov. Zaporedje GT8 pa ima veliko tri- in tetratiminskih ponovitev. Mutacije v teh regijah bi lahko bile razlog v pojavu alelov, ki se med seboj razlikujejo le za 1 bp.

Identifikacija osebkov je z uporabo mikrosatelitskega polimorfizma postala mnogo lažja, saj so podatki lahko izmenljivi med skupinami, kar je pri multi lokusnih markerskih sistemih težje. Identifikacija hmeljnih kultivarjev je pomembna pri ločevanju sadilnega materiala (Abbot in Fedele, 1994), pri identifikaciji pristnosti tržnega pridelka – hmeljnih storžkov (Araki in sod., 1998) in pri upravljanju z genskimi viri v genskih bankah (Jakše in sod., 2000). Z alelnim polimorfizmom smo v našem primeru uspeli nedvoumno ločiti vseh 40 analiziranih akcesij s tremi lokusi. Z dvema lokusoma (*HIGA12a* in *HIGT1*) smo ločili 37 akcesij (93 % analiziranih), tri akcesije pa smo ločili še dodatno s polimorfizmom enega lokusa (*HIGA9*). Za identifikacijo je izredno pomembnih 26 specifičnih alelov (23 % od vseh določenih), ki so se pojavili le pri eni akcesiji in tako omogočajo njihovo takojšnjo identifikacijo izmed vseh analiziranih. Vendar pa sta samo dva taka alela prisotna pri kultivarjih ('Kirin I' in 'Wye Target'), vsi ostali pa pri divjih akcesijah, kar omejuje njihovo praktično uporabo pri identifikaciji kultivarjev. Kar pet specifičnih alelov se je pojavilo pri japonski moški akcesiji No3-38. Vseh 26 alelov se je pojavilo v 15-ih analiziranih akcesijah (38 % vseh analiziranih) (preglednica 15).

Število in s tem tudi povezane frekvence alelov pri divjih akcesijah (25 rastlin) in kultivarjih (15 rastlin) se razlikujejo v prid večje polimorfnosti, odkrite pri divjih akcesijah (preglednica 16). Analizirali smo sicer več divjih akcesij kot kultivarjev, vendar se pri enakem številu analiziranih kultivarjev rezultati ne bi bistveno spremenili. Že v naši predhodni raziskavi smo opozorili, da je genetska raznolikost različnih svetovnih kultivarjev hmelja zelo ozka, in da jo je potrebno razširiti prav z lastnostmi iz divjih kultivarjev (Jakše in sod., 2001). Enako opozarjajo tudi ostali raziskovalci (Murakami, članek v pripravi). Največ alelov (18 alelov) v skupini divjih akcesij smo odkrili pri najpolimorfnejšem lokusu *HIGA12a* in v skupini kultivarjev pri lokusih *HIGA4* in *HIGT5* (7 alelov). Samo dva alela v skupini divjih akcesij smo določili pri lokusu *HIGT6* in v skupini kultivarjev pri lokusih *HIGA12b* in *HIGT10*. Pri vseh lokusih smo v skupini divjih akcesij odkrili po več alelov, edino pri lokusih *HIGT2* in *HIGT9* smo v obeh skupinah odkrili vse alele. Povprečno smo pri divjih akcesijah odkrili 7,1 alel na lokus (96 % vseh), pri kultivarjih pa 3,9 alela na lokus (52 % vseh). Največje razhajanje je bilo pri lokusu *HIGA12a*, kjer smo v skupini divjih akcesij odkrili kar 12 alelov, ki niso prisotni pri

kultivarjih. So pa tudi primeri alelov, ki so prisotni le v skupini kultivarjev (poleg specifičnih) in so lahko delno primerni za identifikacijo. Tako je npr. alel 146 bp lokusa *HIGA3* značilen za japonski kultivar 'Kirin I' in kitajski kultivar 'Ging Dao Do Hua'. Enako oba kultivarja delita skupni alel 240 bp pri lokusa *HIGT4*. Zanimiv je še alel 197 bp, ki se pojavlja z visoko frekvenco pri kultivarjih, le 1-krat pa pri divji slovenski moški akcesiji 3/3, ki je v naših dosedanjih genetskih raziskavah podobna 'Savinjskemu Goldingu' in morda tudi njegov potomec. Tudi alel 231 bp istega lokusa je značilen le za kultivarje. V skupni kultivarjev sta še dodatno dva lokusa monomorfnata: lokus *HIGT6* in lokus *HIGT12*. Pri slednjem so vsi kultivarji homozigotni za 163 bp alel. Enako kot že v našem predhodnem delu smo opazili specifično geografsko razporeditev alelov (Jakše, 2000). Predvsem so izstopale vse ruske in azijske akcesije oz. že v prejšnjem primeru navedena kultivarja. Prav azijski hmelji naj bi imeli zanimive agronomsko pomembne lastnosti, kot je npr. odpornost na uši (Darby, 1999).

Tudi število in frekvence različnih genotipov, ki so povezani s številom alelov, je posledično pri divjih akcesijah višje kot pri kultivarjih (slika 25). Pri divjih akcesijah smo skupno odkrili 147 različnih genotipov (85 % vseh), pri kultivarjih pa 78 (45 % vseh). Največ genotipov je bilo odkritih pri lokusu *HIGA12a*, skupno 25, od tega kar 21 pri divjih akcesijah in 9 pri kultivarjih (9 še pri lokusih *HIGT2* in *HIGT5*). Preostale štiri divje akcesije tega lokusa so imele genotip 226:230 (31/107, 3/3, akcesiji 33P26 in 32P02). Dve (3/3 in akcesija 33P26) smo lahko dodatno ločili z lokusom *HIGA12b*, ki se pomnoži z istim parom začetnih oligonukleotidov, ostali dve pa sta bili na tem lokusu homozigotni. Vendar pa ju lahko ločimo s pomočjo spolnih znakov (ženska akcesija 32P02 in moška linija 31/107). Dva genotipa smo odkrili pri divjih akcesijah pri lokusu *HIGT6* z dvema aleli in pri kultivarjih pri lokusu *HIGT10*. Vseh specifičnih genotipov, ki se pojavijo samo 1-krat, je 83, od tega jih je 67 v skupini divjih akcesij in le 16 pri kultivarjih. Zanimivo, da je kar pri 13-ih lokusih genotip z najvišjo frekvenco homozigot.

Dejanska heterozigotnost H_o (preglednica 17) se giblje pri vseh analiziranih akcesijah od 0,1 pri lokusu *HIGT6* do 0,897 pri lokusu *HIGA12a*. Pri slednjem je bila dejanska heterozigotnost tudi najvišja pri divjih akcesijah (0,88) in pri kultivarjih (0,928), medtem ko je bila najnižja heterozigotnost pri divjih akcesijah 0,16 (*HIGT6*) in pri kultivarjih 0,077 (*HIGA12b*)⁵⁹. Povprečna dejanska heterozigotnost je imela pri vseh analiziranih akcesijah vrednost 0,471, pri divjih akcesijah 0,509 in pri kultivarjih 0,467. Povprečna pričakovana heterozigotnost H_e , izračunana iz frekvenc alelov, je bila nekoliko višja od dejanske in je znašala pri vseh akcesijah 0,568, pri divjih akcesijah 0,605 in pri kultivarjih 0,49. Pri vseh analiziranih akcesijah je bila najnižja vrednost pričakovane heterozigotnosti 0,095 (*HIGT6*) in najvišja 0,84 (*HIGT1*). Pri istih lokusih sta bili maksimalna (0,882) in minimalna (0,147) vrednost tudi pri divjih akcesijah, medtem ko je bila maksimalna pričakovana heterozigotnost pri kultivarjih 0,747 (*HIGA12a*) in minimalna 0,124 (*HIGT10*). Vrednost efektivnih alelov izloči redke alele in upošteva le alele z višjimi frekvencami. Povprečno

⁵⁹ Če ne upoštevamo dveh monomorfnih lokusov (*HIGT6* in *HIGT12*), kjer je imela dejanska heterozigotnost vrednost 0.

število učinkovitih alelov je bilo pri vseh analiziranih akcesijah 3,3 (povprečno število alelov 7,5), pri divjih akcesijah 3,6 (povprečno število alelov 7,1) in pri kultivarjih 2,5 (povprečno število alelov 3,9).

Vrednost PIC je bila najvišja pri lokusu *HIGT1* (0,823) in najnižja pri lokusu *HIGT6* (0,09). Povprečna PIC vrednost je znašala 0,538. Osem lokusov odgovarja kriterijem $PIC > 0,5$, za katere velja do so zelo informativni, od tega jih 6 izpolnjujejo kriterije za kartiranje ($PIC > 0,7$) (Botstein in sod., 1980).

Verjetnost enakosti genotipov (PI) se uporablja kot merilo ločevanja predvsem v populacijskih študijah (Paetkau in sod., 1995). Nizka vrednost kaže na višjo informativno vrednost lokusa, zmnožek vseh vrednosti po lokusih (potenciran na -1 .) pa nam da teoretično velikost populacije, kjer imata dva izmed posameznikov na vseh lokusih enak genotip. Locus z najnižjo vrednostjo (0,043) je *HIGT1*, kar pomeni dva identična genotipa v skupini 23-ih osebkov. Najmanj informativen pa je locus *HIGT6* z vrednostjo 0,824, kar pomeni, da je skoraj brez sposobnosti za ločevanje. Zmnožek PI vrednosti po vseh lokusih je $3,41 \times 10^{-12}$, kar pomeni izredno visoko sposobnost ločevanja analiziranih akcesij. V skupini divjih akcesij sta bila enaka lokusa s skrajnima vrednostima, pri kultivarjih pa lokusa *HIGA12a* (0,104) in *HIGT10* (0,761).

Samo v primerih dveh lokusov (*HIGA12a* in *HIGT6*) imajo frekvence ničtih alelov (r) negativno vrednost, zato ocenjujemo, da na teh dveh lokusih ni prisotnih ničtih alelov. Pri ostalih lokusih pa pozitivne vrednosti kažejo na njihovo prisotnost, vendar so te vrednosti lahko tudi posledica tega, da analizirana skupina hmelja ne predstavlja naravne populacije.

5.4 ODKRITIE PODOBNOSTI V GENSKI BANKI ZAPOREDIJ

Vsa določena nukleotidna zaporedja smo preverili z BLAST programom, da bi odkrili njihove že znane homologe v proteinski ali DNA bazi zaporedij.

Zelo zanimiv primer smo odkrili pri zaporedjih iz AT in TAA knjižnice, kjer nismo določili nobenega mikrosatelita, vendar je 7 AT zaporedij (70 % določenih) in dve TAA zaporedji (67 % določenih) imelo določeno stopnjo podobnosti z retrotranspozonskimi elementi, predvsem z domnevnim *pol*⁶⁰ genom, ki kodira beljakovino, povezano s sintezo nukleinskih kislin in z rekombinacijo (Lewin, 1997). Zaporedje AT5 je imelo v dolžini 80 bp tudi visoko podobnost na ravni DNA (85-odstotna identičnost), medtem ko so ostala prevedena zaporedja (vseh 6 možnih bralnih okvirjev) kazala podobnost s proteinskimi zaporedji. Tudi obe TAA zaporedji sta kazali podobnost z retrotranspozonskimi elementi na ravni proteina. Maksimalno identičnost na proteinskem nivoju ima zaporedje AT5 (88 %), ki kaže tudi na ohranjeno DNA zaporedje, minimalno pa zaporedje AT3 s 36 % ohranjenih AK. Povprečno je identičnost po retrotranspozonskih zaporedjih 52-odstotna,

⁶⁰ Poliprotein.

povprečno ohranjenih AK⁶¹ po teh zaporedjih pa je 68 %. Razlog, da smo ulovili z AT in TAA sondami ta zaporedja, nam je neznan in do sedaj nedokumentiran v literaturi. V obširni študiji pri ječmenu so odkrili veliko podobnost obrobni zaporedij preko 100-ih izoliranih mikrosatelitov z retrotranspozonskimi elementi (Ramsay in sod., 1999), vendar v našem primeru pri teh zaporedjih nismo imeli mikrosatelitskih ponovitev. Morda je razlog tudi v visokem deležu teh zaporedij v genomu, ki so naključno ostala pritrjena na membrano za lovljenje. Pri koruzi so ugotovili, da skoraj polovico genoma predstavljajo ravno transpozonski elementi (Brown, 2002).

Zanimiv primer iz AT knjižnice je še zaporedje AT7, za katerega smo ugotovili, da je kodiran v kloroplastnem genomu hmelja in kaže visoko stopnjo podobnosti (96 %) na DNA nivoju z intronom gena podenote B NADH dehidrogenaze. Sodeč po velikem številu zaporedij v genski banki, je intron gena ohranjen pri mnogih rastlinskih vrstah.

Podobnost smo zatem odkrili pri dveh zaporedjih iz trinukleotidne AGA knjižnice. V protein prevedeno zaporedje AGA11, z izredno dolgim mikrosatelitom (TTC)₂₃, je od 295. baze dalje (pa do konca zaporedja) kazalo določeno stopnjo podobnosti z domnevnim proteinom, povezanim z odpornostjo na bolezn iz *Arabidopsis*. Podobnost je imela nekoliko nizko identičnost, v prvem delu je bilo ohranjenih 36 % AK (49 % pozitivnih), v drugem pa 43 % (62 % pozitivnih). Izredno dolg mikrosatelit se nahaja v prvem delu zaporedja, ki ne kaže podobnosti z omenjenim proteinom. Domnevamo, da se po vsej verjetnosti nahaja v intronu gena. Drug, zanimivejši primer zaporedja iz AGA knjižnice pa je podobnost klonu AGA12. Tudi v tem primeru je bila odkrita podobnost na nivoju prevedenega zaporedja v protein z genom za T7 bakteriofagni tip RNA polimeraze. Podobnost je kazala višji odstotek identičnosti (60 % prvi del in 63 % drugi del), delež ohranjenih pozitivnih AK pa se je približal 90-im % (87 % in 85 %). O genu je iz literaturnih podatkov znano, da spada med plastidni tip RNA polimeraz, ki so kodirane v jedrni DNA. Njihove biokemične lastnosti se razlikujejo od RNA polimeraz, kodiranih v plastidnem genomu, ki so sestavljene iz 4-ih podenot in jedro kodiranega faktorja podobnega sigma faktorju. V začetku so menili, da je ta tip polimeraze zaradi biokemičnih lastnosti in homologije zaporedja s fagnimi tipi polimeraz podoben T7 bakteriofagni polimerazi (Kobayashi in sod., 2001a). Do sedaj so izolirali številne jedrne gene in cDNA zaporedja rastlin, ki kodirajo fagni tip RNA polimeraz, npr. iz *Chenopodium album* (Weihe in sod., 1997), koruze (Chang in sod., 1999) in pšenice (Ikeda in Gray, 1999). Rezultati kažejo na to, da so ti geni v genomu lahko prisotni v več kopijah in da se njihovi proteini prenašajo tako v plastide kot v mitohondrije ali celo v oba organela. Organelna naravnost je pogojena z alternativnim začetkom translacije mRNA molekule (Hedtke in sod., 2000; Kobayashi in sod., 2001b). Gen iz *Nicotiane sylvestris* je sestavljen iz 19-ih eksonov in 18 intronov, katerih položaj je popolnoma ohranjen v primerjavi s koruznim genom ali genom iz *Arabidopsis*, medtem ko gen iz vrste mahu *Physcomitrella patens* vsebuje še dva dodatna introna (Richter in sod., 2002). Prvi intron *RpoT-A* gena iz

⁶¹ Pomeni, da se kljub zamenjani aminokislini ohrani naboj in s tem po vsej verjetnosti tudi konformacija proteina.

Nicotiane sylvestris je dolg kar 17 kbp in je najdaljši intron do sedaj odkrit pri rastlinah. Hmeljno zaporedje kaže podobnost z exonoma 2 in 3 (slika 26). Glede na tobakovo zaporedje manjka eksonu 2 32 AK, čeprav nekatere primerjave z drugimi zaporedji kažejo podobnost od baze 190 dalje (~10 AK). Ekson 3 je popoln (celotne dolžine), le da je v njem na mestu 484 bp prisoten stop kodon, ki pa je lahko posledica PCR mutacije ali nepravilno določene baze. Sklepamo, da je mikrosatelitsko zaporedje (AAG)₁₆ (84-131 bp) v prvem intronu gena. Visoko stopnjo podobnosti smo odkrili še v podobnem območju in istih bralnih okvirjih z RNA polimerazami drugih rastlinskih vrst. V genski banki je na voljo le celotno zaporedje *RpoT-B* gena iz *Nicotiane sylvestris* (akcesijska številka AB058958). V prvem intronu tega zaporedja, ki je dolg 2922 bp, nismo zasledili nobene mikrosatelitske ponovitve.

Najzanimivejši primer podobnosti pa smo odkrili s primerjavo GT2 zaporedja, tako na DNA kot na proteinskem nivoju (slike 27, 28 in 29). Zaporedje je bilo podobno genu za podenoto B topoizomeraze 6 (*TOP6B*) iz *Arabidopsis*. Gen so nedavno izolirali iz *Arabidopsis* in odkrili, da je sestavljen iz 18-ih intronov in 19-ih eksonov. Predvideno je zgrajen iz 670-ih AK. Najzanimivejše pa je, da je podenota B arhaebakterijskega izvora in je do sedaj niso odkrili v nobenem evkariotskem organizmu. Glede na primerjavo v EST bazi zaporedij, pa je prisotna pri rastlinah (Hartung in Puchta, 2001). Arhaebakterijska topoizomeraza 6 je heterotetramer, sestavljen iz dveh podenot. Katalitična podenota A je homolog kvasnega gena *SPO11*, ki ima pomembno vlogo v mejotski rekombinaciji in po vsej verjetnosti katalizira cepitev DNA vijačnice. Protein ima homologe pri evkariotih, kar kaže na ohranjeno vlogo pri rekombinaciji (Grelon in sod., 2001). Podenota *TOP6B* pa skrbi za vezavo ATP in njegovo hidrolizo, njen homolog pa je bil pri evkariotih do sedaj odkrit le pri rastlinah. Gen *SPO11* ima v *Arabidopsis* tri paraloge, vendar so dokazali interakcijo *TOP6B* le z dvema proteinoma *SPO11-1* in *SPO11-2* (Hartung in Puchta, 2001). Študije *Arabidopsis*ovih mutantov so nedavno dokazale, da imata A in B podenota topoizomeraze 6 velik vpliv na zmanjšano ekspresijo nekaterih genov, posebno tistih za izdolževanje celic, s čimer so lahko razložili pritlikav mutanten fenotip rastlin. Obe mutantni rastlini sta za posamezni podenoti imeli identičen fenotip, prav tako je bila zmanjšana regulacija istih genov, zato avtorji sklepajo, da proteina tvorita kompleks, katerega aktivnost je nujno potrebna za razvoj in rast rastline (Yin in sod., 2002; Hartung in sod., 2002). V primeru domnevnega hmeljnega homologa smo na DNA nivoju odkrili podobnost od 128-te baze dalje, ohranjenih je bilo 83 % nukleotidov. Na proteinskem nivoju pa je celotno zaporedje kazalo podobnost z delom eksona 9 in celotnima eksonoma 10 in 11 gena iz *Arabidopsis*. Identičnost je bila po eksonih 100 %, 79 % in 85 %, delež ohranjenih pozitivnih AK pa je bil 100-, 97- in 91-odstoten. V intronih 9 in 10 ni bilo nikakršnega nukleotidnega ujemanja, je pa pri hmelju v intronu 10 prisoten sestavljen dinukleotiden mikrosatelit (GT)₁₄(GA)₁₂, ki ga gen iz *Arabidopsis* nima (AB025629, 29061-24588 bp, komplementarna stran). Začetne oligonukleotide za pomnoževanje mikrosatelitov lahko izdelamo v eksonih, ker so znani primeri, da so taki markerji uporabni pri medvrstnih pomnoževanjih mikrosatelitov (Peakall in sod., 1998).

5.5 SKLEPI

Uspešno smo razvili metodo izolacije mikrosatelitov pri hmelju, ki je po vsej verjetnosti prenosljiva tudi na druge rastlinske vrste. Metoda omogoča izolacijo večjega števila mikrosatelitskih lokusov v krajšem času kot lahko to dosežemo v primerjavi s klasično izdelavo genomske knjižnice.

Uspešno smo izolirali mikrosatelite iz dveh dinukleotidnih, treh trinukleotidnih in ene tetranukleotidne knjižnice. Skupno smo določili 38.007 bp hmeljnega DNA zaporedja.

Od 20-ih razvitih začetnih nukleotidov jih je 14 primernih za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov hmelja. Z njimi smo pomnožili 15 lokusov s 112-imi različnimi aleli.

Mikrosateliti so se izkazali kot izredno primerni za ločevanje akcesij, saj je za ločitev 40-ih analiziranih akcesij zadostoval polimorfizem treh lokusov.

Odkrili smo dva intronska mikrosatelitska lokusa, ki bi bila morda primerna za vrednotenje polimorfizma pri sorodnih vrstah. Mikrosatelit, lociran v topoizomeraznem genu, bi bil glede na visoko stopnjo podobnosti morda tudi primeren za filogenetske študije.

V prihodnje bi bilo koristno še dodatno preveriti uporabnost izoliranih lokusov pri medvrstnem pomnoževanju v vrsti *H. japonicus* in tudi v konoplji. Izredno zanimivo bi bilo tudi izolirati genske mikrosatelite iz cDNA knjižnice in morda preko heteronuklearne RNA odkriti nove intronske mikrosatelite za uporabo pri medvrstnem pomnoževanju. Najzahtevnejši del razvijanja mikrosatelitskih markerjev je zagotovo optimizacija pogojev pomnoževanja, ki pa bi bila hitrejša in zanesljivejša pri uporabi fluorescentno označenih oligonukleotidov in avtomatskega analizatorja.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Hmelj izvira iz Evrope, Azije in Amerike, v 19. stoletju pa je bil prenešen tudi v Avstralijo. Glavni porabnik hmelja je pivovarska industrija, saj smolne učinkovine hmelja vplivajo na značilen grenak okus piva. Pridelovanje hmelja ima v Sloveniji že stoletno tradicijo in je eden glavnih izvoznih artiklov slovenskega kmetijstva. Molekularni markerji pri hmelju so se že uveljavili za namene identifikacije tako sadilnega materiala kot hmeljnih storžkov, za analize genetske variabilnosti, filogenetske študije in pri kartiranju genoma. Pri vseh analizah so se mikrosateliti izkazali kot najboljši markerski sistem, vendar so bili do sedaj znani le štirje mikrosatelitski lokusi hmelja. Osnovni namen naše naloge je bil razviti metodo izdelave obogatene mikrosatelitske knjižnice hmelja za več različnih tipov ponovitev, s pomočjo katere bomo dosegli višjo pogostnost mikrosatelitskih ponovitev kot pri klasičnem postopku izdelave. V nadaljevanju pa smo želeli izolirane mikrosatelite opredeliti na skupini hmeljnih akcesij.

Mikrosatelitski markerji so postali zelo razširjen in uporaben markerski sistem pri proučevanju rastlinskih genomov, npr. za kartiranje genomov, identifikacijo posameznikov in analize starševstva ter študije filogenetskih povezav. K temu so največ prispevale njihove naslednje lastnosti: kodominantnost, številčnost in enakomerna porazdelitev v genomu in visoka stopnja polimorfizma. Detekcija mikrosatelitskega polimorfizma temelji na uporabi hibridizacijskih tehnik, PCR tehnike ali pa kombinaciji obeh. Vendar pa se dejansko največ uporablja lokusno specifično pomnoževanje mikrosatelitskih markerjev, katerega uporaba zahteva predhodno izolacijo lokusov iz genomske knjižnice in izdelavo specifičnih začetnih oligonukleotidov.

Metodo obogatitve mikrosatelitskih lokusov, ki smo jo uspešno modificirali za potrebe izolacije iz hmelja, temelji na hibridizacijski selekciji DNA fragmentov s pomočjo dolgih mikrosatelitskih sond, ki omogočajo natančnejšo selekcijo lokusov v primerjavi s kratkimi oligonukleotidnimi sondami. Na kratko: (1) genomsko DNA hmelja smo razrezali s štirimi različnimi restrikcijskimi encimi, (2) defosforilirali restrikcijske fragmente, (3) na konce ligirali tope linkerje, (4) DNA fragmente pomnožili v PCR, (5) sledil je postopek selekcije mikrosatelitskih lokusov s pomočjo dolgih sond, pritrjenih na koščke najlonskih membran, (6) ulovljene fragmente smo prevedli v dvoverižne v PCR, (7) preverili smo stopnjo obogatitve s hibridizacijo točkovnega odtisa, (8) fragmente vstavili v vektor in (9) jim določili nukleotidno zaporedje. Metoda je primerna za več tipov mikrosatelitov, saj smo z njo uspešno izolirali lokuse z dinukleotidnimi [(GA)_n, (GT)_n], trinukleotidnimi [(ACA)_n, (AGA)_n in (CAG)_n] in tetranukleotidno [(ACTC)_n] ponovitvijo. Vendar pa metoda po naših rezultatih ni primerna (oz. potrebuje še nadaljne modifikacije) za izolacijo A/T bogatih mikrosatelitskih zaporedij, v našem primeru je to veljalo za (AT)_n in (TAA)_n ponovitvi. Povprečna stopnja obogatitve po knjižnicah je znašala 27%, z najnižjim odstotkom v ACTC (2 %) in najvišjim v GA (37 %) knjižnici (preglednica 10). Skupno smo določili

nukleotidno zaporedje 143-im klonom iz 8-ih knjižnic v skupni dolžini 38.007 bp, od tega jih je 127 vsebovalo mikrosatelitsko ponovitev. Največji delež je bil sestavljenih-prekinjenih tipov mikrosatelitskih lokusov (preglednica 20). Po preverjanju duplikacij smo ugotovili, da smo dobili 74 enkratnih zaporedij. Povprečna pogostnost je znašala (43 %), najvišja je bila v ACTC (67 %) in najnižja v CAG (29%) knjižnici (preglednica 19). Glede na dolžino obrobni regij je 58 enkratnih klonov primernih za izdelavo začetnih oligonukleotidov. Na podlagi GA in GT zaporedij smo izdelali 20 parov začetnih oligonukleotidov, za katere smo določili najuspešnejše pogoje pomnoževanja v PCR (preglednica 13) na skupini 40-ih akcesij hmelja. Analizirane akcesije so se ločile tako po spolu kot geografsko. Skupina divjih hmeljev (25 rastlin) je zajemala akcesije z Balkana in azijske materiale, skupina kultivarjev (15 rastlin) pa je bila zajeta iz različnih pridelovalnih območij (preglednica 3). Po analizi potomstva pri 6-ih lokusih, ki so odstopali od lastnosti, ki veljajo za kodominantne markerje, smo ugotovili, da s 14-imi pari začetnih oligonukleotidov v PCR pomnožimo 15 lokusov. En lokus je bil pri vseh 40-ih akcesijah monomorfen, za enega nismo uspeli določiti pogojev pomnoževanja, pri ostalih štirih pa so bili prisotni ničti aleli ali pa več fragmentov, pri katerih nismo uspeli določiti vzorca dedovanja. Pri petnajstih lokusih smo skupno pomnožili 112 alelnih polimorfizmov, povprečno 7, 5 alelov na lokus. Največ alelov smo zaznali pri lokusu *HIGA12a* (18 alelov) in le dva pri lokusu *HIGT6* (preglednica 14). Skupina divjih akcesij kaže v primerjavi s skupino kultivarjev večjo alelno variabilnost. Odkrili smo tudi 26 specifičnih alelov, ki so prisotni le pri eni akcesiji (preglednica 15). Uspešnost mikrosatelitov za identifikacijo se kaže v tem, da so za razlikovanje vseh akcesij potrebni le trije lokusi. Iz distribucije alelov smo za skupino analiziranih akcesij izračunali tudi statistične vrednosti – mere variabilnosti. Povprečna dejanska heterozigotnost pri vseh analiziranih akcesijah je bila 0,471, povprečna pričakovana heterozigotnost 0,568, povprečno število efektivnih alelov 3,3 in povprečna PIC vrednost 0,538. Zmnožek PI vrednosti po vseh lokusih je $3,41 \times 10^{-12}$, kar kaže na visoko sposobnost ločevanja mikrosatelitskih markerjev (preglednica 17).

Z iskanjem podobnosti v banki zaporedij smo odkrili določeno stopnjo podobnosti z zaporedji retrotranspozonov in zaporedji iz AT in TAA knjižnice. En klon iz AT knjižnice je imel visoko stopnjo podobnosti s kloroplastnim genom. Dva najzanimivejša mikrosatelitska klona pa sta kazala stopnjo podobnosti z genom za T7 bakteriofagni tip RNA polimeraze in za podenoto B topoizomernega gena. Slednji kaže na izredno ohranjenost med rastlinskimi vrstami in bi bil uporaben pri rastlinskih filogenetskih študijah.

Razvita obogatitvena metoda izolacije mikrosatelitskih lokusov hmelja omogoča odkritje večjega števila lokusov v krajšem času kot lahko to dosežemo v primerjavi s klasično izdelavo genomske knjižnice. Najzahtevnejši del razvijanja mikrosatelitskih markerjev je zagotovo optimizacija pogojev pomnoževanja, ki pa bi bila hitrejša pri uporabi fluorescentno označenih oligonukleotidov in avtomatskega analizatorja. Razvitih 15 lokusov pa bo v bodoče služilo tako za potrebe identifikacije hmelja kot za izdelavo njegove genske karte.

6.2 SUMMARY

The hop plant is indigenous to Europe, Asia and America, and in the 19th century it was also introduced to Australia. Hop is mainly used by the beer industry, because it contributes to the bitterness and preservative properties of beer. Hop growing has a long tradition in Slovenia and is the most important export crop of Slovenian agriculture. Molecular markers can be used in hop studies for the identification of seedlings and hop cones, for studies of genetic variability, phylogeny studies and mapping studies. Microsatellites have proven to be the best marker system in all cases, but only four microsatellite loci of hop have been available till now. The main aim of our work was therefore to develop of an enrichment method of microsatellite isolation for different types of motif, by which a higher enrichment of microsatellite sequences could be obtained compared to the classical system of isolation. Subsequently, we aimed to characterise the isolated microsatellite loci on a group of various hop accessions.

Microsatellite have become a widely used marker system for analysis of various plant genomes in, e.g., mapping studies, identification of individuals, pedigree analysis and for phylogeny studies. Their wide acceptance is based on their good properties: co-dominant inheritance, their huge number and even distribution in the genome and the high level of polymorphism that they exhibit. Detection of microsatellite polymorphism is based on the use of hybridisation techniques; a PCR technique or combination of both techniques is employed. Nevertheless, locus specific amplification of microsatellite markers is the only system developed so far which has entered into popular use. However, loci isolation from a genomic library and specific primer development are required for its use.

The enrichment method that was successfully modified for isolation of microsatellite sequences from hop is based on hybridisation selection of DNA restriction fragments with the aid of long microsatellite probes, which enable more precise selection of loci compared to short oligonucleotide probes. Briefly: (1) hop genomic DNA was cut with four different restriction enzymes, (2) dephosphorylated, (3) linkers were added to blunt DNA ends, (4) DNA fragments were amplified in PCR, (5) the procedure of selection with the aid of long probes attached to small pieces of nylon membrane proceeded, (6) captured DNA fragments were converted to double stranded in PCR, (7) the ratio of enrichment was checked by dot-blot hybridisation, (8) fragments were inserted in vector and (9) fragments were sequenced. The method is suitable for different types of microsatellite, because dinucleotide [(GA)_n, (GT)_n], trinucleotide [(ACA)_n, (AGA)_n and (CAG)_n] and tetranucleotide [(ACTC)_n] loci were successfully isolated. On the basis of our results, the method is not suitable (or it needs further modification) for isolation of A/T rich microsatellite sequences, in our case was this for (AT)_n and (TAA)_n repeats. The average enrichment ratio in developed libraries was 27 %, with the lowest ratio in the ACTC library (2 %) and the highest ratio in the GA library (37 %) (Table 10). All together, 143 different clones were sequenced from 8 developed libraries in a total length 38,007 bp. Of these, 127 clones contained microsatellite repeats. Compound-interrupted types of microsatellite repeats were the most common (Table 20). After duplication checking, it was found that 74 unique sequences had been obtained. The average redundancy was 43 %, the highest being in the ACTC library (67 %) and the lowest in the CAG library (29 %) (Table 19). According to the length of the flanking regions, 58 unique clones were suitable for primer development. Twenty different pairs of primers were developed for GA and GT

sequences. Optimal PCR conditions for amplification in PCR were determined for these (Table 19) in a group of 40 hop accessions. The analysed accessions differed according to sex and geographical site of origin. The group of wild hop (25 plants) consisted of plants from the Balkan region and from Asia; the group of cultivars (15 plants) represented various growing regions (Table 3). After segregation analysis of offsprings of two crosses at 6 loci that differed from characteristics valid for codominant markers, it was found that 15 loci were amplified with 14 different pairs of primers. One locus was monomorphic in all 40 analysed accessions, for one amplification procedure could not be determined and for the other four loci, null alleles or a number of fragments were amplified. Patterns of inheritance could not be determined for these. One hundred and twelve different allelic polymorphisms were amplified in 15 loci, an average of 7,5 alleles per locus. The maximum, 18 alleles, were amplified at locus *HIGA12a* and only 2 at locus *HIGT6* (Table 14). The group of wild accessions showed a higher degree of allelic polymorphism than the group of cultivars. Twenty-six genotype specific alleles, found in only one accession, were discovered (Table 15). The utility of microsatellites for identification was highlighted in our study, in which only three loci were needed to distinguish all the analysed accessions. Various statistical values – variability measures - were calculated from allelic distributions. The average observed heterozygosity in all analysed plants was 0,471, the average expected heterozygosity was 0,568, the average effective number of alleles was 3,3, and the average PIC value 0,538. The value of the product of all PI values across all loci is $3,41 \times 10^{-12}$, which demonstrates the high distinguishing capacity of microsatellite markers (Table 17).

Homology searches in GenBank with AT and TAA sequences determined similarity with the retrotransposon sequences. One clone from the AT library had a high similarity with the chloroplast gene. Two of the most interesting clones showed similarity with the gene for the T7 bacteriophage type of RNA polymerase and for the B subunit of the topoisomerase gene. The latter shows a high degree of conservation among plant species and could be used in plant phylogeny studies.

The developed enrichment method for isolation of hop microsatellite loci enables the discovery of a higher number of loci in a shorter time than classical genomic library construction. The optimisation of PCR amplification for the developed pair of primers is the most demanding task of microsatellite marker development. It would be faster if fluorescent labelled primers and an automated system of detection could be applied. Fifteen developed primers could be used in future for identification studies of cultivars and for use in hop mapping.

7 VIRI

- Abbott M.S., Fedele M.J. 1994. A DNA based varietal identification procedure for hop leaf tissue. *Journal of the Institute of Brewing*, 100: 283-285
- Akhtar M.K., Kaderbhai N., Kaderbhai M.A. 2000. Growth of *Escherichia coli* on medium containing glycine increases transformation efficiency. *Analytical Biochemistry*, 277: 273-276
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Alvarez A.E., van de Wiel C.C.M., Smulders M.J.M., Vosman B. 2001. Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationship in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1283-1292
- Angers B., Estoup A., Jarne P. 2000. Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1926-1932
- Araki S., Tsuchiya Y., Takashio M., Tamaki T., Shinotsuka K. 1998. Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56: 81-130
- Armour J.A.L., Neumann R., Gobert S., Jeffreys A.J. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, 3: 599-605
- Armour J.A.L., Alegre S.A., Miles S., Williams L.J., Badge R.M. 1999. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. V: Microsatellites – evolution and applications. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 24-33
- Ashkenazi V., Chani E., Lavi U., Levy D., Hillel J., Veilleux R.E. 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, 44: 50-62
- Ayala F.J., Kiger J.A. 1980. Genetic structure of populations. V: Modern genetics. Menlo Park, The Benjamin Cummings Publishing Company: 597-627
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. 2002. DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 185-190
- Blanquer-Maumont A., Crouau-Roy B. 1995. Polymorphism, monomorphism, and sequences in conserved microsatellites in primate species. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 492-497
- Börner A., Röder M., Korzun V. 1997. Comparative molecular mapping of GA insensitive *Rht* loci on chromosomes 4B and 4D of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 1133-1137
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331
- Brady J.L., Scott N.S., Thomas M.R. 1996. DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica*, 91: 277-284

- Brenig B., Brem G. 1991. Direct cloning of sequence tagged microsatellite sites by DNA affinity chromatography. *Nucleic Acids Research*, 19: 5441
- Brookfield F.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455
- Brown T.A. 2002. Genome anatomies. V: Genomes. 2nd ed. Oxford, BIOS Scientific Publishers: 29-67
- Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Orry A., Smith J.B., Gale M.D. 1997. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 557-563
- Buteler M.I., Jarret R.L., LaBonte D.R. 1999. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 123-132
- Callen D.F., Thompson A.D., Shen Y., Philips H.A., Richards R.I., Mulley J.C., Sutherland G.R. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52: 922-927
- Cardle L., Ramsay L., Milbourne D., Macaulay M., Marshall D., Waugh R. 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 156: 847-854
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 301-307
- Cervera M.-T., Storme V., Ivens B., Gusmao J., Liu, B.H., Hostyn V., Slycken J.V., van Montagu M., Boerjan W. 2001. Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics*, 158: 787-809
- Chambers G.K., MacAvoy E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126: 455-576
- Chang C.-C., Sheen J., Bligny M., Niwa Y., Lerbs-Mache Y., Stern D.B. 1999. Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *The Plant Cell*, 11: 911-926
- Charters Y.M., Robertson A., Wilkinson M.J., Ramsay G. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 442-447
- Cifarelli R.A., Gallitelli M., Cellini F. 1995. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucleic Acids Research*, 23: 3802-3803
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 223-228
- Cline J., Braman J.C., Hogrefe H.H. 1996. PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 24: 3546-3551
- Connell J.P., Pammi S., Iqbal M.J., Huizinga T., Reddy A.S. 1998. A high through-put procedure for capturing microsatellites from complex plant genomes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 341-349

- Cordeiro G.M., Maguire T.L., Edwards K.J., Henry R.J. 1999. Optimisation of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 225-229
- Čerenak A., Javornik B. 1999. Application of male STS marker in hop (*Humulus lupulus* L.) breeding. V: Proceedings of the scientific commission, Pulawy, Poland, 27-30 July 1999. Seigner E. (ed.). Pulawy, International Hop Growers' Convention: 39-42
- Darby P. 1999. New selection criteria in hop breeding. V: Proceedings of the scientific commission, Pulawy, Poland, 27-30 July 1999. Seigner E. (ed.). Pulawy, International Hop Growers' Convention, s. 3-6
- Depeiges A., Goubely C., Lenoir A., Cocherel S., Picard G., Raynal M., Grellet F., Delseny M. 1995. Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 160-168
- Dib C., Fauré S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., Weissenbach J. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, 380: 152-154
- Dietrich W.F., Miller J., Steen R., Merchant M.A., Damron-Boles D., Husain Z., Dredge R., Daly M.J., Ingalls K.A., O'Connor T., Evans C.A., DeAngelis M.M., Levinson D.M., Kruglyak L., Goodman N., Copeland N.G., Jenkins N.A., Hawkins T.L., Stein L., Page D.C., Lander E.S. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, 380: 149-152
- Diwan N., Bhagwat A.A., Bauchan G.B., Cregan P.B. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, 40: 887-895
- Doyle J.J., Morgante M., Tingey S.V., Powell W. 1998. Size homoplasy in chloroplast microsatellites of wild perennial relatives of soybean (*Glycine* subgenus *Glycine*). *Molecular Biology and Evolution*, 15: 215-218
- Echt C.S., May-Marquardt P., Hseih M., Zahorchak R. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39: 1102-1108
- Edwards K.J., Barker J.H.A., Daly A., Jones C., Karp A. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques*, 20: 758-760
- Eisen J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. V: Microsatellites – evolution and applications. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 34-48
- Ellegren H., Moore S., Robinson N., Byrne K., Ward W., Sheldon B.C. 1997. Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 854-860
- Ender A., Schwenk K., Städler T., Streit B., Schierwater B. 1996. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Molecular Ecology*, 5: 437-441
- Estoup A., Cornuet J.-M. 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data. V: Microsatellites – evolution and applications. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 49-65
- Estoup A., Tailliez C., Cornuet J.-M., Solognac M. 1995. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution*, 12: 1074-1084

- Etteldorf N., Etteldorf N., Becker H. 1999. New chalcones from hop *Humulus lupulus* L. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54c: 610-612
- Fabre E., Dujon, B., Richard G.-F. 2002. Transcription and nuclear transport of CAG/CTG trinucleotide repeats in yeast. *Nucleic Acids Research*, 30: 3540-3547
- Fang D.Q., Roose M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 408-417
- Fann J.-Y., Kovarik A., Hemleben V., Tsirekidze N.I., Beridze T.G. 2001. Molecular and structural evolution of Citrus satellite DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1068-1073
- Fischer D., Bachmann K. 1998. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *Biotechniques*, 24: 796-802
- Fisher P.J., Gardner R.C., Richardson T.E. 1996. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Research*, 24: 4369-4371
- Fossati T., Labra M., Castiglione S., Failla O., Scienza A., Sala F. 2001. The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 200-205
- Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M., Gessler C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 1069-1076
- Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Evett I., Hagelberg E., 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*, 6: 130-135
- Glaubitz J.C., Emebiri L.C., Moran G.F. 2001. Dinucleotide microsatellites from *Eucalyptus siberi*: inheritance, diversity, and improved scoring of single-base differences. *Genome*, 44: 1041-1045
- Glenn T.C., Cary T., Dust M., Hauswaldt S., Prince K., Ramsdell C., Shute I. 2000. Chapter 2 - Microsatellite isolation 2000. Savannah River Site, University of Georgia. http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/Msat_Easy_Isolation_2000.rtf (18.okt. 2002)
- Goldstein D.B., Pollock D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88: 335-342.
- Goldstein D.B., Schlötterer C. 1999. Microsatellites – evolution and applications. Oxford, Oxford University Press: 352 s.
- Grelon M., Vezon D., Gendrot G., Pelletier G. 2001. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *The EMBO Journal*, 20: 589-600
- Grist S.A., Fargaria F.A., Morley A.A. 1993. Dinucleotide repeat polymorphisms isolated by the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 15: 304-309
- Guilford P., Prakash S., Zhu J.M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H., Forster R. 1997. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 249-254
- Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 998-1006

- Guyomarc'h H., Sourdille P., Charmet G., Edwards K.J., Bernard M. 2002. Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1164-1172
- Hamilton M.B., Fleischer R.C. 1999. Cloned microsatellite repeats differ between 4-base restriction endonucleases. *Journal of Heredity*, 90: 561-563
- Hamilton M.B., Pincus E.L., Di Fiore A., Fleischer R.C. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 27: 500-507
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166: 557-580
- Hancock J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. V: *Microsatellites – evolution and applications*. Goldstein D.B., Schlotterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 1-9
- Hartl L., Seefelder S. 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 112-116
- Hartung F., Angelis K.J., Meister A., Schubert I., Melzer M., Puchta H. 2002. An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Current Biology*, 12: 1787-1791
- Hartung F., Puchta H. 2001. Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene*, 271: 81-86
- Haunold A. 1991. Cytology and cytogenetics of hops. V: *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B*. Tsuchiya T., Gupta P.K. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers: 551-563
- Haunold A., Likens S.T., Nickerson G.B. 1977. Development of zero-alpha hop genotypes. *Crop Science*, 17: 315-319
- Hayden M.J., Sharp P.J. 2001a. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. *Nucleic Acids Research*, 29: E44-E44
- Hayden M.J., Sharp P.J. 2001b. Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers. *Nucleic acids research*, 29: E43-E43
- Hearne C.M., Ghosh S., Todd J.A. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 8: 288-294
- Hedtke B., Börner T., Weihe A. 2000. One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Reports*, 1: 435-440
- Henderson M.C., Miranda C.L., Stevens J.F., Deinzer M.L., Buhler D.R. 2000. *In vitro* inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*, 30: 235-251
- Hokanson S.C., Szewc-McFadden A.K., Lamboy W.F., McFerson J.R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus X domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 671-683
- Huang W.-G., Cipriani G., Morgante M., Testolin R. 1998. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1269-1278

- Ikeda T.M., Gray M.W. 1999. Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Molecular Biology*, 40: 567-578
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. 1990. High efficiency transformtion of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28
- Ito T., Smith C.L., Cantor C. 1992a. Affinity capture electrophoresis for sequence-specific DNA purification. *Genetic Analysis, Techniques and Applications*, 8: 96-99
- Ito T., Smith C.L., Cantor C.R. 1992b. Triplex affinity capture of single copy clone from a yeast genomic library. *Nucleic Acids Research*, 20: 3524
- Ivančič A. 2002. Osnove rastlinske hibridizacije. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 672 s.
- Jakše J., Javornik B. 1999. Identification of hop cultivar mixtures by means of RAPD, microsatellite and STS markers. V: Proceedings of the scientific commission, Pulawy, Poland, 27-30 July 1999. Seigner E. (ed.). Pulawy, International Hop Growers' Convention: 62-65
- Jakše J. 2000. Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja (*Humulus lupulus* L.) z mikrosatelitnimi markerji. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 89 str.
- Jakše J., Čerenak A., Javornik B. 2000. Molekularni markerji pri proučevanju genetskih virov hmelja (*Humulus lupulus* L.). V: Novi izzivi v poljedelstvu 2000, Moravske toplice, 14-15. dec. 2000. Tajnšek A., Šantavec I. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 144-148
- Jakše J., Kindlhofer K., Javornik B. 2001. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. *Genome*, 44: 773-782
- Jakše J., Šuštar-Vozlič J., Javornik B. 1994. Identification of hop cultivars by RAPD markers. V: Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture, December 5th - 7th 1994, Rogla, Slovenia. Javornik B., Bohanec B., Kreft I. (eds.). Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Centre for Plant Biotechnology and Breeding: 147-151
- Jeffreys A.J., Wilson V., Neumann R., Keyte J. 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 10953-10971
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73
- Kaemmer D., Weising K., Beyermann B., Börner T., Epplen J.T., Kahl G. 1995. Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA. *Plant Breeding*, 114: 12-17
- Kandpal R.P., Kandpal G., Weissman S.M. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 88-92.
- Karagyzov L., Kalcheva I.D., Chapman V.M. 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, 21: 3911-3912

- Kashi Y., Soller M. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. V: *Microsatellites – evolution and applications*. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 10-23
- Kijas J.M.H., Fowler J.C.S., Garbett C.A., Thomas M.R. 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*, 16: 657-662
- Kijas J.M.H., Fowler J.C.S., Thomas M.R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*, 38: 349-355
- Kobayashi Y., Dokiya Y., Sugiura M., Niwa Y., Sugita M. 2001a. Genomic organization and organ-specific expression of a nuclear gene encoding phage-type RNA polymerase in *Nicotiana sylvestris*. *Gene*, 279: 33-40
- Kobayashi Y., Dokiya Y., Sugita M. 2001b. Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289: 1106-1113
- Koblížková A., Doležel J., Macas J. 1998. Subtraction with 3' modified oligonucleotides eliminates amplification artifacts in DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 25: 32-38
- Korzun V., Röder M., Worland A.J., Börner A. 1997. Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breeding*, 116: 227-232
- Korzun V., Röder M.S., Ganai M.W., Worland A.J., Law C.N. 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 1104-1109
- Košir I. 1995. Kemizem in analitika hmelja. *Hmeljarski bilten*, 4: 73-83
- Kralj D. 1962. Morfološke in ekološke značilnosti nekaterih hmeljnih sort. V: 1. jugoslovanski simpozij za hmeljarstvo, Velenje. Petrik C., Kač M., Četina L. (ur.). Žalec, Novi Sad, Inštitut za hmeljarstvo, kooperativa: 50-57
- Kralj D. 1964. Morfološki opis savinjskega goldinga. *Hmeljar*, 5-6: 150-161.
- Kralj D. 1971. Ugotavljanje sorodnosti med sortami hmelja (*Humulus lupulus*) savinjski golding, fuggles in early bird golding. *Hmeljarski bilten*, 2: 65-75
- Kralj D. 1975. Lastnosti hmeljnih sort v kolekciji inštituta za hmeljarstvo v Žalcu. *Hmeljarski bilten*, 3: 46-79
- Kralj D. 1990. Novi hmeljarski kultivarji: cerera, celeia, cekin in cicero. *Hmeljar*, 3: 15
- Kralj D., Friškovec I. 1993. Hmeljni kultivarji v Sloveniji. *Hmeljar*, 63, 2: 23-28
- Kralj D., Wagner T. 1971. Prve slovenske sorte hmelja. *Sodobno kmetijstvo*, 4, 9: 408-411
- Kralj D., Wagner T. 1980. Novi slovenski kultivarji hmelja – bobek, blisk in buket. *Sodobno kmetijstvo*, 13, 7-8: 281-286
- Kralj D., Zupanec J., Vasilij D., Kralj S., Pšeničnik J. 1991. Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. *Journal of the Institute of Brewing*, 97: 197-206
- Kuiper M.T.R., Zabeau M., Vos P. 1999. Amplification of simple sequence repeats. US patent 5874215, 32 str.

- Kump B., Svetek S., Javornik, B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo, 59: 63-66
- Langezaal C.R., Chandra A., Scheffer J.J.C. 1992. Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 14: 353-356
- Ledwith B.J., Manam S., Nicholas W.W., Bradley M.O. 1990. Preparation of synthetic tandem-repetitive probes for DNA fingerprinting. Biotechniques, 9: 148-152
- Lench N.J., Norris A., Bailey A., Booth A., Markham A.F. 1996. Vectorette PCR isolation of microsatellite repeat sequences using anchored dinucleotide repeat primers. Nucleic Acids Research, 24: 2190-2191
- Levinson, G., Gutman G.A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular Biology and Evolution, 4: 203-221
- Lewin B. 1997. Retroviruses and retrotransposons. V: Genes VI. 6th ed. Oxford, Oxford University Press: 597-619
- Li Z., Jakkula L., Hussey R.S., Tamulonis J.P., Boerma H.R. 2001. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. Theoretical and Applied Genetics, 103: 1167-1173
- Liu X.M., Smith C.M., Gill B.S., Tolmay V. 2001. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 102: 504-510
- Lunt D.H., Hutchinson W.F., Carvalho G.R. 1999. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA). Molecular Ecology, 8: 891-893
- Macaulay M., Ramsay L., Powell W., Waugh R. 2001. A representative, highly informative 'genotyping set' of barley SSRs. Theoretical and Applied Genetics, 102: 801-809
- Marchuk D., Drumm M., Saulino A., Collins F.S. 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acids Research, 19: 1154
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7: 639-655
- Matoušek J., Novák P., Břiza J., Patzak J., Niedermeierová H. 2002. Cloning and characterisation of *chs*-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science, 162: 1007-1018
- McCouch S.R., Chen X., Panaud O., Temnykh S., Xu Y., Cho Y.G., Huang N., Ishii T., Blair M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Molecular Biology, 35: 89-99
- Menz M.A., Klein R.R., Mullet J.E., Obert J.A., Unruh N.C., Klein P.E. 2002. A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers. Plant Molecular Biology, 48: 483-499
- Meredith C.P., Bowers J.E., Riaz S., Handley V., Bandman E.B., Dangi G.S. 1999. The identity and parentage of the variety known in California as Petite Sirah. American Journal of Enology and Viticulture, 50: 236-242
- Messier W., Li S.-H., Stewart C.-B. 1996. The birth of microsatellites. Nature, 381: 483

- Minch E. 1997. MICROSAT. Computer program, version 1.5b. Stanford, Stanford University Medical Center
- Miranda C.L., Stevens J.F., Helmrich A., Henderson M.C., Rodriguez R.J., Yang Y.-H., Deinzer M.L., Barnes D.W., Buhler D.R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 271-285
- Moir M. 2000. Hops - a millenium review. *American Society of Brewing Chemists*, 58: 131-146
- Morgante M., Hanafey M., Powell W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetative DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30: 194-200
- Morgante M., Olivieri A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182
- Morgante M., Rafalski A., Biddle P., Tingey S., Olivieri A.M. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome*, 37: 763-769
- Moxon E.R., Wills C. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American*, 280: 94-99
- Murakami A. 2000a. Genetic distances based on RAPD and its application to hop breeding. *Breeding Science*, 50: 23-28
- Murakami A. 2000b. Hop variety classification using the genetic distances based on RAPD. *Journal of Institute of Brewing*, 106: 157-161
- Murakami, A. 2000c. Comparison of sequence of rbcL and non-coding regions of chloroplast DNA and ITS2 region of rDNA in genus *Humulus*. *Breeding Science*, 50: 155-160
- Murakami A. 2001. Structural differences in the intergenic spacer of 18S-26S rDNA and molecular phylogeny using partial external transcribed spacer sequence in hop, *Humulus lupulus*. *Breeding Science*, 51: 163-170
- Neve R.A. 1961. Sex determination in the cultivated hop, *Humulus lupulus*. Thesis, London, University of London: 120 str.
- Neve R.A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- Okada Y., Ito K. 2001. Cloning and analysis of valerophenon synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65: 150-155
- Ostrander E.A., Jong P.M., Rine J., Duyk G. 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 3419-3423
- Paetkau D. 1999. Microsatellites obtained using strand extension: an enrichment protocol. *Biotechniques*, 26: 690-697
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354
- Paniego N., Echaide M., Muñoz M., Fernández L., Torales S., Faccio P., Fuxan I., Carrera M., Zandomeni R., Suárez E.Y., Hopp H. E. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34-43

- Paniego N.B., Zuurbier K.W.M., Fung S.-Y., van der Heijden R., Scheffer J.J.C., Verpoorte R. 1999. Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *European Journal of Biochemistry*, 262: 612-616
- Patzak J., Oriniaková P., Matoušek J., Svoboda P. 1999. Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. *Rostlinná Výroba*, 45: 165-172
- Patzak J., Vejl P., Skupinová S., Nesvadba V. 2002. Identification of sex in F1 progenies of hop (*Humulus lupulus* L.) by molecular marker. *Rostlinná Výroba*, 48: 318-321
- Peakall R., Gilmore S., Keys W., Morgante M., Rafalski A. 1998. Cross species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1275-1287
- Pillay M., Kenny S.T. 1996a. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F1 progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 334-339
- Pillay M., Kenny S.T. 1996b. Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated and wild hop, *Humulus lupulus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 333-340
- Polley A., Seigner E., Ganai M.W. 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome*, 40: 357-361
- Powell W., Morgante M., McDevitt R., Vendramin G.G., Rafalski J.A. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 7759-7763
- Provan J., Powell W., Waugh R. 1996. Analysis of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) using intermicrosatellite amplification. *Genome*, 39: 767-769
- Ramsay L., Macaulay M., Cardle L., Morgante M., Degli Ivanissevich S., Maestri E., Powell W., Waugh R. 1999. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. *The Plant Journal*, 17: 415-425
- Ramsay L., Macaulay M., Degli Ivanissevich S., MacLean K., Cardle L., Fuller J., Edwards K.J., Tuvešson S., Morgante M., Massari A., Maestri E., Marmioli N., Sjakste T., Ganai M., Powell W., Waugh R. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*, 156: 1997-2005
- Refseth U.H., Fangan B.M., Jakobsen K.S. 1997. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis*, 18: 1519-1523
- Richardson T., Cato S., Ramser J., Kahl G., Weising K. 1995. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*, 23: 3798-3799
- Richter U., Kiessling J., Hedtke B., Decker E., Reski R., Borner T., Weihe A. 2002. Two *RpoT* genes of *Physcomitrella patens* encode phage-type RNA polymerases with dual targeting to mitochondria and plastids. *Gene*, 290: 95-105

- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.-H., Leroy P., Ganal M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023
- Rongwen J., Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Lavi U., Cregan P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 43-48
- Rubinsztein D.C., Leggo J., Amos W. 1995. Microsatellites evolve more rapidly in humans than in chimpanzees. *Genomics*, 30: 610-612
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 3 zv. (loč. pag.).
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467
- Sangwan I., O'Brian M.R. 2002. Identification of soybean protein that interacts with GAGA element dinucleotide repeat DNA. *Plant Physiology*, 129: 1788-1794
- Schlötterer C., Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211-215
- Scott L.J., Cross M., Shepherd M., Maguire T., Henry R.J. 1999. Increasing the efficiency of microsatellite discovery from poorly enriched libraries in coniferous forest species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 351-354
- Seefelder S., Ermaier H., Schweizer G., Seigner E. 2000a. Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant Breeding*, 119: 257-263
- Seefelder S., Ehrmaier H., Schweizer G., Seigner E. 2000b. Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. *Plant Breeding*, 119: 249-255
- Sefc K.M., Regner F., Glössl J., Steinkellner H. 1998a. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 37: 15-20
- Sefc K.M., Guggenberger S., Regner F., Lexer C., Glössl J., Steinkellner H. 1998b. Genetic analysis of grape berries and raisins using microsatellite markers. *Vitis*, 37: 123-125
- Sefc K.M., Steinkellner H., Glössl J., Kampfer S., Regner F. 1998c. Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 227-231
- Sharma P.C., Winter P., Bünger T., Hüttel B., Weigand F., Weising K., Kahl G. 1995. Abundance and polymorphism of di-, tri- and tetra-nucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 90-96
- Sharpova N., McMullen M.D., Schultz L., Schroeder S., Sanchez-Villeda H., Gardiner J., Bergstorm D., Houchins K., Melia-Hancock S., Musket T., Duru N., Polacco M., Edwards K., Ruff T., Register J.C., Brouwer C., Thompson R., Velasco R., Chin E., Lee M., Woodman-Clikeman W., Long M.J., Liscum E., Cone K., Davis G., Coe E.H. 2002. Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Molecular Biology*, 48: 463-481
- Sheen J. Y., Seed B. 1988. Electrolyte gradient gels for DNA sequencing. *Biotechniques*, 6: 942-944

- Shephard H.L., Parker J.S., Darbz P., Ainsworth C.C. 2000. Sexual development and sex chromosomes in hop. *New Phytologist* 148: 397-411
- Shepherd M., Cross M., Maguire T.L., Dieters M.J., Williams C.G., Henry R.J. 2002. Transpecific microsatellites for hard pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 819-827
- Simpson W.J. 1993. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *Journal of Institute of Brewing*, 99: 405-411
- Simpson W.J., Smith A.R.W. 1992. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 327-334
- Slate J., Marshall T.C., Pemberton J.M. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program Cervus. *Molecular Ecology*, 9: 801-808
- Small E. 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Systematic Botany*, 3: 37-76
- Song Q.J., Fickus E.W., Cregan P.B. 2002. Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 286-293
- Stevens J.F., Ivancic M., Hsu V.L., Deinzer M.L. 1997. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 44: 1575-1585
- Su X.-Z., Wu Y., Sifri C.D., Wellems T.E. 1996. Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Research*, 24: 1574-1575
- Sušnik F. 1967. Spolni hromosomi pri hmelju (*Humulus lupulus* L.). V: 2. jugoslovanski simpozij za hmeljarstvo. Dobrna, 26.-27. maj 1967. Četina L. (ur.). Inštitut za hmeljarstvo Žalec in Inštitut za poljoprivredna istraživanja Novi Sad: 53-65
- Šesek P., Šuštar-Vozlič J., Bohanec B. 2000. Determination of aneuploids in hop (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry. *Pflügers Archiv*, 439: r016-r018
- Šuštar J. 1992. Diskriminantna i faktorska analiza u klasifikaciji genotipova hmelja (*Humulus lupulus* L.). Magistarski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet: 72 str.
- Šuštar-Vozlič J. 1996. Žlahtnjenje hmelja (*Humulus lupulus* L.) v Sloveniji. V: Žlahtnjenje rastlin in semenarstvo v Sloveniji. Strokovno posvetovanje. Ljubljana, 7. marec 1996. Bohanec B., Zor T., Luthar Z. (ur.). Ljubljana, ZDKIT Slovenije, Sekcija za žlahtnjenje in Sekcija za semenarstvo: 18-23.
- Šuštar-Vozlič J., Javornik B. 1999. Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breeding*, 118: 175-181
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S., McCouch S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*, 11: 1441-1452
- Testolin R., Huang W.G., Lain O., Messina R., Vecchione A., Cipriani G. 2001. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 30-36
- Thomas M.R., Scott N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 985-990

- Tóth G., Gáspári Z., Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981
- Townsend M.S., Henning J.A., Moore D.L. 2000. AFLP analysis of DNA from dried hop cones. *Crop Science*, 40: 1383-1386
- Van Belkum A., Scherer S., van Alphen L., Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 275-293
- Van de Wiel C., Arens P., Vosman B. 1998. Microsatellite fingerprinting in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives. *Plant Cell Reports*, 17: 837-842
- Vergnaud G. 1989. Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. *Nucleic Acids Research*, 17: 7623-7630
- Viard F., Franck P., Dubois M.-P., Estoup A., Jarne P. 1998. Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution*, 47: 42-51
- Vos P., Hogers R., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414
- Wagner H.W., Sefc K.M. 1999. IDENTITY. Compute program, version 1.0. Vienna, Center for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences
- Waldbieser G.C. 1995. PCR-based identification of AT-rich tri and tetranucleotide repeat loci in an enriched plasmid library. *Biotechniques*, 19: 742-744
- Wang G., Mahalingam R., Knap H.T. 1998. (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 1086-1096
- Wang Z., Weber J. L., Zhong G., Tanksley S. D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 1-6
- Wattier R., Engel C.R., Saumitou-Laprade P., Valero M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 7: 1569-1573
- Weber J.L., May P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396
- Weihe A., Hedtke B., Börner T. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Research*, 25: 2319-2325
- Weising K., Fung R.W.M., Keeling D.J., Atkinson R.G., Gardner R.C. 1996. Characterisation of microsatellites from *Actinidia chinensis*. *Molecular Breeding*, 2: 117-131
- Weising K., Winter P., Hüttel B., Kahl G. 1998. Microsatellites markers for molecular breeding. *Journal of Crop Production*, 1: 113-143
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218

- Westneat D.F., Noon W.A., Reeve H.K., Aquadro C.F. 1988. Improved hybridization conditions for DNA 'fingerprints' probed with M13. *Nucleic Acids Research*, 16: 4161
- White G., Powel W. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology*, 6: 851-860
- Williams, J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6532-6535
- Witsenboer H., Vogel J., Michelmore R.W. 1997. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome*, 40: 923-936
- Wu R., Wu T., Ray A. 1987. Adaptors, linkers, and methylation. *Methods in Enzymology*, 152: 343-349
- Wünsch A., Hormaza J.I. 2002. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity*, 89: 56-63
- Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Kotobuki K., Ban Y., Hayashi T., Matsua N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 865-870
- Yin Y., Cheong H., Friedrich D., Zhao Y., Hu J., Mora-Garcia S., Chory J. 2002. A crucial role for the putative Arabidopsis topoisomerase VI in plant growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 10191-10196
- Yu J.-K., Mangor J., Thompson L., Edwards K.J., Slabaugh M.B., Knapp S.J. 2002. Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. *Genome*, 45: 652-660
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16
- Zimmer R., Verrinder Gibbins A.M. 1997. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 42: 217-226
- Zupanec J. 1991. Kemične instrumentalne metode v analitiki hmelja. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. *Kmetijstvo*, 57: 133-144
- Zuurbier K.W.M., Fung S.-Y., Scheffer J.J.C., Verpoorte R. 1998. *In-vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 49: 2315-2322

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem:

- Ministrstvu za šolstvo, znanost in šport za finančno podporo v okviru programa usposabljanja kadrov - mladi raziskovalci,
- mentorici prof. dr. Branki Javornik za vsestransko pomoč in usmerjanje v času študija,
- predsedniku in članu komisije, prof. dr. Petru Dovču in prof. dr. Antonu Ivančiču, za pregled dela,
- dr. Aleš Snoju za darovani plazmid pBSII,
- sodelavkama Branki Juvančič in Dunji Bandelj za tehnično pomoč,
- Katarini, ki mi je stala ob strani in lektorirala delo ter
- staršem in vsem prijateljem.

PRILOGE

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ
BIOTEHNOLOGIJE

Jernej JAKŠE

**IZOLACIJA MIKROSATELITNIH LOKUSOV NA
KROMOSOMSKI DNK HMELJA (*Humulus lupulus* L.)
Z OBOGATITVENIM POSTOPKOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2003