

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**RAZISKAVE ČASOVNE IN PROSTORSKE  
PORAZDELITVE OBRAMBNIH PROCESOV  
KROMPIRJA PO OKUŽBI S KROMPIRJEVIM VIRUSOM  
Y PRI GENOTIPIH RYWAL IN RYWAL NahG**

DIPLOMSKO DELO

Maja GNEZDA

Mentor: Doc. dr. Maruša Pompe Novak  
Nova Gorica, 2013

## **IZJAVA**

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Maja Gnezda

## **ZAHVALA**

Rada bi se zahvalila mentorici doc.dr. Maruši Pompe Novak za vse nasvete, znanje in pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Zahvala gre tudi mag. Neži Turnšek za ves trud in pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Zahvaljujem se tudi osebju Nacionalnega inštituta za biologijo, kjer je potekalo moje raziskovalno delo.

Zahvalila bi se tudi družini, ki me je ves čas študija podpirala, posebej se zahvaljujem mami Ireni, ki mi je vedno stala ob strani in me spodbujala.

## POVZETEK

Krompirjev virus Y (PVY) uvrščamo v rod *Potyvirus* iz družine Potyviridae. PVY je ekonomsko najbolj pomemben virus krompirja ter je priznan kot peti najpomembnejši rastlinski virus v smislu znanstvene in ekonomske pomembnosti. Glede na genetske značilnosti delimo PVY na pet skupin: PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>E</sup> in PVY<sup>Z</sup>. Različka PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> imata nukleotidno zaporedje podobno PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>O</sup> ter sta nastala z rekombinacijami med omenjenima različkoma. PVY<sup>NTN</sup> je nekrotični različek, ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev. Ta bolezen je povzročila skrčenje pridelave krompirja v Sloveniji po letu 1988, ko se je v Sloveniji pojavila prvič v večjem obsegu. Sorte krompirja so različno občutljive na PVY, odgovori gostiteljskih rastlin na različne različke PVY zelo različni, posledica česar je spekter različnih izidov bolezni.

Raziskovali smo sorte Igor, Desiree in Rywal ter genotipe Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY<sup>W</sup> in PVY<sup>NTN</sup>. Sorti Igor in Desiree ter genotipa Desiree NahG in Rywal NahG so za okužbo s PVY<sup>W</sup> in PVY<sup>NTN</sup> dovzetni, medtem ko je sorta Rywal na okužbo s PVY<sup>W</sup> in PVY<sup>NTN</sup> odporna. Samo pri sorti Igor smo po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> na inokuliranih listih poleg točkastih nekroz opazili tudi obročkaste kloroze. Sorta Igor je bila tudi edina izmed preiskanih sort oziroma genotipov, ki se je na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> odzvala drugače, saj sorta Igor pri okužbi s PVY<sup>W</sup> ni kazala nobenih bolezenskih znamenj. Sorta Desiree ni kazala bolezenskih znamenj po okužbi z izbranimi različkoma virusa, medtem ko so bila pri genotipu Desiree NahG bolezenska znamenja zelo izrazita. Pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG smo opazili pojav točkastih nekroze sočasno.

Med vsemi preiskanimi sortami in genotipi smo opazili razlike v velikosti, obliki in številu točkastih nekroz. Pri sorti Igor so bile točkaste nekroze okrogle oblike, pri genotipu Desiree NahG vretenaste ter pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG zvezdaste oblike. Največje točkaste nekroze so bile pri genotipu Desiree NahG. Po velikosti so sledile točkaste nekroze pri sorti Igor, še manjše pa so bile pri genotipu Rywal NahG in najmanjše pri sorti Rywal.

Pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG okuženih s PVY<sup>W</sup> smo opazovali tudi izražanje genov krompirja in količino virusne RNA. Koncentracija virusa PVY<sup>W</sup> je bila največja v vzorcih, ki so vsebovali točkasto nekrozo. Najvišja koncentracija virusa v točkasti nekrozi je bila opazna tako pri sorti Rywal, ki je odporna sorta in prepreči širjenje virusa po rastlini, kot pri genotipu Rywal NahG, ki je dovzeten in pri katerem se virus sistemsko razširi po rastlini. Tudi izražanje gena za glukanazo II je bilo največje v vzorcih, ki so vsebovali točkasto nekrozo. Vzorec izražanja gena za glukanazo II je bil enak pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG, medtem ko je bila intenziteta izražanja gena za glukanazo II pri sorti Rywal mnogo izrazitejša kot pri genotipu Rywal NahG. Izražanje gena za Pr1b pa je imelo pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG podobno intenziteto, vendar drugačen vzorec izražanja. Pri sorti Rywal je bilo izražanje največje v vzorcih, ki so vsebovali točkasto nekrozo, ter se je manjšalo z oddaljenostjo od točkaste nekroze. Pri genotipu Rywal NahG pa je bilo izražanje gena za Pr1b največje v vzorcih poleg točkaste nekroze.

**Ključne besede:** PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>W</sup>, sorte Igor, Desiree, Rywal, genotipi Desiree NahG, Rywal NahG

## SUMMARY

The potato virus Y (PVY) is classified in the genus *Potyvirus* of the family Potyviridae. The PVY is the most economically important potato virus and is recognized as the fifth most important plant virus in the terms of scientific and economic importance. According to the genetic characteristics, the PVY is divided into five groups: PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>E</sup> and PVY<sup>Z</sup>. The PVY<sup>NTN</sup> and the PVY<sup>W</sup> have a similar nucleotide sequence as the PVY<sup>N</sup> and the PVY<sup>O</sup> and have formed by recombination between the PVY<sup>N</sup> and the PVY<sup>O</sup>. The PVY<sup>NTN</sup> is an isolate, which causes potato tuber ring necrosis disease, which caused decrease of potato production in Slovenia after 1988, when it appeared in Slovenia on a larger scale for the first time. Potato varieties have different sensitivity to the PVY, host plants respond to different variants of the PVY very differently, resulting in a range of different disease outcomes.

We studied cultivars Igor, Desiree, Rywal and genotypes Desiree NahG, Rywal NahG after infection with PVY<sup>W</sup> and PVY<sup>NTN</sup>. Cultivars Igor, Desiree and genotypes Desiree NahG and Rywal NahG are susceptible for the infection with PVY<sup>W</sup> and PVY<sup>NTN</sup>, while the cultivar Rywal is resistant to infection with PVY<sup>W</sup> and PVY<sup>NTN</sup>. For cultivar Igor chlorosis and necrosis appeared 5 or 6 days after the inoculation with PVY<sup>NTN</sup>. Variety Igor was the only one of the investigated cultivars and genotypes, which responded differently to the infection with PVY<sup>NTN</sup> and PVY<sup>W</sup>, as cultivar Igor did not show any signs of infection when infected by PVY<sup>W</sup>.

The Desiree cultivar showed no symptoms, while the Desiree NahG genotype symptoms were very pronounced. In the cultivar Rywal and genotype Rywal NahG we noticed the necrosis simultaneously. Among all investigated cultivars and genotypes, we observed differences in the size, shape and number of necrosis. For cultivar Igor the necrosis were round, for genotype NahG spindle and for cultivar Rywal and genotype Rywal NahG star shaped. The maximum size of necrosis was observed in the Desiree NahG genotype, followed by necrosis in cultivar Igor, Rywal NahG and the smallest necrosis were in cultivar Rywal.

For cultivar Rywal and genotype Rywal NahG infected with the PVY<sup>W</sup>, we also looked at gene expression in potato and quantity of virus in potato. The concentration of the PVY<sup>W</sup> was the highest in the samples, which contained necrosis. The highest concentration of necrosis was seen in both, the Rywal cultivar, which is a resistant variety that prevents the spread of the virus in the plant, as in the Rywal NahG genotype, which is susceptible so the virus can spread among the plant systematically. The expression of the gene for glucanase II was the highest in samples, which contained necrosis. The pattern of expression of glucanase II was the same in the Rywal cultivar and the Rywal NahG genotype, while the intensity of expression of glucanase II was pronounced in the Rywal cultivar. The gene expression of the gene Pr1b in the Rywal cultivar and the Rywal NahG genotype was similar in intensity, but had a different pattern of expression. For the Rywal cultivar, expression was the more prominent in the sample, which contained necrosis, and less prominent in subsequent samples. In the Rywal NahG genotype, the expression of PR1b was highest in the samples next to the necrosis.

**Key words:** PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>W</sup>, cultivars Igor, Desiree, Rywal, genotypes Desiree NahG and Rywal NahG

## KAZALO VSEBNE

|  |           |
|--|-----------|
| IZJAVA.....  | II        |
| ZAHVALA .....  | III       |
| POVZETEK.....  | IV        |
| SUMMARY.....   | V         |
| KAZALO VSEBNE.....   | VI        |
| SEZNAM SLIK .....  | VIII      |
| SEZNAM TABEL .....   | IX        |
| SEZNAM PRILOG.....   | IX        |
| <b>1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Namen dela.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2. TEORETIČNE OSNOVE .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1. Splošno o krompirju.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.2. Odgovor rastline na okužbo .....</b>                                 | <b>3</b>  |
| 2.2.1. Obrambni odgovor rastline.....  | 4         |
| 2.2.2. Odgovor rastline na okužbo z virusom.....                             | 6         |
| 2.2.2.1. Delovanje virusa.....   | 6         |
| 2.2.3. Odgovor rastline na okužbo z virusom PVY.....                         | 7         |
| 2.2.3.1. Krompirjev virus Y .....  | 7         |
| 2.2.3.2. Interakcija krompirja in virusa PVY .....                           | 8         |
| <b>2.3. PCR v realnem času .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>3. PRAKTIČNI DEL.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>3.1. Priprava rastlinskega materiala .....</b>                            | <b>13</b> |
| 3.1.1. Rastlinski material.....  | 13        |
| 3.1.2. Mehanska inokulacija.....   | 13        |
| 3.1.3. Serije .....  | 14        |
| 3.1.5. Pobiranje rastlinskega materiala.....                                 | 15        |
| <b>3.2. Priprava RNA.....</b>  | <b>17</b> |
| 3.2.1. Izolacija RNA in cDNA .....   | 17        |
| 3.2.2. Določanje koncentracije in kvalitete RNA z aparaturo BioAnalyzer..... | 17        |
| <b>3.3. PCR v realnem času .....</b>   | <b>18</b> |
| 3.3.1. Kvantitativni PCR v realnem času .....                                | 18        |

|  |    |
|--|----|
| <b>4. REZULTATI</b> .....  | 20 |
| <b>4.1. Bolezenska znamenja pri sorti Igor</b> .....                     | 20 |
| <b>4.2. Bolezenska znamenja pri sorti Desiree</b> .....                  | 22 |
| <b>4.3. Bolezenska znamenja pri genotipu Desiree NahG</b> .....          | 23 |
| <b>4.4. Bolezenska znamenja pri sorti Rywal</b> .....                    | 24 |
| <b>4.5. Bolezenska znamenja pri genotipu Rywal NahG</b> .....            | 25 |
| <b>4.6. Točkaste nekroze</b> .....                                       | 26 |
| 4.6.1. Velikost in oblika točkastih nekroz .....                         | 26 |
| 4.6.2. Število obročkastih kloroz in točkastih nekroz .....              | 29 |
| <b>4.7. Izražanje genov</b> .....  | 31 |
| <b>5. RAZPRAVA</b> .....   | 33 |
| <b>5.1. Vpliv letnega časa na izražanje bolezenskih znamenj</b> .....    | 33 |
| <b>5.2. Vpliv okuževanja na izražanje bolezenskih znamenj</b> .....      | 33 |
| <b>5.3. Vpliv sorte na hitrost pojavljanja bolezenskih znamenj</b> ..... | 33 |
| <b>5.4. Vpliv sorte na velikost in obliko točkastih nekroz</b> .....     | 34 |
| <b>5.5. Vpliv okužbe na izražanje genov</b> .....                        | 34 |
| <b>6. ZAKLJUČKI</b> .....  | 36 |
| <b>7. VIRI</b> .....   | 37 |

## SEZNAM SLIK

|  |    |
|--|----|
| <b>Slika 1:</b> Vzorčevanje točkastih nekroz na rastlini št. 2, inokuliranem listu št. 3 sorte Rywal okužene s PVY <sup>W</sup> (6. biološka ponovitev) .....  | 16 |
| <b>Slika 2:</b> Vzorčevanje na ploščico .....  | 16 |
| <b>Slika 3:</b> S PVY <sup>NTN</sup> okužena rastlina sorte Igor 27 dpi z značilno obliko palmovega drevesa .....  | 20 |
| <b>Slika 4:</b> Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY <sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY <sup>NTN</sup> (desno) sorte Igor 9 dpi .....  | 21 |
| <b>Slika 5:</b> Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih sorte Igor (6. biološka ponovitev) .....   | 21 |
| <b>Slika 6:</b> Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY <sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY <sup>NTN</sup> (desno) sorte Desiree 9 dpi .....   | 22 |
| <b>Slika 7:</b> Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih sorte Desiree (5. biološka ponovitev) .....  | 22 |
| <b>Slika 8:</b> Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY <sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY <sup>NTN</sup> (desno) genotipa Desiree NahG 9 dpi .....   | 23 |
| <b>Slika 9:</b> Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih genotipa Desiree NahG (6. biološka ponovitev) .....  | 24 |
| <b>Slika 10:</b> Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY <sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY <sup>NTN</sup> (desno) sorte Rywal 9 dpi .....  | 24 |
| <b>Slika 11:</b> Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih sorte Rywal (6. biološka ponovitev) .....   | 25 |
| <b>Slika 12:</b> Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY <sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY <sup>NTN</sup> (desno) genotipa Rywal NahG 9 dpi .....  | 26 |
| <b>Slika 13:</b> Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih genotipa Rywal NahG (6. biološka ponovitev) .....   | 26 |
| <b>Slika 14:</b> Točkaste nekroze na inokuliranem listu genotipa Desiree NahG (levo), sorte Rywal (na sredini) in genotipa Rywal NahG (desno) po okužbi s PVY <sup>W</sup> .....   | 27 |
| <b>Slika 15:</b> Obročaste kloroze na inokuliranem listu sorte Igor (levo zgoraj). Točkaste nekroze na inokuliranem listu sorte Igor (na sredini zgoraj), genotipa Desiree NahG, sorte Rywal in genotipa Rywal NahG po okužbi s PVY <sup>NTN</sup> ..... | 27 |
| <b>Slika 16:</b> Premer točkaste nekroze na inokuliranem listu sorte Rywal in genotipov Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY <sup>W</sup> . Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka. ....  | 28 |
| <b>Slika 17:</b> Premer točkaste nekroze na inokuliranem listu sort Igor in Rywal ter genotipov Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY <sup>NTN</sup> . Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka. ....                                  | 28 |
| <b>Slika 18:</b> Število obročastih kloroz na 1., 2., 3. inokuliranem listu, 1., 2., 3. neinokuliranem listu, na vršičku pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY <sup>NTN</sup> .....                 | 30 |
| <b>Slika 19:</b> Število točkastih nekroz na 1., 2., 3. inokuliranem listu, 1., 2., 3. neinokuliranem listu, na vršičku pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY <sup>NTN</sup> .....                  | 30 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Slika 20:</b> Število točkastih nekroz na 1., 2., 3. inokuliranem listu, 1., 2., 3. neinokuliranem listu, na vršičku pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY <sup>W</sup> .....   | 31 |
| <b>Slika 21:</b> Količina PVY <sup>W</sup> (W in zaporedna številka vzorca) pri sorti Rywal (R) in genotipu Rywal NahG (RnahG) v točkasti nekrozi (E) in treh zaporednih koščkih poleg nje (F, G in H) ter zdravih kontrolah (Kontrola).....                                  | 31 |
| <b>Slika 22:</b> Izražanje gena za glukanozo II (W in zaporedna številka vzorca) pri sorti Rywal (R) in genotipu Rywal NahG (RnahG) okuženih s PVY <sup>W</sup> v točkasti nekrozi (E) in treh zaporednih koščkih poleg nje (F, G in H) in zdravih kontrolah (Kontrola) ..... | 32 |
| <b>Slika 23:</b> Izražanje gena za PR1b (W in zaporedna številka vzorca) pri sorti Rywal (R) in genotipu Rywal NahG (RnahG) okuženih s PVY <sup>W</sup> v točkasti nekrozi (E) in treh zaporednih koščkih poleg nje (F, G in H) in zdravih kontrolah (Kontrola) .....         | 32 |

## SEZNAM TABEL

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Število rastlin v 1. biološki ponovitvi..... | 14 |
| <b>Tabela 2:</b> Število rastlin v 5. biološki ponovitvi..... | 14 |
| <b>Tabela 3:</b> Število rastlin v 6. biološki ponovitvi..... | 14 |

## SEZNAM PRILOG

|   |    |
|---|----|
| <b>Priloga A:</b> Statistično značilna razlika ( * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001) v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami okuženimi s PVY <sup>NTN</sup> in slepo inokuliranimi rastlinami pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG.....          | 42 |
| <b>Priloga B:</b> Statistično značilna razlika ( * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001) v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami okuženimi s PVY <sup>W</sup> in slepo inokuliranimi rastlinami pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG.....            | 44 |
| <b>Priloga C:</b> Statistično značilna razlika ( * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001) v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami okuženimi s PVY <sup>NTN</sup> in s PVY <sup>W</sup> okuženimi rastlinami pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG..... | 46 |

## 1. UVOD

Rastline se v naravi srečujejo z vrsto biotskih in abiotskih dejavnikov, ki vplivajo na njihovo rast in razvoj. Posledica neugodnih razmer v okolju je bodisi vidna kot zmanjšana količina pridelka ali kot povečana uporaba fitofarmaceutskih sredstev, kar ima lahko negativen vpliv na okolje. Pri vzgajanju odpornih sort, ki prispevajo k večjemu pridelku in manjši uporabi fitofarmaceutskih sredstev, je zelo pomembno poznavanje obrambnih mehanizmov rastlin.

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je izpostavljen različnim biotskim dejavnikom, kot so plesni (npr. *Phytophthora*), bakterije (npr. *Ralstonia*), virusi (npr. krompirjev virus Y), ogorčice (npr. *Globodera*) in drugi.

Krompir gojijo v skoraj 150 državah in se uvršča med prve štiri najpomembnejše poljščine v svetovnem merilu. Krompirjev virus Y (Potato virus Y, PVY) trenutno velja za gospodarsko najbolj škodljiv virus pri gojenem krompirju, saj na občutljivih sortah povzroča zelo velik izpad pridelka.

Raziskave interakcije krompirja s PVY<sup>NTN</sup> imajo tudi velik socialno ekonomski pomen za Slovenijo. V 80. letih prejšnjega stoletja se je PVY<sup>NTN</sup> epidemično razširil po vsej Sloveniji in popolnoma izrinil zelo občutljive sorte, med njimi tudi sorto Igor, ki je bila do tedaj vodilna slovenska sorta in je predstavljala 70% pridelave krompirja v Sloveniji. Z epidemijo obročkastih nekroz na gomoljih se je prekinila tudi dolgoletna praksa gojenja semenskega krompirja v Sloveniji. Trenutno obstaja le nekaj popolnoma odpornih sort, gojenje teh pa je problematično tako zaradi specifičnih okoljskih pogojev v Sloveniji kot tudi z vidika genetske raznovrstnosti. Zato bo poznavanje poteka bolezni in odgovora rastlin na okužbo s PVY pripomoglo tudi k učinkovitejši vzgoji novih odpornih sort.

Dosedanje raziskave so pokazale, da so sorte krompirja različno občutljive na PVY in da so odgovori gostiteljskih rastlin na različne različke PVY zelo različni, posledica česar je spekter različnih izidov bolezni. Obstajajo trije splošno opisani različki PVY: običajen ali navaden različek (PVY<sup>O</sup>), različek pikčaste progavosti (PVY<sup>C</sup>) in različek žilnih nekroz (PVY<sup>N</sup>). Z rekombinacijami med PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>O</sup> je nastalo veliko novih izolatov, med katerimi sta ekonomsko najpomembnejša PVY<sup>W</sup>, za katerega se smatra, da je bolj infektiven kot PVY<sup>O</sup>, in PVY<sup>NTN</sup>, ki povzroča pojav obročkastih nekroz na gomoljih občutljivih sort krompirja, kar bistveno vpliva na kvaliteto in količino pridelka. Za vzgojo odpornih sort krompirja je zelo pomembno znanje interakcije krompirja s PVY<sup>NTN</sup> na morfološkem in biokemijskem nivoju, ter na nivoju izražanja genov, ki privedejo do sprememb.

Ena izmed metod, ki se uporablja za ugotavljanje izražanja genov je tudi metoda verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Ta metoda je zelo natančna pri merjenju izražanja genov, kar omogoča natančnejši vpogled v interakcijo rastlina – virus.

## **1.1. Namen dela**

Namen diplomske naloge je spremljati izražanje bolezenskih znamenj pri različno občutljivih sortah krompirja (sorte Igor, Desiree in Rywal ter genotipa Desiree NahG in Rywal NahG) v času. Poleg tega smo pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG preučili prostorsko izražanje dveh genov, za katere je bilo ugotovljeno, da imajo pomembno vlogo v obrambnih procesih krompirja po okužbi s krompirjevim virusom Y.

## 2. TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1. Splošno o krompirju

Krompir (*Solanum tuberosum*) spada v družino razhudnikovk (*Solanaceae*). Nadzemni del rastline zraste do 1 meter visoko, cvetovi so beli do vijoličasti, užitni pa so gomolji (Arends in Kus, 1999).

Krompir izhaja iz Južne Amerike, v Evropo so ga prinesli španci v 16. stoletju, k nam pa je prišel v času Avstro - Ogrske, natančneje v času vladanja Marije Terezije. Danes se krompir uvršča med prve štiri najpomembnejše poljščine v svetovnem merilu (poleg riža, koruze in žita).

Poznamo 235 vrst krompirja rodu *Solanum*. Ena izmed kultiviranih vrst je *Solanum tuberosum*. Sort krompirja pa je na svetu že več tisoč. V zadnjih petdesetih letih je proizvodnja krompirja začela upadati, predvsem zaradi različnih patogenih organizmov, ki napadajo krompir. Patogeni organizmi, ki zmanjšujejo pridelek, so predvsem žuželke, gliste, glive, bakterije in virusi, ki so povzročitelji resnih bolezni. Strategije, ki se jih pridelovalci poslužujejo za kontrolo patogenih organizmov na krompirju so predvsem kemično tretiranje in žlahtnjitev odpornih sort krompirja. Pridelovalci vsako leto opustijo nekaj sort, nekaj pa jih s pomočjo žlahtnjenja na novo nastane (Arends in Kus, 1999). V zadnjem času se vedno bolj razvija rastlinska biotehnologija in gensko inženirstvo, ki sta usmerjena v proizvodnjo tehnološko in prehrabno pomembnih rastlin, ki so odporne proti patogenim organizmom, herbicidom ter so tolerantne na strese okolja.

### 2.2. Odgovor rastline na okužbo

Rastline so v naravnem okolju izpostavljene številnim povzročiteljem bolezni. Zato so razvile številne obrambne mehanizme, s tem pa preprečujejo razvoj bolezni, saj lahko povzročitelje bolezni prepoznajo in se pred njimi branijo. Po drugi strani pa se tudi povzročitelji bolezni v procesu koevolucije prilagajajo in tako obidejo obrambni odgovor rastline (Mysore in Ryu, 2004).

Obramba pred povzročitelji bolezni v rastlinah je funkcionalno, prostorsko in časovno zelo zapletena. Funkcionalna kompleksnost se začne z zunanjimi signali, ki jih tvorijo povzročitelji bolezni, nadaljuje se z zaznavanjem signalov in njihovim prenosom, kar vodi v obsežno spreminjanje celičnega metabolizma, vključno s spremembami izražanja genov. Prostorska organizacija sprememb je zapletena. Metabolni procesi se lahko spremenijo na znotrajceličnem nivoju s porazdelitvijo v različne organele, spremembe lahko vplivajo na preživetje celic in tudi na tkivo, ki obdaja mesto okužbe. Visoka dinamičnost odgovora na napad povzročitelja bolezni predstavlja časovno kompleksnost procesov (Somssich in Hahlbrock, 1998). Regulacija procesov se dogaja na dveh nivojih: na nivoju regulacije delovanja obstoječih encimov in na nivoju transkripcijske regulacije (Buckhout in Thimm, 2003).

Od hitrosti in obsega odgovora rastline je odvisen izid interakcije rastline s povzročiteljem bolezni (Benhamou in sod., 1999). Reakcija je lahko kompatibilna ali

nekompatibilna. Pri nekompatibilni reakciji lahko pride do preobčutljivostne reakcije (hipersensitive response, HR) - razvijejo se točkaste nekroze, ki onemogočijo ali zavirajo širjenje povzročitelja bolezni ali do pojava ekstremne rezistence (extreme resistance, ER) (Hinricsh – Berger in sod., 1999). Pri kompatibilni interakciji je lahko rastlina tolerantna ali občutljiva. Pri občutljivih rastlinah lahko pride do razvoja bolezenskih znamenj, kar je posledica sposobnosti povzročitelja bolezni da obide gostiteljeve obrambne mehanizme. Čeprav v kompatibilni interakciji gostiteljeva obramba ni učinkovita, je odgovor na povzročitelja bolezni lahko prisoten in kompleksen (Maule in sod., 2000). Tu gre za prešibak ali prepozen odgovor, da bi preprečil razvoj bolezenskih znamenj (Talarczyk in Henning, 2001).

### 2.2.1. Obrambni odgovor rastline

Obrambni odgovor rastline sproži neposredna ali posredna interakcija med produktom *R* gena rastline in produktom *Avr* gena povzročitelja bolezni. Odgovor je lahko preobčutljivostna reakcija, ki lahko vodi v programirano celično smrt, oksidativni stres, povišan nivo kalcija, fosforizacijo proteinov ali sintezo s patogenostjo povezanih proteinov (Birch in Kamoun, 2000).

Rastline se lahko branijo pred napadalci s fizičnimi barierami (npr. celična stena, trni, lubje, voskasta površina listov,...), kar predstavlja prvo obrambno linijo. Ko pa povzročitelji bolezni obidejo to pasivno obrambo, je uspešnost okužbe odvisna od obrambnih mehanizmov, ki jih aktivirajo rastline po zaznavanju povzročitelja bolezni (Talarczyk in Hennig, 2001).

Na mestu vdora povzročitelja bolezni v rastlino opazimo odziv rastline. Sproži se kaskada sprememb, ki vključuje spremembe v toku ionov, nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (reactive oxygen species, ROS), spremembo organizacije citoskeleta, fosforizacijo in defosforizacijo transkripcijskih faktorjev, sintezo dušikovega oksida in v nekaterih primerih tudi indukcijo programirane celične smrti, ki jo opazimo kot HR. S temi spremembami poskuša rastlina upočasniti širjenje povzročitelja bolezni (Talarczyk in Hennig, 2001).

Spremembe v toku ionov, še posebno  $Ca^{2+}$  ionov, aktivirajo spremembe proteinskih kinaz. Za obrambni odgovor specifični sta z mitogenom aktivirani protein-kinazi WIPK (wounding induced protein kinase) in SIPK (salicylic acid induced protein kinase), ki inducirata izražanje obrambnih genov, vključno z nekaterimi transkripcijskimi faktorji. Izražanje obrambnih genov inducirajo tudi ROS, ki nastajajo med odzivom na patogena (Soosaar in sod., 2005). V obrambnem odgovoru rastline na napad povzročitelja bolezni ima oksidativni stres različne vloge. Pri tem nastane vodikov peroksid, ki deluje toksično na povzročitelje bolezni in sodeluje pri utrjevanju celične stene. Oksidativni stres ima lahko tudi signalno vlogo pri akumulaciji salicilne kisline in aktivaciji nekaterih encimov (Hammond – Kosack in Jones, 1996).

Salicilna kislina, jasmonska kislina in etilen so signalne molekule, ki po napadu povzročitelja bolezni vodijo v različne metabolne poti, katerih posledica je povečano izražanje genov, povezanih s patogenezo (Rushton in Somssich, 1998). Količina signalnih molekul se spreminja glede na vrsto povzročitelja bolezni, torej sam povzročitelj vpliva na to, kakšen obrambni odziv se bo sprožil v rastlini (Reymond in Farmer, 1998). Etilen in jasmonska kislina delujeta v isti signalni poti, medtem ko

salicilna kislina vpliva antagonistično na signalno pot, v kateri sodelujeta jasmonska kislina in etilen (Feys in Parker, 2000).

Zgodnjemu odzivu sledijo metabolne spremembe, ki vodijo v sintezo sekundarnih metabolitov, predvsem produktov fenilpropanoidne poti. Ti produkti lahko delujejo antimikrobno (fitoaleksini), kot ojačevalci celične stene (lignin), lahko pa sodelujejo pri obrambnih odgovorih kot signalne molekule (salicilna kislina). Aktivirajo se geni za sintezo s patogenezo povezanih proteinov (PR-proteini) in tudi številnih drugih proteinov, celične stene se okrepijo, sintetizirajo se tudi druge molekule signalne transdukcije kot sta jasmonska kislina in etilen ter se aktivirajo tudi njihove signalne poti. Vzorec obrambnega odgovora je nedvomno odvisen od gostiteljske rastline in povzročitelja bolezni, ki jo je napadel ter od povezav med signalnimi potmi (Talarczyk in Hennig, 2001).

PR-proteini so rastlinski proteini, katerih sinteza se sproži po okužbi s povzročiteljem bolezni ali v drugih stresnih situacijah. Akumulirajo se v zunajceličnem prostoru ali v vakuoli tako lokalno, v okuženem tkivu, kot sistemsko, v neokuženem tkivu. Različni PR-proteini prispevajo k odpornosti na različne povzročitelje bolezni in njihova sinteza ter količina je odvisna tudi od vrste rastline. Njihova funkcija je zaviranje rasti, širjenja in razmnoževanja povzročitelja bolezni, imeli pa naj bi tudi vlogo pri rasti in razvoju rastlin. PR-proteine razvrščajo v 14 skupin (od PR-1 do PR-14). Vloga proteinov iz družine PR-1 ni natančno poznana, se jih pa večina specifično odziva na napad povzročiteljev bolezni. Primarna vloga 1,3 –  $\beta$  – glukanaza (PR-2) je aktivna obramba proti glivam. Virusi pa jih lahko izkoristijo za olajšano širjenje po rastlini, saj lahko povečajo odprtine plazmodezm (Beffa in Meins, 1996). Genska družina 1,3 –  $\beta$ – glukanaza je razdeljena v štiri širše kategorije. Razred I 1,3 –  $\beta$  – glukanaznih genov kodirajo osnovne beljakovine. Kopičijo se pretežno v vakuolah (Keefe in sod., 1990), ki se nahajajo v povrhnjici spodnjih, starejših listov in koreninah, kot odgovor na napad povzročiteljev bolezni (Linthorst in sod., 1990). 1,3 –  $\beta$  – glukanazni geni razreda II, kodirajo kisle proteine, ki se izločajo v zunajcelični prostor. Ti proteini niso prisotni v zdravih listih, kopičijo se le kot odgovor na okužbo (Ward in sod., 1991). 1,3 –  $\beta$  – glukanaze razreda III so kisle, a se od razreda I ločijo po značilnem, posebnem aminokislinskem zaporedju (Payne in sod., 1990). Kopičijo se v apoplastu celic okuženih s povzročitelji bolezni. Ostaneta še dve kislji 1,3 –  $\beta$  – glukanazi razreda IV, sp41a in sp41b. Čeprav so proteini razreda II v 80% enaki proteinom razreda IV 1,3– $\beta$ –glukanaz, sta bili postavljeni v drug razred (IV), saj je ekspresija teh genov neodvisna od patogeneze (van Eldik in sod., 1996). Endohitinaze (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) igrajo pomembno vlogo pri obrambi proti glivam. Proti glivam deluje tudi skupina proteinov PR -7 (endoproteinaze). PR-5 so taumatini podobni proteini, ki povečajo propustnost membran pri glivah. Proteinazni inhibitorji (PR-6) ščitijo rastline pred insekti ter drugimi herbivori. Prav tako imajo vlogo pri regulaciji delovanja endogenih proteinaz, kar je pomembno pri kalitvi, metabolizmu proteinov, programirani celični smrti, HR in staranju. PR 6 zavirajo aktivnost prebavnih encimov glist in zunajceličnih encimov, ki jih izločajo glive (Mosolov in Vauleva, 2005). Peroksidaze (razgradnja peroksida) (PR-9) so vključene v lignifikacijo celične stene. ROS lahko delujejo toksično, zato jih je potrebno odstranjevati, navadno z peroksidazami. Ribonukleazam sorodni proteini (PR-10) naj bi imeli vlogo pri obrambi pred virusi. Defenzini in tionini (PR-12, PR-13, PR-14 ) delujejo na plazmalemo bakterij in gliv (van Loon in van Stiren, 1999).

Aktiven odgovor rastline lahko ima nanjo tudi negativen vpliv. Zaradi močnega premika metabolizma iz primarnih v sekundarne metabolne poti se ustavijo nekateri procesi (Talarczyk in Hennig, 2001). Opaženo je bilo na primer znižanje vsebnosti fotosinteznih encimov in upočasnjeno razmnoževanje celic (Sommsich in Hahlbrock, 1998).

Preobčutljivostna reakcija največkrat vodi v celično smrt, ki je omejena na mesto vdora patogena in jo spremlja proces avtofagije (Liu in sod., 2005).

Obrambni odgovor v rastlini lahko sproži tudi spremembo v sestavi topnih sladkorjev v rastlini. V zdravih rastlinah se saharoza, ki nastane kot produkt fotosinteze, preko celične stene transportira v floem, po katerem potuje v druge dele rastline. Pod vplivom virusne okužbe pa se saharoza v celični steni s pomočjo invertaze pretvori v heksozo, ki se kopiči v celicah mezofila, kar vpliva na znižanje nivoja fotosinteze in sprožitev obrambnega odgovora v rastlini (Herbers in sod., 2000).

Pomembno vlogo pri odgovoru na različne stresne dejavnike imajo proteini vročinskega šoka (Hsp). Gre za šaperone, šaperonine in košaperone, ki sodelujejo pri zvijanju novonastalih proteinov v celici. Imajo tudi pomen pri zaščiti rastlinske celice pred stresom, saj zagotavljajo normalno konformacijo proteinov in tako celično homeostazo. Poznamo pet družin proteinov vročinskega šoka: družina Hsp70, družina šaperoninov (GroEL in Hsp60), družina Hsp90, družina Hsp100 (Clp) in družina majhnih proteinov vročinskega šoka (sHsp). Hsp se nahajajo v citoplazmi, jedru, mitohondrijih, kloroplastih in endoplazemskem retikulumu. Košaperoni z vezavo na šaperone regulirajo njihovo aktivnost ter pomagajo pri njihovem delovanju. Najbolj znan je košaperon Hsp40 (podoben bakterijskim košaperonom DnaJ), ki sodeluje s šaperoni Hsp70 in Hsp90. Različne skupine Hsp medsebojno sodelujejo in se dopolnjujejo v delovanju (Wang in sod., 2004).

## 2.2.2. Odgovor rastline na okužbo z virusom

Biokemijske in fiziološke spremembe, ki so posledica okužbe, so pogojene z vrsto povzročitelja, saj različni povzročitelji različno vplivajo na signalne poti (Hammond – Kosack in Jones, 1996). Rastlinski virusi so obligatorni paraziti, ki sami kodirajo le nekaj proteinov. Njihov vpliv na metabolizem rastlin pa je na dveh, med sabo težko ločljivih nivojih. Na eni strani izkoristijo rastlinske proteine, membrane in nukleinske kisline za svoje razmnoževanje in premikanje po rastlini, po drugi strani, pa rastline na prisotnost virusa odgovorijo z obrambnim odgovorom, ki tudi vključuje razne proteine (Maule in sod., 2002).

### 2.2.2.1. Delovanje virusa

Po vstopu virusa v celico se najprej loči virusna nukleinska kislina od proteinskega plašča, ki jo obdaja. Nato virusna nukleinska kislina preusmeri celično presnovo v izgradnjo sestavin za nove viruse. Podvajanje virusov se razlikuje glede na tip nukleinske kisline, ki jo virus vsebuje. V primeru RNA virusa ta inducira sintezo virusne od RNA odvisne RNA-polimeraze (RdRp). Kadar virusni genom predstavlja pozitivno orientirana RNA (npr. genom PVY), se najprej sintetizira komplementarna negativno orientirana RNA, ki nato služi kot matrica za sintezo novih pozitivno orientiranih molekul RNA. Ko se sintetizira komplementarna negativno orientirana RNA, nekaj časa tvori dve-verižni kompleks s pozitivno RNA, nato pa se verigi ločita. Po sintezi pozitivno orientirane virusne RNA se začne translacija. V primeru RNA virusov oba procesa potekata v citoplazmi. Sinteza virusnih proteinov je odvisna od gostiteljskih aminokislin, ribosomov in prenašalne RNA (tRNA). Po sintezi virusne nukleinske kisline in proteinov, se slednji združijo in organizirajo okrog nukleinske kisline in tako tvorijo cele

virusne partikle, virione. Sestavljanje RNA virusov poteka v citoplazmi, kjer se virioni lahko tudi združujejo (Agrios, 1997).

Po vstopu v rastlinsko celico in po prvi replikaciji na mestu okužbe, se lahko virusi širijo iz celice v celico skozi plazmodezme, na dolge razdalje pa po žilah rastlin (Carrington in sod., 1996). Razmnoževanje virusa v rastlini je povezano s procesi, ki so normalno prisotni v celici, medtem ko mora virus za svoje premikanje po rastlini spremeniti obstoječe procese v rastlini. To povzroči metabolne spremembe v rastlini. Posledice širjenja in razmnoževanja virusa se lahko kažejo kot razvoj bolezenskih znamenj, ki vključujejo strukturne in fiziološke spremembe, te pa vodijo v zastoj rasti in razvoja celotne rastline. Posledično opazimo izgubo fotosintetske aktivnosti, povečano respiracijo, spremenjeno razporejanje ogljikovih hidratov in nalaganje škroba (Maule in sod., 2002).

### 2.2.3. Odgovor rastline na okužbo z virusom PVY

#### 2.2.3.1. Krompirjev virus Y

Krompirjev virus Y (PVY) uvrščamo v rod *Potyvirus* iz družine Potyviridae. Potivirusi so sestavljeni iz ene molekule RNA, ki jo obdaja 2000 molekul plaščnega proteina. Genom potivirusov sestavlja linearna, eno-verižna, pozitivno usmerjena RNA z dolžino okoli 10000 baz. RNA se prevede v en sam 340 – 370 kDa velik poliprotein, ki se med in po translaciji razreže na naslednje proteine: protein P1, proteinaza s pomožno komponento (HC-Pro), protein P3, 6 kDa velik protein 1, cilindrično vključitveno telo (C1b), 6 kDa velik protein 2, protein povezan z virusnim genomom (VPg), jedrni vključitveni protein a (N1a), jedrni vključitveni protein b (N1b) in plaščni protein (CP). Virusni proteini sodelujejo pri cepitvi vezi v poliproteinu (P1, Hc-Pro, N1a), razmnoževanju virusa (P3, N1a), premikanju virusa (C1b, N1a) in vezavi na rastlinsko RNA (N1b). Plaščni protein (CP) tvori plašč okoli virusne RNA. Pri okužbi se plaščni protein veže na rastlinsko celico, zato določa specifičnost gostiteljev. Vključen je tudi v premikanje virusa po rastlini preko uravnavanja plazmodezem ali kot gibalni protein v prenosu z listnimi ušmi in regulacijo pomnoževanja virusa. Hc-Pro zavira delovanje obrambnega sistema rastline, usmerjenega proti virusni RNA ali pomnoževanju virusa, ki sodeluje pri prenosu iz rastline v rastlino s pomočjo listnih uši (Urcuqui – Ichima in sod., 2001).

PVY je ekonomsko najbolj pomemben krompirjev virus ter je priznan kot peti najpomembnejši rastlinski virus v smislu znanstvene in ekonomske pomembnosti (Scholthof in sod., 2012). Glede na genetske značilnosti delimo PVY na pet skupin: PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>E</sup> in PVY<sup>Z</sup>. Glede na molekularne značilnosti je veliko različkov PVY. Različka PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> imata nukleotidno zaporedje podobno PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>O</sup>, ter serološke značilnosti enake kot PVY<sup>N</sup> (Singh in sod., 2008). PVY<sup>NTN</sup> je nekrotični različek, ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev. Ta bolezen je povzročila skrčenje pridelave krompirja v Sloveniji po letu 1988, ko se je v Sloveniji pojavila prvič v večjem obsegu. Virus se širi predvsem z listnimi ušmi (vsaj 28 vrst) (Kus, 1994). Med najuspešnejšimi prenašalci pa so *Myzus persicae* S. ter *Macrosiphum euphorbiae* T. (Cervantes in Alvarez, 2011). Različek PVY<sup>W</sup> je bolj virulenten kot PVY<sup>N</sup>, vendar povzroča manj izrazita bolezenska znamenja kot različek PVY<sup>NTN</sup>, čeprav lahko občasno povzroča obročkasto nekrozo gomoljev (Piche in sod., 2004).



Primarna okužba na rastlinah okuženih s PVY se kaže v obliki kloroz in manjših nekroz. Na novih listih, ki se razvijejo nad okuženimi (sistemska okužba) opazimo izrazito rumen mozaik in gubanje listne površine. Rastline rumenijo, listi se posušijo in odpadejo, steblo raste počasneje, rastlina daje videz palmovega drevesa, ter rastline predčasno odmirajo. Rastline, ki zrastejo iz okuženih gomoljev (sekundarna okužba) kažejo znake v milejši obliki (Kus, 1994).

Sorta Igor je na PVY<sup>NTN</sup> zelo občutljiva. Bolezenska znamenja se razvijejo tako na nadzemnem delu rastline, kot na gomoljih. Nekoliko manj je občutljiva sorta Desiree, ki ima bolezenska znamenja na nadzemnem delu rastline in na manjšem številu gomoljev. Sorta Pentland Squire je za virus sicer dovzetna, saj se virus po rastlini lahko širi, vendar za virus tolerantna, saj je posledica okužbe le zmanjšana rast rastlin (Kus, 1994).

Sorta Sante je ekstremno odporna (ER), saj ima s klasičnim križanjem vnesen dominanten gen za odpornost  $Ry_{sto}$ , ki je bi izoliran iz divje vrste krompirja *Solanum stoloniferum* S.. Rastline, ki nosijo ta gen, ne razvijejo bolezenskih znamenj (Mehle in sod., 2004). Tudi sorta Rywal je odporna, vendar razvije preobčutljivostno reakcijo (HR).

Genotipa Desiree NahG in Rywal NahG sta gensko spremenjena in izražata gen NahG, ki kodira encim salicilat hidrosilazo, in ne moreta akumulirati salicilne kisline, saj jo salicilat hidrosilaza pretvarja v katehol (Davis, 2004). Zaradi te genske spremembe je genotip Rywal NahG dovzeten za okužbo s PVY.

#### 2.2.3.2. Interakcija krompirja in virusa PVY

Za preučevanje genov, ki so vpleteni v zgodnji odgovor rastline na okužbo, so dve občutljivi sorti krompirja Igor in Nadine okužili z dvema različkoma virusa PVY in sicer s PVY<sup>NTN</sup>, in PVY<sup>N</sup>. Rezultati kažejo, da imajo geni, povezani s fotosintezo, z metabolizmom sladkorjev in ROS, ter geni, vpleteni v omejevanje širjenja virusa, vlogo pri zgodnjem odgovoru rastlin krompirja na virusna različka. V rastlinah, okuženih s PVY<sup>NTN</sup>, so zaznali nižje izražanje genov, povezanih s fotosintezo, kot v rastlinah, okuženih s PVY<sup>N</sup>, in sicer 12 ur po inokulaciji in 48 ur po inokulaciji. Takoj po okužbi so bili geni, povezani s fotosintezo, močneje izraženi v rastlinah, okuženih s PVY<sup>NTN</sup> kot s PVY<sup>N</sup>. Spremenjen vzorec izražanja so opazili tudi pri genih, povezanih s sintezo tetrapirolov, kamor spadajo geni, ki imajo ključno vlogo v sintezi klorofila. Podoben odgovor na virusna različka so opazili v obeh sortah (Kogovšek, 2010).

Baebler in sodelavci so preučevali zgodnji odziv rastlin krompirja različnih sort na okužbo s PVY<sup>NTN</sup>. Pri primerjavi zgodnjega odziva na okužbo občutljive sorte Igor in odporne sorte Sante so se kot pomembni pokazali geni, povezani s fotosintezo, zaznavanjem, signalizacijo in obrambnim odgovorom. Pri obeh sortah se je 30 min po inokulaciji izražanje s fotosintezo povezanih genov povečalo, medtem ko se je kasneje (12 ur po inokulaciji) njihovo izražanje zmanjšalo. Pri sorti Sante se je 30 min po inokulaciji povečalo tudi izražanje genov, povezanih z metabolizmom kisikovih spojin. Pri sorti Igor se je celotna skupina genov, povezanih z zaznavanjem in signalizacijo, bolj izrazila 12 ur po okužbi, medtem ko pri sorti Sante v tej časovni točki ni bilo opaziti tako burnega odgovora. 30 min po inokulaciji so bili v sorti Sante geni, povezani z odpornostjo, manj izraženi. Največje razlike med sortama so se pokazale v izražanju genov, povezanih z obrambnim odgovorom, kot so metabolizem brasinosteroidov,

poliaminov, sekundarnih metabolitov, s patogenezo povezanih proteinov in njihovih inhibitorjev, dioksigenaza, odvisna od 2-oksoglutarata, fenilalanin amonija in Hsp (Baebler in sod., 2009).

Raziskave izražanja genov (187 genov, natisnjenih na mikromrežo) v poznem odgovoru na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> (ob pojavu primarnih in sistemskih bolezenskih znamenjih) so pri sorti Igor pokazale izrazite razlike v vzorcu izražanja genov 14 dni po inokulaciji, ob pojavu sistemskih bolezenskih znamenj in v listih sekundarno okuženih rastlin. Najbolj različno izraženi so bili geni za Hsp, katalazo 1,  $\beta$ -glukanazo, z ranitvijo izzvanega gena in geni, ki so vključeni v fotosintezo (Pompe-Novak in sod., 2006). Primerjava izražanja genov med različno občutljivimi sortami (Igor, Desiree, Pentland Squire, Carlingford in Sante) 5 dni po inokulaciji je pokazala, da se te sorte različno odzivajo na okužbo na nivoju izražanja genov (Pompe Novak, 2002).

Ugotovljeno je bilo tudi, da so spremembe vzorca izražanja proteinov po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> odvisne od sorte krompirja. Dva tedna po okužbi je bila pri sorti Igor koncentracija proteinov v soku okuženih rastlin trikrat višja kot v soku zdravih rastlin, pri sortah Desiree, Pentland Squire in Sante pa je bila razlika med okuženimi in zdravimi rastlinami manjša. Dva tedna po inokulaciji se je v okuženih rastlinah sorte Igor na novo pojavilo ali močneje izrazilo 9 različnih proteinov, pri rastlinah sorte Desiree 2 in pri rastlinah sorte Pentland Squire pa 3 različni proteini. Pri sorti Sante se noben protein ni na novo pojavil ali močneje izrazil (Gruden in sod., 2000).

Pri preučevanju zgodnjega odgovora sort krompirja z različno reakcijo na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup>, so bile v inokuliranih listih ugotovljene spremembe v aktivnosti različnih skupin peroksidaz že 3 ure po inokulaciji. Pri merjenju aktivnosti topnih, ionsko in kovalentno vezanih peroksidaz je bil največji odgovor slednjih viden pri sorti Igor, medtem ko se je aktivnost ionsko vezanih peroksidaz najbolj spremenila v sortah Sante in Pentland Squire,. Aktivnost topnih peroksidaz se je 6 ur po inokulaciji znižala v inokuliranih listih sorte Sante, medtem ko je bila pri sorti Igor rahlo povečana prvih 12 ur po inokulaciji (Milavec in sod., 2008).

Pri sorti Igor se je 24 ur po inokulaciji s PVY<sup>NTN</sup> v spodnjih inokuliranih listih in zgornjih neinokuliranih listih povišala količina salicilne kisline, ne pa njenega derivata, gentijske kisline. 11 dni po inokulaciji pa se je 3-kratno povišala količina salicilne kisline in 2-kratno gentijske kisline, kar pa naj ne bi bilo povezano z neposrednim odgovorom na okužbo, temveč s splošnim odgovorom na stres (Krečič Stres in sod., 2005).

Povišanje nivoja salicilne kisline v prvih dneh po okužbi so opazili tudi pri sorti Rywal po okužbi z različki: PVY<sup>0</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>W</sup> in PVY<sup>NTN</sup>. Nivo je ostal povišan še dva tedna po okužbi, medtem ko v neokuženih listih sprememb ni bilo (Witek, 2010).

Dnevno merjenje medceličnega gibanja virusnega različka PVY<sup>0</sup> je pokazalo podobno širjenje okuženega območja iz 1 do 10 celic v obdobju 4 dni po inokulaciji pri občutljivi sorti Quarta in odpornih sortah Pirola in Betina. Po tem času se je pri odpornejših sortah širjenje zaustavilo, medtem ko se je pri občutljivejših sortah širjenje nadaljevalo (Hinrich in sod., 1998). Podobno je bilo opaženo tudi pri različnih sortah krompirja z različnimi stopnjami občutljivosti za okužbo z PVY<sup>NTN</sup>. Pri dovzetnih sortah je bilo od 4 dne po okužbi zaznano razmnoževanje virusa v inokuliranih listih in nato sistemsko razširjanje po rastlini (Mehle in sod., 2004; Baebler in sod., 2011). 5 dni po inokulaciji je možno virusno RNA PVY<sup>NTN</sup> zaznati v sistemsko okuženih listih s PCR v realnem času (Mehle in sod., 2004). Rezultati so pokazali, da se je PVY<sup>NTN</sup> v kasnejših fazah okužbe (12 dni po inokulaciji) nakopičil v vseh sistemsko okuženih listih, vršičku, koreninah in

gomolju pri občutljivi sorti Igor. Vendar je bilo opaziti velike razlike v količini virusa med posameznimi deli in tkivi rastline. Velike količine virusne RNA in virusnih delcev so bile v prevodnem sistemu stebela. Največ virusa se je nakopičilo v povrhnjici in centralnem strženu stebela, kar nakazuje premikanje virusa iz prevodnega sistema v parenhimske celice stebela. Kopičenje virusa je bilo opazno v listnih laskih in povrhnjici stebela rastline krompirja sorte Igor. Na tak način ima virus večje možnosti za mehansko širjenje med rastlinami ali širjenje s pomočjo žuželk (Kogovšek, 2010).

Stopnja gibanja virusa na dolge razdalje v zgornje in spodnje dele rastline je enaka in neodvisna od občutljivosti sorte (Mehle in sod., 2004; Baebler in sod., 2011). Tri tedne po inokulaciji je bil virusni titer približno enak v vseh delih rastline krompirja, razen korenin (Mehle in sod., 2004).

Količina virusa in jakost bolezenskih znamenj pri različnih sortah krompirja nista neposredno povezani (Mehle in sod., 2004). Prav tako je raven kopičenja virusa v inokuliranih in neinokuliranih listih odvisna tudi od starosti okuženega lista ob inokulaciji (Cervantes in Alvarez, 2011).

### **2.3. PCR v realnem času**

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (PCR v realnem času, qPCR) temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki je bila razvita v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (Valasek in Repa, 2005).

Prednosti PCR v realnem času pred PCR so predvsem hitrost (DNA zaznamo že tekom PCR reakcije zato ni potrebe po dodatni detekciji na koncu reakcije), kvantitativnost ter občutljivost (ločevanje tudi dvakratne razlike v količini tarčne DNA molekule in omogoča zaznavanje le nekaj kopij DNA). Metoda ima visoko ponovljivost ter tudi širok dinamični razpon kvantifikacije, saj lahko kvantificiramo zelo različne količine začetne DNA, ki se razlikujejo za 7 redov velikosti (Invitrogen, 2012).

Pri rastlinah PCR v realnem času uporabljajo med drugim za identifikacijo in kvantifikacijo rastlinskih simbiotov in povzročiteljev bolezni, za ugotavljanje prisotnosti tarčne DNA v živilih (npr. prisotnost drugih vrst, gensko spremenjene rastline), za ugotavljanje števila kopij vključenega transgena, za ugotavljanje izražanja genov in za razlikovanje med posameznimi pripadniki genskih družin (Gachon in sod., 2004).

PCR in PCR v realnem času sestavljajo trije glavni koraki, ki navadno potekajo v 35 do 40 ciklih. Prvi korak je denaturacija. Dve-verižno DNA razklenemo v dve verigi s povišanjem temperature na 95°C. Drugi korak je naleganje. Reakcijsko zmes ohladimo, da začetni oligonukleotidi lahko nalegajo na eno-verižno DNA matrico. Temperatura naleganja je 5°C pod temperaturo taljenja začetnih oligonukleotidov. Tretji korak je podaljševanje. DNA polimeraza sintetizira novo verigo in nastane dvoverižna DNA. Aktivnost tarčne DNA polimeraz je optimalna med 68 in 72°C. Hitrost nastajanja nove verige je 100 baznih parov na sekundo (Invitrogen, 2012).

Po vsakem ciklu imamo teoretično dvakrat več produkta kot v predhodnem ciklu. Realno to ne drži, ker se po nekaj ciklih med reakcijo reaktanti porabljajo in reakcija doseže plato. DNA se učinkovito podvaja samo do platoja, zato ne moremo izračunati začetne količine DNA iz izmerjene količine produkta po 40 ciklih reakcije. Z metodo PCR v realnem času merimo produkt v eksponencialni fazi, ko je pomnoževanje DNA

še učinkovito. Meritve produkta so sorazmerne začetni količini DNA, zato PCR v realnem času omogoča kvantifikacijo. Pomnoženo količino DNA merimo po vsakem ciklu s pomočjo fluorescenčnih barvil (Valasek in Repa, 2005).

Najpogosteje uporabljeni kemiji za detekcijo pomnožene DNA sta uporaba vrinjevalnih molekul (npr. SYBR Green), ki se vežejo na vsako na novo nastalo dvojno verigo DNA, in bolj specifična detekcija z uporabo TaqMan sond (Gachon in sod., 2004).

Barvilo SYBR Green I se veže na dvoverižno DNA in v kompleksu z njo fluorescira. Nastajajoče produkte PCR zaznamo z merjenjem fluorescence vezanega barvila. Vezava je nespecifična, zato lahko zaznamo tudi nespecifične produkte in dimere začetnih oligonukleotidov (Invitrogen, 2012), kar lahko preverimo z uporabo talitvene krivulje po zadnjem ciklu PCR. Talitvena krivulja predstavlja spremembo fluorescenčnega signala v odvisnosti od temperature taljenja ( $T_m$ ). Če je v PCR prisotnih več različnih produktov PCR, lahko na grafu talitvene krivulje določimo več različnih  $T_m$  (dobimo več vrhov).

TaqMan kemija uporablja sondo TaqMan, ki je specifična za del ampikona med obema začetnima oligonukleotidoma ter ima na 5'- koncu vezano reportersko (npr. 6 – karboksi – fluorescein, FAM) in na 3' – koncu dušilno barvo (npr. 6- karboksitetrametilrodamin, TAMRA). Kadar je dušilno barvilo v bližini reporterskega barvila, zavira fluoresciranje reporterskega barvila. Sonda se specifično veže na tarčni ampikon. DNA polimeraza zaradi svoje 5' – eksonukleazne aktivnosti med podaljševanjem verige razgrajuje sondo, zato se reportersko barvilo loči od dušilnega, kar omogoča naraščanje fluorescence reporterskega barvila. Nastajanje produktov PCR zaznamo z merjenjem fluorescence reporterskega barvila. Ker je sonda specifična za ampikon, zaznamo le specifične produkte. Računalniški program preračuna spremembe v signalu fluorescence. Za normalizacijo fluorescenčnega signala se uporablja pasivno referenčno barvilo ROX (6-karboksi-X-rodamin).

Točka, kjer pride do dviga signala fluorescence nad vrednost praga, predstavlja  $C_q$  vrednost. Ta se izraža kot število ciklov pomnoževanja, ki so bili potrebni za dvig signala nad prag. Manjša kot je  $C_q$  vrednost (manj ciklov potrebnih za presežek praga) večja je začetna količina tarčne nukleinske kisline v vzorcu (Valasek in Repa, 2005). Pri 40 ciklih pomnoževanja vrednosti  $C_q$ , ki so manjše od 29 pomenijo močno pozitivno reakcijo z veliko količino tarčne nukleinske kisline. Vrednosti med 30 in 37 pomenijo pozitivno reakcijo z zmerno količino tarčne nukleinske kisline. Vrednosti med 38 in 40 pa pomenijo šibko reakcijo, ki lahko nakazuje zelo nizko količino tarčne nukleinske kisline, kot tudi kontaminacijo vzorca (Invitrogen, 2012).

Manj pogosta metoda detekcije je uporaba hibridizacijskih sond, molekularnih svetil (Molecular Beacons) in sond Scorpion. Pri vseh metodah produkte zaznavamo z merjenjem fluorescence, katere količina je sorazmerna z njihovo količino (Gachon in sod., 2004).

RT-qPCR je kombinacija reverzne transkripcije in PCR v realnem času. Omogoča analizo RNA v vzorcih. Analiza lahko poteka v dveh ločenih korakih, kjer se v reakciji reverzne transkripcije RNA prepíše v cDNA in nato v drugi, prostorsko ločeni reakciji, izvede PCR v realnem času ali pa se v enem koraku, v isti epruveti, izvede obe reakciji (Nolan in sod., 2006).

Za relativno kvantifikacijo tarčne RNA v vzorcu je nujna izbira primerne normalizacije. Normalizacija popravi variabilnosti, ki so posledica npr. različne učinkovitosti reakcije

reverzne transkripcije in PCR v realnem času, razlike v tkivu, količine in kvalitete izolirane RNA,... Eden od načinov normalizacije je s pomočjo eksternih ali internih (vzdrževalnih) referenčnih genov. Pri uporabi zunanjih kontrol v eni izmed faz priprave vzorcev dodamo kontrolno mRNA, npr. luciferazno (Toplak in sod., 2004). Slabost metode je, da upoštevamo le učinkovitost RT in PCR v realnem času, ne pa začetnih razlik v količini vzorca. Zato je najboljša metoda normalizacije normalizacija na referenčni gen, saj lahko le tako upoštevamo vse dejavnike variabilnosti. Referenčni gen mora biti izražen enako, ne glede na tkivo in eksperimentalne pogoje (Nolan in sod., 2006). Referenčni geni, ki so kazali stabilno izražanje pri rastlinah, so ribosomska RNA 18S, 25S (Kim in sod., 2003), ubikvitin (Brunner in sod., 2004), tubulin (Coker in Davies, 2003), aktin (Kim in sod., 2003), elongacijski faktor 1- $\alpha$  (Nicot in sod., 2005), GAPDH (Coker in Davies, 2003) in citokrom oksidaza – cox (Li in sod., 2006).

Absolutno količino cDNA v vzorcu lahko izračunamo z uporabo standardne krivulje. Relativno količino cDNA lahko izračunamo iz umeritvene krivulje ali iz razlik med vrednostjo Ct med vzorcem in kontrolo ( $\Delta\Delta C_t$  metoda) (Livak in Schmittgen, 2001; Invitrogen, 2012). Bolj natančna je relativna kvantifikacija, kjer upoštevamo tudi učinkovitost PCR reakcije (Pfaffl, 2001).

### 3. PRAKTIČNI DEL

#### 3.1. Priprava rastlinskega materiala

##### 3.1.1. Rastlinski material

Zdrave rastline krompirja (*Solanum tuberosum*) sort Igor, Desiree in Rywal ter genotipov Desiree NahG in Rywal NahG smo namnožili z nodijsko kulturo in gojili na modificiranem MS gojišču (10 ml gojišča v epruветah) v rastni komori za tkivne kulture. Modificiranemu MS gojišču smo mu dodali 136  $\mu\text{M}$  NaFeEDTA in mu prilagodili pH med 5,7–5,8 ter ga avtoklavirali pri 120 °C in 1,1 bar (Murashige in Skoog, 1962). Izsečke tako vzgojenih rastlin krompirja smo prestavili na gojišče za koreninjenje (40 ml enakega gojišča v plastičnih petrijevkah) in jih gojili v rastni komori. Pogoji v rastni komori so bili: temperatura 19  $\pm$ 2 °C v času osvetljevanja in 17  $\pm$ 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov 70–90  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Po 14 dneh smo rastline presadili v lončke z zemljo in jih štiri tedne vzgajali v rastni komori pri pogojih: relativna zračna vlaga 75  $\pm$ 2 odstotka, temperatura 20  $\pm$ 2 °C v času osvetljevanja in 18  $\pm$ 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov 120–150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo.

##### 3.1.2. Mehanska inokulacija

Po štirih tednih rasti v zemlji v rastni komori z vlago smo rastline krompirja razdelili v štiri enakovredne skupine:

- s PVY<sup>NTN</sup> okužene rastline (inokulirane s sokom rastlin, okuženih s PVY<sup>NTN</sup>),
- s PVY<sup>W</sup> okužene rastline (inokulirane s sokom rastlin, okuženih s PVY<sup>W</sup>),
- slepo inokulirane rastline (inokulirane s sokom zdravih rastlin) in
- neinokulirane rastline (intaktne zdrave rastline za kontrolo).

Za inokulacijo rastlin z različkom PVY<sup>NTN</sup> smo uporabili izolat virusnega različka NIBNTN (AJ585342), ki je bil izoliran iz krompirja sorte 'Igor', gojene v Sloveniji (Kus, 1994). Virus smo množili in vzdrževali v rastlinah krompirja sorte 'Pentland Squire', gojenih v tkivni kulturi, kot je opisano v poglavju 3.1.1.. Izolat virusnega različka PVY<sup>W</sup> je bil izoliran na Poljskem.

Sok za inokulacijo rastlin za poskuse smo pripravili iz poganjkov okuženih ali zdravih rastlin sorte 'Pentland Squire', ki smo jih homogenizirali v pufru za mehansko inokulacijo v razmerju 5 ml pufru na 1 g sveže mase rastlinskega materiala. Pufer za mehansko inokulacijo je vseboval: 2,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % DIECA, pH = 7,6. Macerat smo inkubirali 5 minut, da se je virus izločil iz materiala. Rastlinam smo označili tri spodnje liste, jih posuli s karborundom in nato premazali s sokom za inokulacijo (2 do 3 kapljice). Po 15 minutah smo liste sprali z vodovodno vodo.

### 3.1.3. Serije

Poskus smo izvedli v treh bioloških ponovitvah. 2., 3. in 4. biološke ponovitve nismo upoštevali zaradi tehničnih razlogov.

**Tabela 1:** Število rastlin v 1. biološki ponovitvi

| Sorta/genotip | s PVY <sup>NTN</sup> okužene rastline | s PVY <sup>W</sup> okužene rastline | slepo inokulirane rastline | neinokulirane rastline |
|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Igor          | 4                                     | 4                                   | 4                          | 4                      |
| Desiree       | 4                                     | 4                                   | 4                          | 4                      |
| Desiree NahG  | 4                                     | 4                                   | 4                          | 4                      |
| Rywal         | 4                                     | 4                                   | 4                          | 4                      |
| Rywal NahG    | 4                                     | 4                                   | 4                          | 4                      |

**Tabela 2:** Število rastlin v 5. biološki ponovitvi

| Sorta/genotip | s PVY <sup>NTN</sup> okužene rastline | s PVY <sup>W</sup> okužene rastline | slepo inokulirane rastline | neinokulirane rastline |
|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Igor          | 11                                    | 11                                  | 5                          | 5                      |
| Desiree       | 11                                    | 11                                  | 5                          | 5                      |
| Desiree NahG  | 10                                    | 10                                  | 5                          | 5                      |
| Rywal         | 8                                     | 8                                   | 4                          | 4                      |
| Rywal NahG    | 11                                    | 11                                  | 5                          | 5                      |

**Tabela 3:** Število rastlin v 6. biološki ponovitvi

| Sorta/genotip | s PVY <sup>NTN</sup> okužene rastline | s PVY <sup>W</sup> okužene rastline | slepo inokulirane rastline | neinokulirane rastline |
|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Igor          | 16                                    | 16                                  | 8                          | 8                      |
| Desiree       | 16                                    | 16                                  | 8                          | 8                      |
| Desiree NahG  | 16                                    | 16                                  | 8                          | 8                      |
| Rywal         | 16                                    | 16                                  | 8                          | 8                      |
| Rywal NahG    | 16                                    | 16                                  | 8                          | 8                      |

### 3.1.4. Opazovanje rastlin

Bolezenska znamenja smo opazovali:

1. biološka ponovitev: 4 dpi (dni po inokulaciji), 5 dpi in 7 dpi
5. biološka ponovitev: 5 dpi, 7 dpi, 13 dpi, 20 dpi in 43 dpi
6. biološka ponovitev: 5 dpi, 6 dpi, 7 dpi, 9 dpi, 12 dpi, 22 dpi, 27 dpi, 35 dpi in 48 dpi

Na vsaki rastlini smo popisali bolezenska znamenja na vsakem listu. Vsak list smo glede na bolezenska znamenja uvrstili v eno ali več sledečih kategorij:

- Brez bolezenskih znamenj
- Obročaste kloroze
- Točkaste nekroze
- Rumenenje

- Sušenje
- Odpadel list

Pridobljene podatke o bolezenskih znamenjih smo statistično obdelali v programu Excel in sicer vsako biološko ponovitev posebej.

Obročaste kloroze in točkaste nekroze smo tudi prešteli. Za slikanje rastlin smo uporabili fotoaparata PENTAX K-7. Nastavitve fotoaparata so bile: odprtost zaslonke (f/11), čas osvetlitve (2 s) in hitrost ISO (ISO-200).

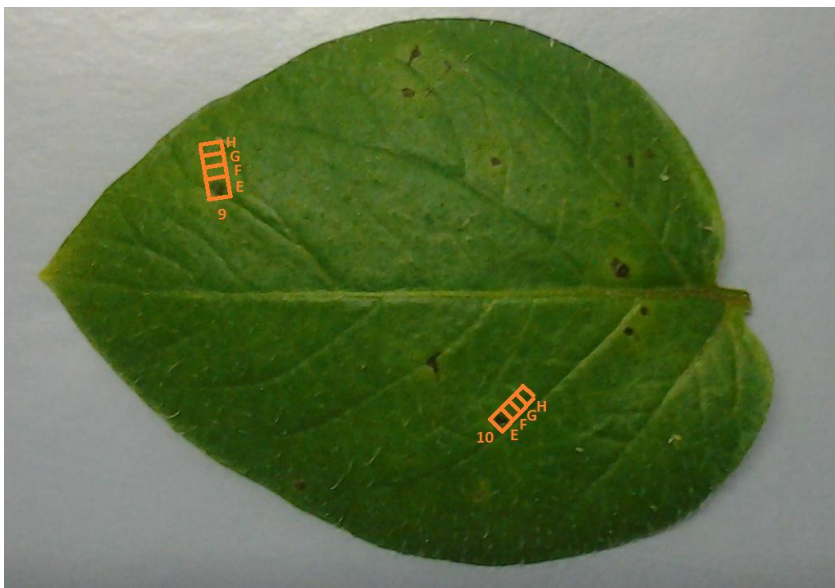
Na fotografijah smo izmerili velikost obročastih kloroz in točkastih nekroz. To smo naredili tako, da smo v programu Adobe Photoshop CS3 izmerili premer izbranega lista ter obročastih kloroz ali točkastih nekroz na njem. Izmerjene vrednosti obročastih kloroz ali točkastih nekroz smo nato delili z izmerjenim premerom lista.

### 3.1.5. Pobiranje rastlinskega materiala

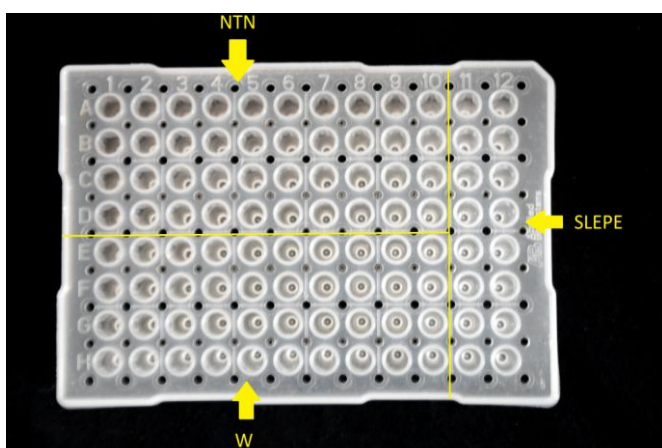
Vzorci smo pobirali, ko so bile točkaste nekroze pri posamezni sorti ali genotipu najbolj izrazite. To je bilo v 6. biološki ponovitvi med 3 in 9 dni po inokulaciji (dpi).

List s točkastimi nekrozami ali obročastimi klorozami smo odrezali, ga fotografirali, ter nato izrezali točkasto nekrozo ali obročasto klorozo. Izrezovanje je potekalo tako, da smo s skalpelom izrezali 2 mm širok trak, ki je vključeval točkasto nekrozo ali obročasto klorozo ter nato izrezali koščke. Prvi košček je bil velik 2 mm X 2 mm, ker je vseboval točkasto nekrozo ali obročasto klorozo, nato so si v sosledju sledili še trije 2 mm X 1 mm veliki koščki. Pri vzorčenju smo pazili, da nismo rezali čez žile, ter da vzorcev nismo jemali tako, da bi posegali v območje točkaste nekroze ali obročaste kloroze (Slika 1). Na enak način smo vzorčili tudi liste slepo inokuliranih rastlin, čeprav le ti niso imeli točkastih nekroz ali obročastih kloroz. Koščke smo nato shranili v predhodno pripravljeno ploščico, ki je vsebovala RNAlater Solution (Ambion, ZDA). Ploščica je bila razdeljena tako, da so vdolbinice od A do D vsebovale koščke PVY<sup>NTN</sup> od številke 1 do številke 10. Vdolinice od E do H pa koščke PVY<sup>W</sup> od številke 1 do 10. V vdolbinice številke 11 in 12 smo vzorčili slepo inokulirane vzorce (Slika 2). Vzorce smo inkubirali 24 do 48 ur na 4 °C, ter nato shranili na -80 °C.





**Slika 1:** Vzorčevanje točkastih nekroz na rastlini št.2, inokuliranem listu št. 3 sorte Rywal okužene s PVY<sup>W</sup> (6. biološka ponovitev)



**Slika 2:** Vzorčevanje na ploščico

## 3.2. Priprava RNA

### 3.2.1. Izolacija RNA in cDNA

Izolacija RNA je potekala s kompletom RNeasy Plant Micro kit (Qiagen, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Vzorci smo iz fiksativa prestavili v mikrocentrifugirke s 350 µl pufru RTL in kroglico ter homogenizirali (Tissuelyzer) 2 minuti. Nato smo centrifugirali na najvišji hitrosti (18 000 g) 3 minute in lizat brez usedline prenesli v nove mikrocentrifugirke. Dodali smo 1X volumen 70% etanola ter premešali s pipeto. Vzorce smo prenesli na MinElute Spin Column in centrifugirali pri 8000 g. Kolone smo prenesli v nove prazne mikrocentrifugirke in dodali 350 µl RW1 ter centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Kolone smo prenesli v nove mikrocentrifugirke, dodali na membrano kolonice 80 µl mešanice z DNazo in inkubirali na sobni temperaturi 15 minut. Na kolono smo dodali 350 µl RW1, centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Kolone smo prestavili v nove mikrocentrifugirke, dodali smo 500 µl RPE, centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Ponovno smo prenesli kolone v nove mikrocentrifugirke, dodali 500 µl 80 % etanola ter centrifugirali 2 minuti pri 8000 g. Kolone smo prestavili v nove mikrocentrifugirke in 5 minut centrifugirali pri 18 000 g. Kolone smo prestavili v nove mikrocentrifugirke, dodali 16 µl vode brez RNaz segrete na 56 °C ter inkubirali na sobni temperaturi 10 minut. Nato smo centrifugirali 1 minuto pri 18 000 g. Vzorce smo shranili na -80 °C.

### 3.2.2. Določanje koncentracije in kvalitete RNA z aparaturo BioAnalyzer

Za ugotavljanje koncentracije in kvalitete RNA, ki smo jo uporabili, smo uporabili komplet RNA 6000 Piko LabChip® kit (Ambion, ZDA) in aparaturo Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, ZDA). Metoda temelji na ločevanju molekul RNA na osnovi velikosti s pomočjo kapilarne elektroforeze in analize podatkov. Analizator za vsak vzorec izriše elektroferogram, določi faktor, ki meri kvaliteto RNA.

Za pripravo gela smo odpipetirali 550 µl gela (RNA 6000 Pico gel matrix) ter centrifugirali na 1500 g 10 minut na sobni temperaturi. V mikrocentrifugirke smo dali 65 µl gela, v katerega smo dodali 1 µl barvila (RNA 6000 Pico dye concentrate). Čip (RNA 6000 Pico chip) smo postavili na stojalo z brizgo. V čip (RNA 6000 Pico chip) smo odpipetirali 9 µl mešanice gela in barvila. Zatič smo potisnili do oznake 1 ml in počakali 30 sekund. Nato smo spustili zatič in ga počasi potegnili nazaj do oznake 1 ml. V označene vdolbinice smo odpipetirali 9 µl mešanice barvila in gela. V vdolbinico označeno CS smo odpipetirali 9 µl raztopine RNA 6000 Pico Conditioning Solution. V vseh 11 vdolbinic in vdolbinico za standard smo nato odpipetirali 5 µl markerja (RNA Pico marker) Nato smo v vdolbinico za standard dodali 1 µl standarda (RNA 6000 Ladder), ki smo ga predhodno denaturirali (2 minuti na 70 °C). Enak postopek denaturacije smo naredili tudi za vzorce. Vzorce smo odpipetirali po 1 µl v vdolbinico. Pico čip smo z vrtenjem premešali ter vstavili v aparaturo Agilent BioAnalyzer. Podatke smo analizirali s programom 2100 Expert Software (Agilent Technologies, ZDA).

### 3.2.3. Reverzna transkripcija

Prepis mRNA v cDNA smo izvedli tako, da smo v luknjice (ploščica z 96 vdolbinicami) odpipetirali 12  $\mu$ l vzorca (če vzorca ni bilo dovolj, smo dodali vodo brez RNaz do tega volumna). V eno izmed luknjic smo dodali luciferazo, ki smo jo uporabili za eksterno kontrolo. Ploščico smo pokrili s folijo. Sledila je denaturacija na 80 °C za 5 minut. Ploščico smo takoj postavili na led. Vzorcem smo dodali 12,5  $\mu$ l mešanice, ki je za 1 vzorec vsebovala 2,5  $\mu$ l pufer RT, 1  $\mu$ l mešanice dNTP, 2,5  $\mu$ l naključnih začetnih oligonukleotidov, 3,25  $\mu$ l vode brez RNaz, 1  $\mu$ l inhibitorjev RNaz, 1,25  $\mu$ l reverzne transkriptaze in 1  $\mu$ l luciferaze. Ploščico smo nato pokrili, jo hitro premešali in centrifugirali. Sledila je inkubacija za 10 minut na 25 °C, nato pa še 2 uri na 37 °C. Vzorce smo do uporabe shranili na – 20 °C.

## 3.3. PCR v realnem času

### 3.3.1. Kvantitativni PCR v realnem času

Z metodo qPCR v realnem času smo določili izražanje genov. Uporabili smo dve kemiji PCR v realnem času, barvilo SYBR Green I in kemijo TaqMan. V obeh primerih smo nastanek produktov PCR zaznali z merjenjem fluorescence, tekom celotne reakcije PCR. Z nastajanjem produktov PCR narašča fluorescenčni signal, intenziteta fluorescence pa je bila sorazmerna s količino nastalih produktov PCR v eksponentni fazi. Za določanje števila kopij izbranih genov z umeritveno krivuljo, smo pripravili referenčni vzorec, ki je vseboval enak delež cDNA naključno izbranih vzorcev (R1G, R2E, R3F, R5G, R11H, RN1G, RN2G, RN3H, RN4F, RN11F). Referenčni vzorec smo redčili 10x, 50x, 100x in 500x za vse amplikone. Vzorce smo redčili 10x in 50x, za vse amplikone.

V mikrocentrifugirke smo si pripravili reakcijske mešanice v volumnu, ki je zadostoval za vse reakcije PCR (vzorce) določenega testa.

Komplet Power SYBR Green PCR Master Mix je vseboval:

- barvilo SYBR Green I,
- DNA polimerazo AmpliTaq Gold,
- dNTP,
- pasivno referenčno barvilo (ROX),
- pufer

Reakcijska mešanica za PCR je vsebovala:

- 2,5  $\mu$ l mešanice Power SYBR Green PCR Master Mix
- 0,05  $\mu$ l (300 nM) začetnih oligonukleotidov forward
- 0,05  $\mu$ l (300 nM) začetnih oligonukleotidov reverse
- 0,4  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O
- 2  $\mu$ l cDNA(vzorec)

Komplet TaqMan Universal PCR Master Mix je vseboval:

- polimerazo DNA AmpliTaq Gold,
- AmpErase UNG,
- dNTP z dUTP,
- pasivno referenčno barvilo (ROX),
- pufer.

Reakcijska mešanica za PCR je vsebovala:

- 2,5 µl mešanice TaqMan Universal PCR Master Mix
- 0,25 µl mešanico začetnih oligonukleotidov in sonde
- 0,25 µl dH<sub>2</sub>O
- 2 µl cDNA (vzorec)

Ali:

- 2,5 µl mešanice TaqMan Universal PCR Master Mix
- 0,05 µl (300 nM) začetnih oligonukleotidov forward
- 0,05 µl (300 nM) začetnih oligonukleotidov reverse
- 0,075 µl (150 nM) sonde
- 0,325 µl dH<sub>2</sub>O
- 2 µl cDNA (vzorec)

Za vsak vzorec smo si torej pripravili štiri različne reakcijske mešanice (4 različne amplikone). Vzorce cDNA in pripravljene reakcijske mešanice smo na optično ploščico nanašali z robotom (Multiprobe II).

Najprej smo nanašali vzorce, po 2 µl v vsak prostorček. Po nanosu vzorcev smo ploščico pokrili z neoptično lepljivo folijo, centrifugirali 1 min pri 1000 g. Ploščico smo v tem koraku pokrili zato, da med centrifugiranjem ni prišlo do kontaminacije med vzorci. Nato smo vsakemu vzorcu dodali 3 µl reakcijske mešanice. V prvi in zadnji prostorček z reakcijsko mešanico istega testa smo dodali dH<sub>2</sub>O za kontrolo kontaminacije (NTC). Ploščico smo pokrili z optično lepljivo folijo, zopet centrifugirali 2 min pri 1000 g in jo vstavili v aparaturo za PCR v realnem času.

Prvi korak v programu za PCR v realnem času je bil aktivacija UNG AmpErase 2 minuti pri 50 °C. Sledila je aktivacija AmpliTaq Gold polimeraze 10 minut pri 95 °C. Nato je sledila denaturalizacija DNA in pomnoževanje, in sicer v 40 ciklih po 15 sekund pri 95 °C in nato 1 minuto pri 60 °C. Zadnji korak je talitvena krivulja, ki je potekala pri 95 °C.

Podatke smo analizirali s programom LightCycler® 480 SW 1.5. Program je izrisal graf pomnoževanja produktov PCR, pri katerem je bilo število ciklov nanoseno na x os, fluorescenca pa na y os. Reakcijski profil je vseboval tri faze: začetno fazo, eksponentno fazo in fazo platoja. Program je izbral prag s pomočjo sistema dvojnih odvodov v točki, kjer se je začela eksponentna faza. Cikel, v katerem je vzorec prešel prazno fluorescenco se imenuje Cq. Vrednosti Cq smo prenesli v program qPCR Calculator (NIB), v katerem smo analizirali izražanje izbranih genov. Najprej smo vstavili podatke za referenčni gen cox (citokrom oksidaza), nato za tarčne gene, ter podatke za pogoje (extraction quality control, slope between, slope difference). Iz programa qPCR Calculator smo podatke izvozili v program Excel, kjer smo uredili grafe.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Bolezenska znamenja pri sorti Igor

Na rastlinah sorte Igor so se po okužbi s PVN<sup>NTN</sup> na inokuliranih listih pojavile obročkaste kloroze in točkaste nekroze. Bolezenska znamenja so se pojavila tudi na neinokuliranih listih. Po okužbi s PVY<sup>W</sup> pa se na sorti Igor bolezenska znamenja niso razvila. Sorta Igor je edina od preiskanih sort in genotipov, ki je na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> odgovorila s pojavom drugačnih bolezenskih znamenj, kot pri okužbi s PVY<sup>W</sup>.

Pri sorti Igor smo pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> opazili prva lokalna bolezenska znamenja 5 ali 6 dpi. Rastline okužene s PVY<sup>NTN</sup> so imele statistično značilno več inokuliranih listov z obročkastimi klorozami in točkastimi nekrozami (Priloga A; Priloga C), ter porumenelih listov kot slepo inokulirane in s PVY<sup>W</sup> okužene rastline. 7 dpi smo pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> opazili prehajanje obročkastih kloroz v točkaste nekroze. Rastline okužene s PVY<sup>NTN</sup> so imele statistično značilno več porumenelih in odpadlih listov kot slepo inokulirane in s PVY<sup>W</sup> okužene rastline (Slika 4). Med 7 dpi in 12 dpi smo pri vseh rastlinah (intaktne, slepo inokulirane, s PVY<sup>W</sup> in PVY<sup>NTN</sup> okužene rastline) opazili rumenenje inokuliranih listov. 12 oziroma 13 dpi so odpadli inokulirani listi pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup>, ki so dobile značilen izgled palmovega drevesa (Slika 3).

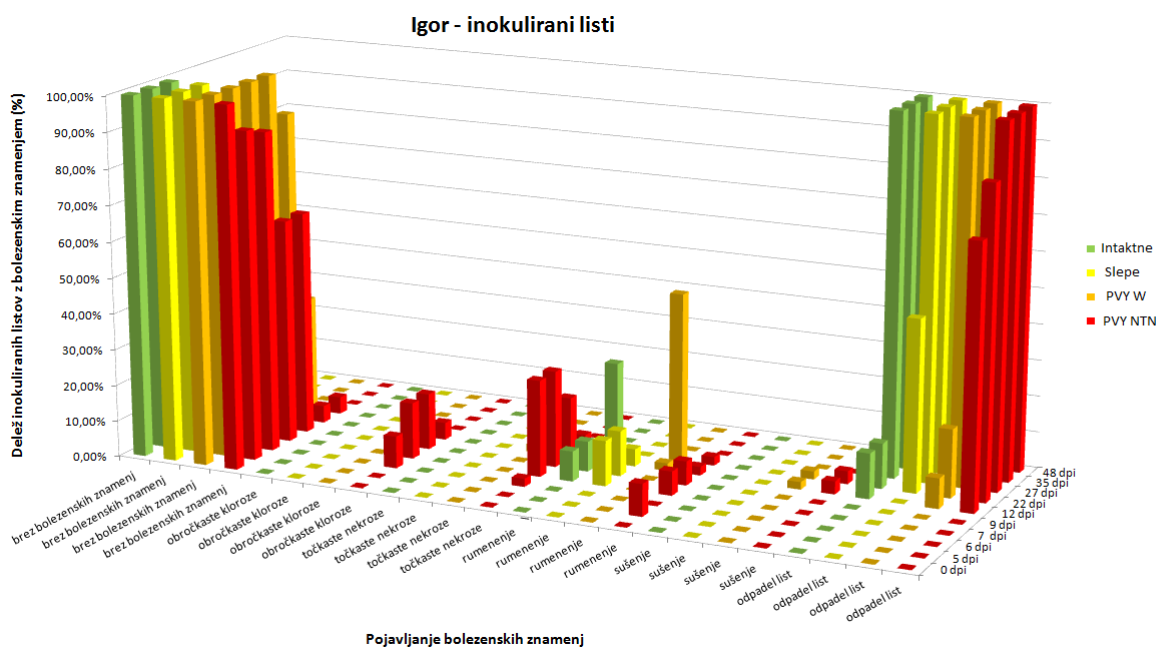
Pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> smo lahko 22 dpi opazili povečanje deleža porumenelih in odpadlih inokuliranih listov. Pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> je bilo 27 dpi statistično značilno več suhih in odpadlih listov, kot pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> in slepo inokuliranih rastlinah. Med 35 dpi in 43 dpi so na vseh rastlinah odpadli vsi inokulirani listi. Pri rastlinah okuženih z PVY<sup>W</sup> in PVY<sup>NTN</sup> je odpadlo tudi nekaj neinokuliranih listov, medtem ko so listi pri slepo inokuliranih in intaktnih rastlinah porumeneli (Slika 5). 48 dpi smo pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> opazili sušenje vršičkov, pri čemer je bil odstotek suhih vršičkov pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> statistično različno večji kot pri slepo inokuliranih rastlinah in rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> (Priloga A; Priloga C).



**Slika 3:** S PVY<sup>NTN</sup> okužena rastlina sorte Igor 27 dpi z značilno obliko palmovega drevesa



**Slika 4:** Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY<sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY<sup>NTN</sup> (desno) sorte Igor 9 dpi



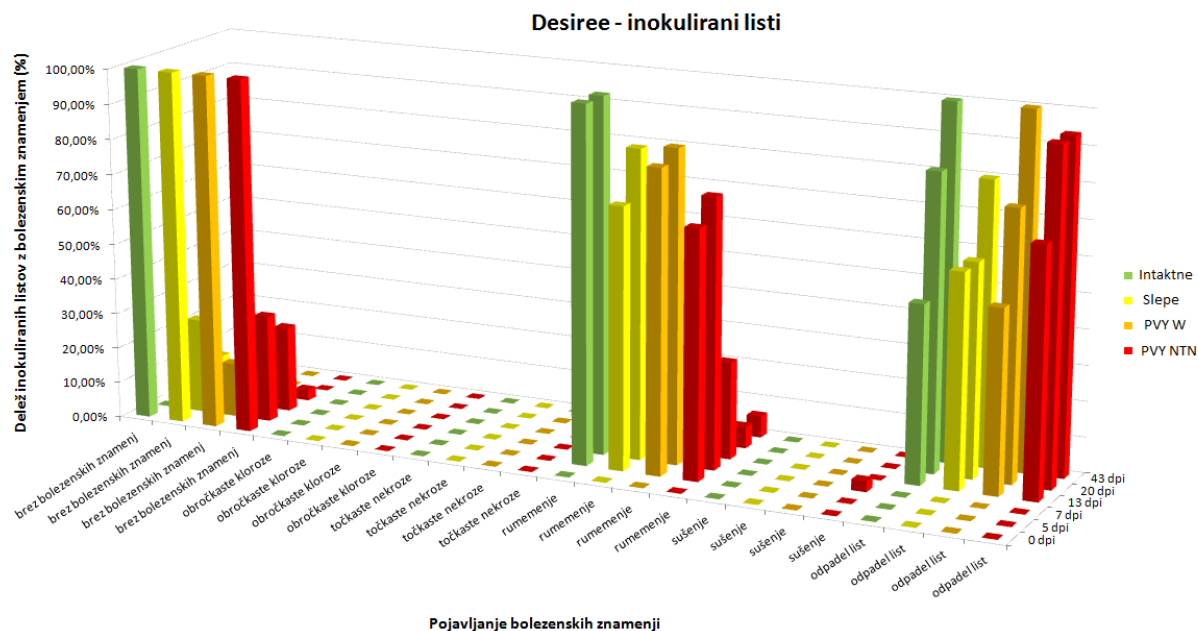
**Slika 5:** Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih sorte Igor (6. biološka ponovitev)

## 4.2. Bolezenska znamenja pri sorti Desiree

Rastline sorte Desiree po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> niso kazale bolezenskih znamenj (Slika 6), na listih vseh rastlin (intaktnih, slepo inokuliranih, okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup>) pa se je 5 dpi začelo pojavljati rumenenje, ki je se do 12 dpi povečevalo. 12 oziroma 13 dpi so začeli listi pri vseh rastlinah odpadati, kar se je stopnjevalo do 43 dpi (Slika 7).



**Slika 6:** Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY<sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY<sup>NTN</sup> (desno) sorte Desiree 9 dpi



**Slika 7:** Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih sorte Desiree (5. biološka ponovitev)

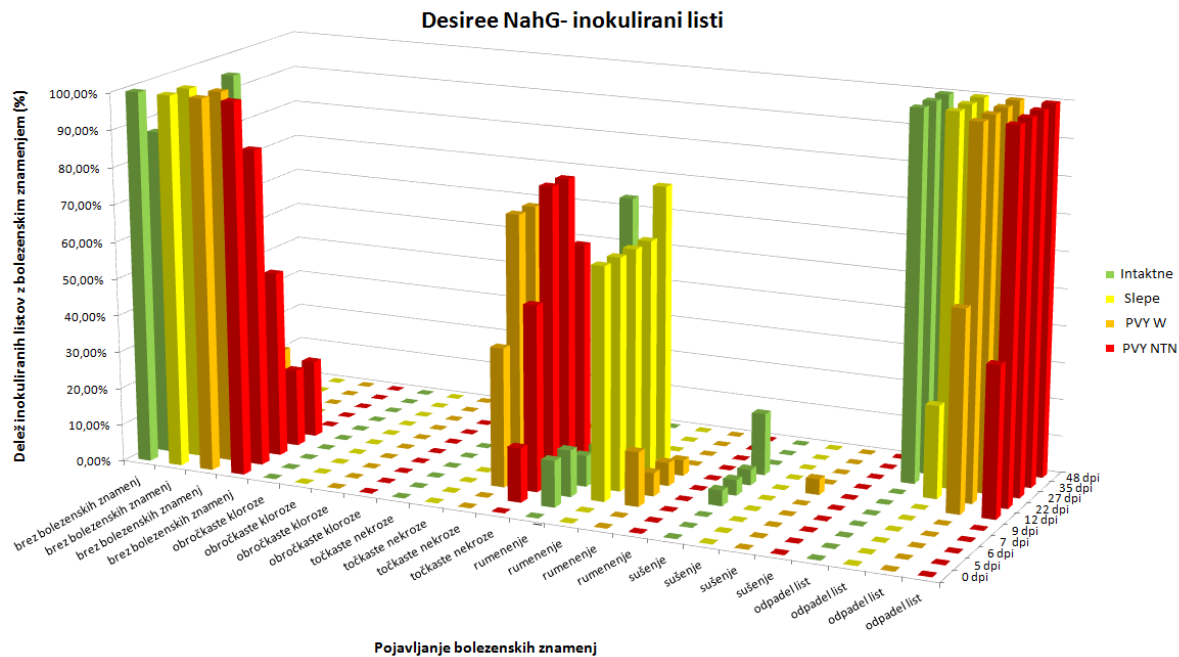
### 4.3. Bolezenska znamenja pri genotipu Desiree NahG

Rastline genotipa Desiree NahG so na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> odgovorile z razvojem točkastih nekroz na inokuliranih listih. 5 in 6 dpi je bilo pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> statistično značilno več listov s točkastimi nekrozami kot pri slepo inokuliranih in s PVY<sup>W</sup> okuženih rastlinah. Število listov s točkastimi nekrozami se je povečevalo do 9 (Slika 8). 12 oz. 13 dpi so listi pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> začeli odpadati. 20 in 22 dpi je bilo odpadlih listov pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> statistično značilno več kot pri slepo inokuliranih rastlinah in intaktnih rastlinah (Priloga B). 20 oziroma 22 dpi so porumeneli listi pri intaktnih in slepo inokuliranih rastlinah. 27 dpi so odpadli vsi inokulirani listi pri vseh rastlinah. 48 dpi so odpadli tudi neinokulirani listi pri vseh rastlinah, razen pri intaktnih rastlinah, ki so bili brez bolezenskih znamenj do konca opazovanja (Slika 9).



**Slika 8:** Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY<sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY<sup>NTN</sup> (desno) genotipa Desiree NahG 9 dpi





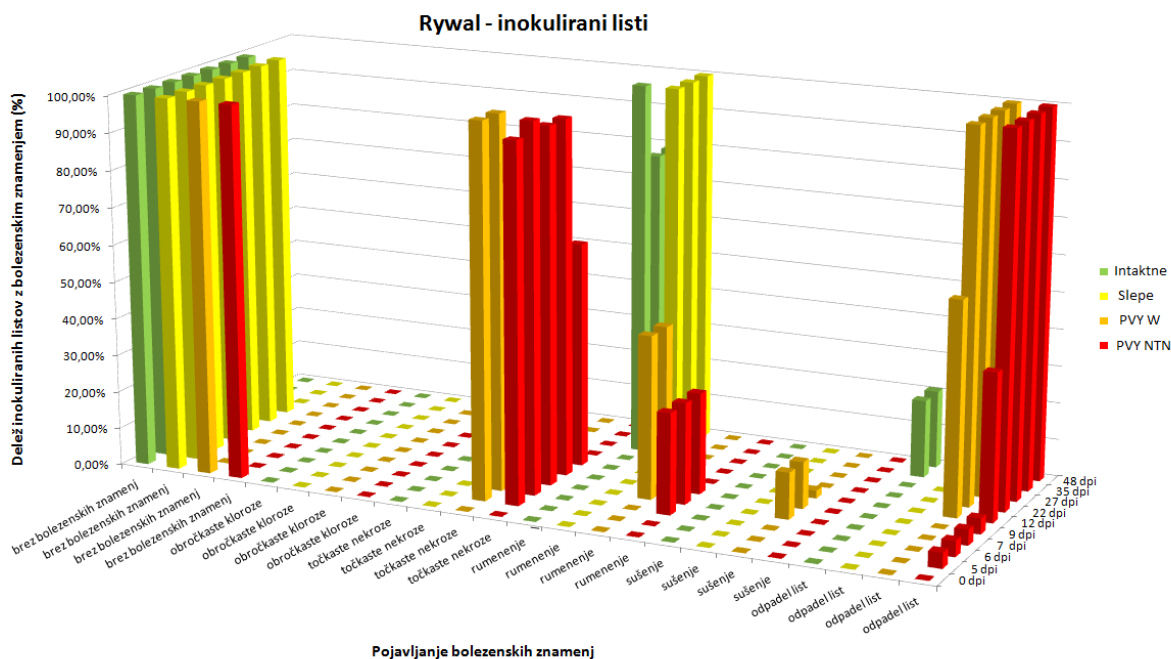
**Slika 9:** Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih genotipa Desiree NahG (6. biološka ponovitev)

#### 4.4. Bolezenska znamenja pri sorti Rywal

Rastline sorte Rywal so na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> odgovorile z razvojem točkastih nekroz na inokuliranih in tudi nekaterih neinokuliranih listih. 5 in 6 dpi so imeli vsi inokulirani listi rastlin okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> točkaste nekroze (Slika 10), pri slepo inokuliranih in intaktnih rastlinah pa točkastih nekroz ni bilo.



**Slika 10:** Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY<sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY<sup>NTN</sup> (desno) sorte Rywal 9 dpi



**Slika 11:** Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih sorte Rywal (6. biološka ponovitev)

Na inokuliranih listih rastlin okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> se je 7 in 9 dpi (Slika 11) pojavilo statistično značilno več rumenenja kot pri slepo inokuliranih rastlinah. Pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> je bilo tudi statistično značilno več suhih inokuliranih listov kot pri slepo inokuliranih rastlinah. 12 oziroma 13 dpi je pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> odpadlo statistično značilno več inokuliranih listov kot pri slepo inokuliranih rastlinah), med 20 in 27 dpi pa so pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> odpadli vsi inokulirani listi.

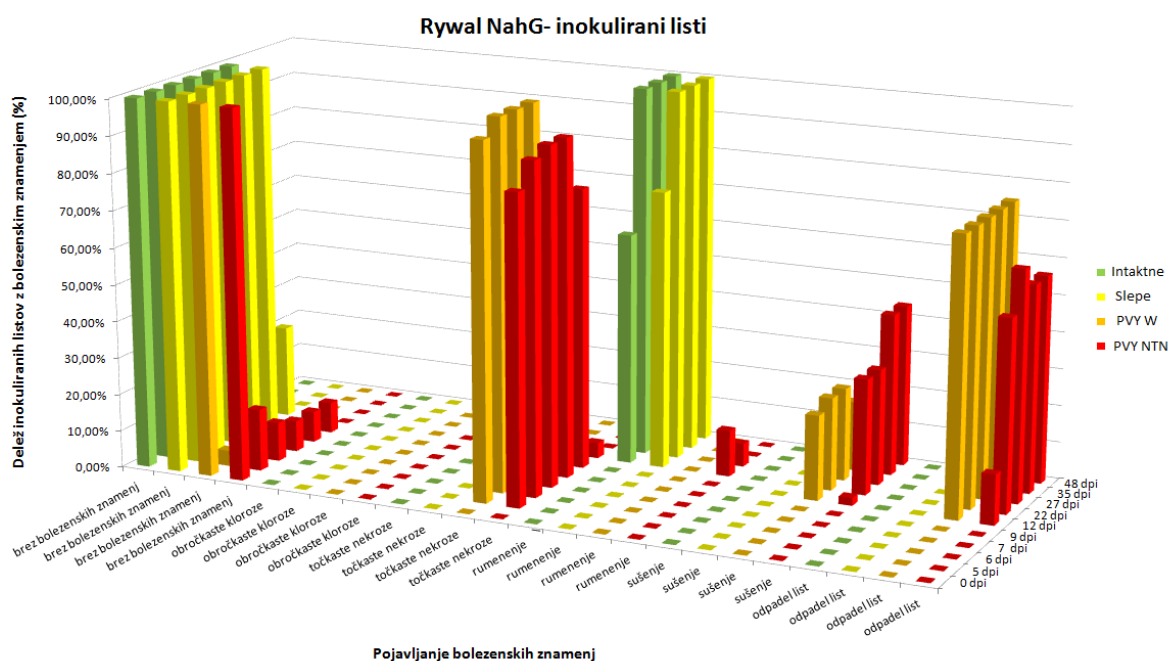
#### 4.5. Bolezenska znamenja pri genotipu Rywal NahG

Rastline genotipa Rywal NahG so na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> odgovorile z zelo podobnimi bolezenskimi znamenji kot sorta Rywal, to je z razvojem točkastih nekroz na inokuliranih (Slika 12) in tudi na nekaterih neinokuliranih listih.

Točkastih nekroz je bilo 5 dpi pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> statistično značilno več kot pri slepo inokuliranih rastlinah. Med 13 in 20 dpi je bilo odpadanje listov pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> statistično značilno večje kot pri slepo inokuliranih rastlinah. 20 dpi so neinokulirani listi pri vseh rastlinah porumeneli, pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> so inokulirani listi tudi odpadali in se sušili (Slika 13).



**Slika 12:** Slepo inokulirana rastlina (levo), rastlina okužena s PVY<sup>W</sup> (na sredini) in rastlina okužena s PVY<sup>NTN</sup> (desno) genotipa Rywal NahG 9 dpi



**Slika 13:** Pojavljanje bolezenskih znamenj v času na inokuliranih listih genotipa Rywal NahG (6. biološka ponovitev)

## 4.6. Točkaste nekroze

### 4.6.1. Velikost in oblika točkastih nekroz

Točkaste nekroze so se po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> razvile pri sortah Igor in Rywal ter genotipih, Desiree NahG in Rywal NahG, po okužbi s PVY<sup>W</sup> pa pri sorti Rywal in genotipih Desiree NahG in Rywal NahG. Obročaste kloroze so se pojavile le po okužbi sorte Igor s PVY<sup>NTN</sup>, kjer so se s časom spremenile v točkaste nekroze.

Točkaste nekroze na rastlinah različnih sort oziroma genotipov so se razlikovale med seboj po velikosti in obliki.

Točkaste nekroze pri sorti Igor so bile okrogle, pri genotipu Desiree NahG okrogle ali vretenaste, pri čemer so ležale večinoma na listnih žilah. Pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG pa so bile točkaste nekroze zvezdaste oblike (Slika 14, Slika 15).

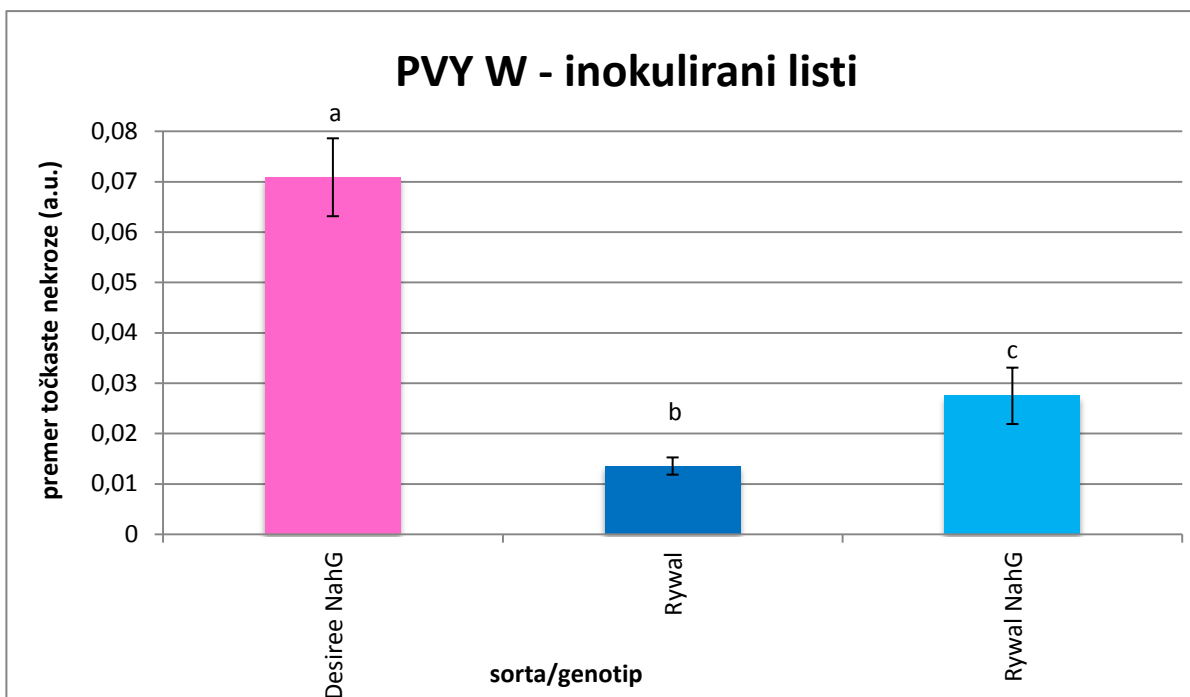
Pri genotipu Desiree NahG so bile točkaste nekroze največje. Po velikosti si nato sledijo točkaste nekroze pri sorti Igor, najmanjše pa so bile točkaste nekroze pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG, pri čemer so bile pri genotipu Rywal NahG večje kot pri sorti Rywal (Slika 16, Slika 17).



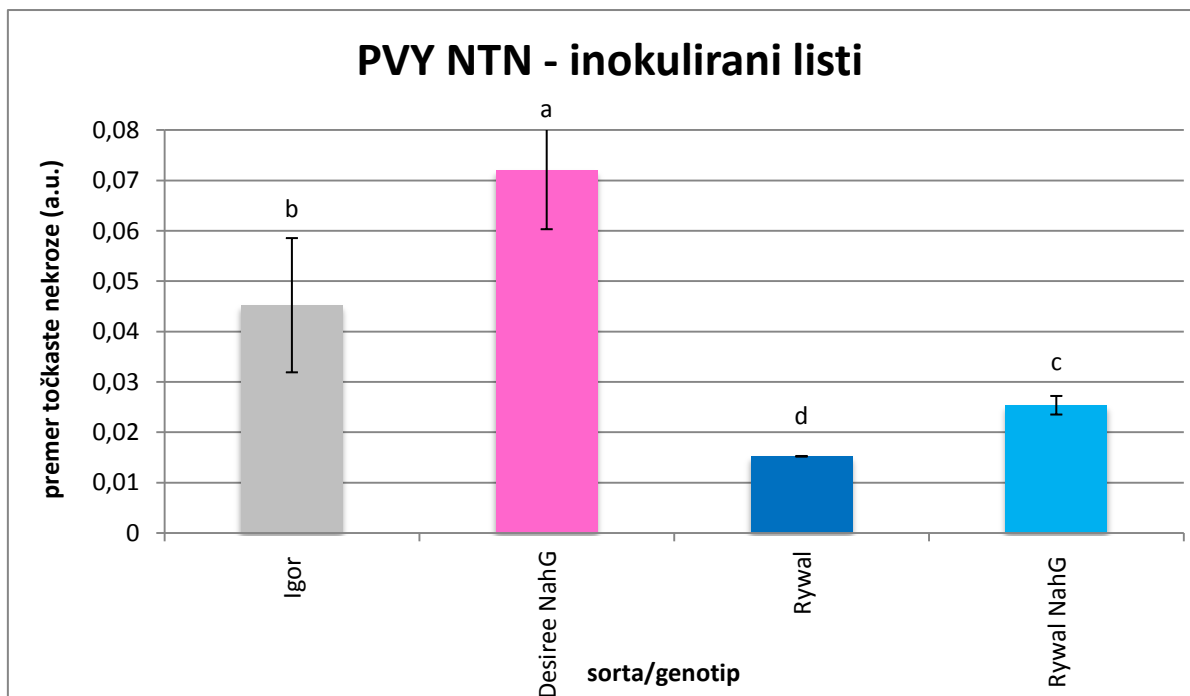
**Slika 14:** Točkaste nekroze na inokuliranem listu genotipa Desiree NahG (levo), sorte Rywal (na sredini) in genotipa Rywal NahG (desno) po okužbi s PVY<sup>W</sup>



**Slika 15:** Obročkaste kloroze na inokuliranem listu sorte Igor (levo zgoraj). Točkaste nekroze na inokuliranem listu sorte Igor (na sredini zgoraj), genotipa Desiree NahG, sorte Rywal in genotipa Rywal NahG po okužbi s PVY<sup>NTN</sup>



**Slika 16:** Premer točkaste nekroze na inokuliranem listu sorte Rywal in genotipov Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY<sup>W</sup>. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka.



**Slika 17:** Premer točkaste nekroze na inokuliranem listu sort Igor in Rywal ter genotipov Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY<sup>NTN</sup>. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka.

#### 4.6.2. Število obročkastih kloroz in točkastih nekroz

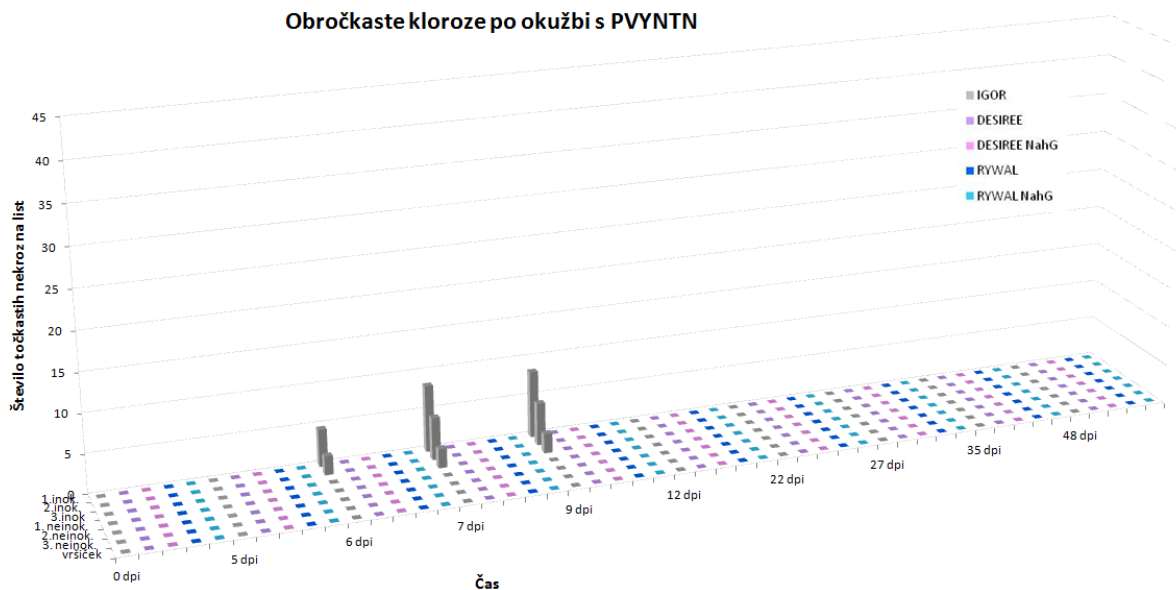
Pri sorti Igor so se obročkaste kloroze na inokuliranih listih rastlin okuženih s PVY<sup>NTN</sup> pojavile prej kot točkaste nekroze, medtem ko se pri tej sorti okuženi s PVY<sup>W</sup> obročkaste kloroze in točkaste nekroze niso pojavljale. Obročkaste kloroze so se pojavile hitreje in številčneje kot točkaste nekroze (Slika 18); obročkastih kloroz je bilo v povprečju do 10 na inokuliran list, medtem ko je bilo točkastih nekroz med 3 in 5 na inokuliran list (Slika 19). Na neinokuliranih listih ter vršičku se točkaste nekroze ne pojavijo.

Pri genotipu Desiree NahG so se točkaste nekroze pojavile na inokuliranih listih rastlin okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup>. Pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> se je razvilo večje število točkastih nekroz (v povprečju do 13 točkastih nekroz na list), medtem ko jih je bilo pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> manj, v povprečju do 7 točkastih nekroz na list. Največ točkastih nekroz smo opazili 12 dni po inokulaciji, po tem pa so inokulirani listi odpadli. Opazili smo lahko tudi manjše število točkastih nekroz na neinokuliranih listih (v povprečju 1 točkasta nekroza na list), na vršičkih točkastih nekroz nismo opazili (Slika 19, Slika 20).

Pri sorti Rywal smo opazili točkaste nekroze na inokuliranih listih pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> in rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup>. Opazili smo tudi manjše število točkastih nekroz na 1. in 2. neinokuliran listu pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> in s PVY<sup>NTN</sup>. Na vršičkih točkastih nekroz ni bilo (Slika 19, Slika 20).

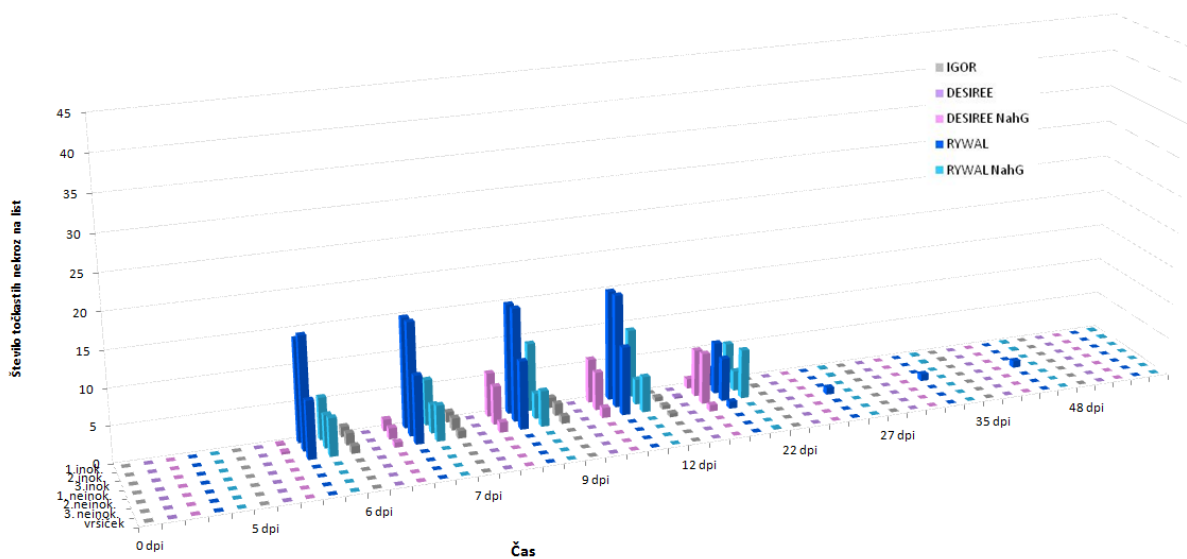
Pri genotipu Rywal NahG so se točkaste nekroze pojavile na inokuliranih listih pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> in rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup>. Pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> je bilo v povprečju do 10 točkastih nekroz na inokuliran list, medtem ko je bilo pri rastlinah okuženih s PVY<sup>W</sup> do 36 točkastih nekroz na inokuliran list. Točkaste nekroze se niso pojavile na vršičkih rastlin okuženih s PVY<sup>W</sup> in s PVY<sup>NTN</sup> (Slika 19, Slika 20).

### Obročaste kloroze po okužbi s PVYNTN

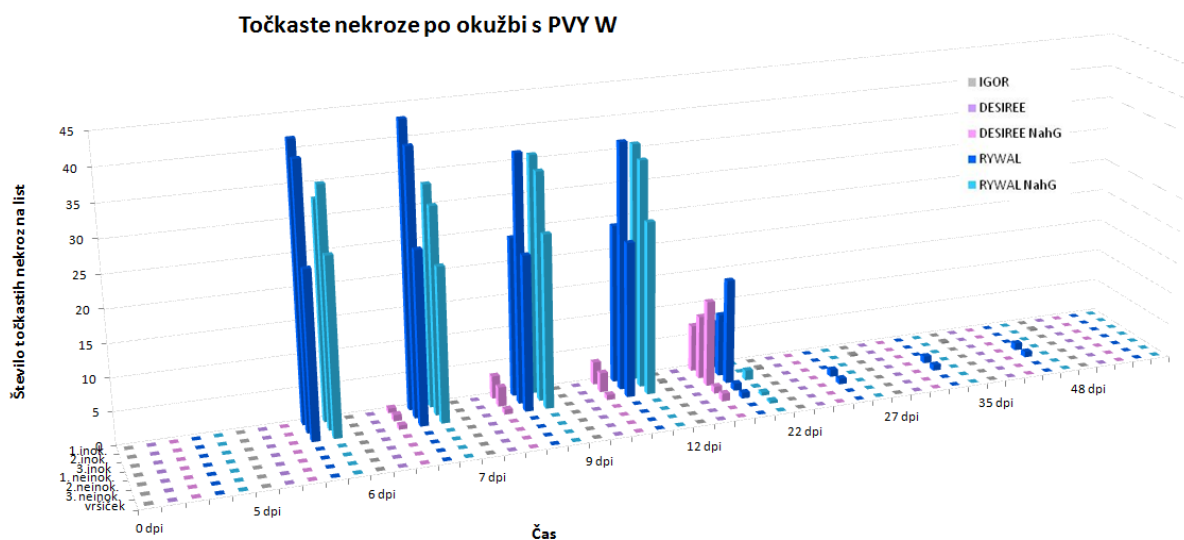


**Slika 18:** Število obročastih kloroz na 1., 2., 3. inokuliranem listu, 1., 2., 3. neinokuliranem listu, na vršičku pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY<sup>NTN</sup>

### Točkaste nekroze po okužbi s PVYNTN



**Slika 19:** Število točkastih nekroz na 1., 2., 3. inokuliranem listu, 1., 2., 3. neinokuliranem listu, na vršičku pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY<sup>NTN</sup>



**Slika 20:** Število točkastih nekroz na 1., 2., 3. inokuliranem listu, 1., 2., 3. neinokuliranem listu, na vršičku pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG po okužbi s PVY<sup>W</sup>

#### 4.7. Izražanje genov

Z metodo PCR v realnem času smo opazovali količino PVY<sup>W</sup> ter izražanje genov za glukanozo II in PR1 pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG. Gen za citokrom oksidazo (cox) smo uporabili kot referenčni vzdrževalni gen.

V s PVY<sup>W</sup> okuženih rastlinah sorte Rywal in genotipa Rywal NahG je bila koncentracija virusa največja v točkasti nekrozi in je z razdaljo od točkaste nekroze padala. PVY<sup>W</sup> v kontrolnih vzorcih nismo zaznali (Slika 21).

|            | E     | F    | G    | H    |            | E     | F     | G    | H    |
|------------|-------|------|------|------|------------|-------|-------|------|------|
| R-W 1      | 12,40 | 3,70 | 1,88 | x    | RnahG-W 1  | 64,26 | 40,60 | 0,50 | 0,66 |
| R-W 2      | 22,85 | x    | x    | 0,34 | RnahG-W 2  | x     | x     | 6,09 | x    |
| R-W 3      | 41,33 | 1,75 | 2,55 | 2,53 | RnahG-W 3  | x     | x     | 0,79 | 0,77 |
| R-W 4      | 12,77 | x    | x    | x    | RnahG-W 4  | 37,14 | 1,44  | 0,01 | 0,01 |
| R-W 5      | 9,38  | 0,72 | 1,39 | 2,09 | RnahG-W 5  | x     | 5,88  | 0,31 | 1,01 |
| Kontrola 1 |       |      |      | 0,01 | Kontrola 1 |       |       |      | 0,01 |
| Kontrola 2 |       |      |      | 0,01 | Kontrola 2 |       |       |      | 0,01 |
| Kontrola 3 |       |      |      | 0,01 | Kontrola 3 |       |       |      | 0,01 |
| Kontrola 4 |       |      |      | 0,01 | Kontrola 4 |       |       |      | 0,01 |

**Slika 21:** Količina PVY<sup>W</sup> (W in zaporedna številka vzorca) pri sorti Rywal (R) in genotipu Rywal NahG (RnahG) v točkasti nekrozi (E) in treh zaporednih koščkih poleg nje (F, G in H) ter zdravih kontrolah (Kontrola)



Gen za glukanazo II se je pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG okuženih s PVY<sup>W</sup> najbolj izražal v točkasti nekrozi, to je v vzorcu E. V vsakem naslednjem vzorcu je bilo izražanje gena manjše. Pri izražanju gena za glukanazo II je bila opazna razlika med sorto Rywal in genotipom Rywal NahG. Pri sorti Rywal je bilo izražanje gena izrazitejše kot pri genotipu Rywal NahG. Izražanje gena za glukanazo II je bilo v zdravih kontrolah obeh sortah oziroma genotipih manjše kot v s PVY<sup>W</sup> okuženih rastlinah (Slika 22).

|            | E     | F     | G    | H    |            | E    | F    | G    | H    |
|------------|-------|-------|------|------|------------|------|------|------|------|
| R-W 1      | 19,34 | 10,55 | 2,00 | 3,74 | RnahG-W 1  | 0,12 | 0,64 | 0,22 | x    |
| R-W 2      | 19,72 | x     | x    | 3,13 | RnahG-W 2  | x    | x    | 0,01 | x    |
| R-W 3      | 17,13 | 6,93  | 2,68 | 1,81 | RnahG-W 3  | x    | x    | 0,01 | 0,01 |
| R-W 4      | 19,75 | x     | 1,34 | x    | RnahG-W 4  | 1,34 | 0,51 | 0,29 | 0,01 |
| R-W 5      | 4,84  | 1,07  | 0,32 | 0,18 | RnahG-W 5  | x    | 1,03 | 0,47 | 0,17 |
| Kontrola 1 |       |       |      | 0,11 | Kontrola 1 |      |      |      | 0,06 |
| Kontrola 2 |       |       |      | x    | Kontrola 2 |      |      |      | 0,07 |
| Kontrola 3 |       |       |      | x    | Kontrola 3 |      |      |      | 0,01 |
| Kontrola 4 |       |       |      | 0,09 | Kontrola 4 |      |      |      | 0,08 |

**Slika 22:** Izražanje gena za glukanazo II (W in zaporedna številka vzorca) pri sorti Rywal (R) in genotipu Rywal NahG (RnahG) okuženih s PVY<sup>W</sup> v točkasti nekrozi (E) in treh zaporednih koščkih poleg nje (F, G in H) in zdravih kontrolah (Kontrola)

Vzorca izražanja gena PR1b sta se pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG razlikovala. Pri sorti Rywal je bilo izražanje gena za PR1b največje v vzorcih E ali F in najmanjše v vzorcih G in H. Pri genotipu Rywal NahG pa je bilo izražanje največje v vzorcih F ali G, ter manjše v vzorcih E in H. Pri obeh sortah oziroma genotipih je bilo izražanje gena PR1b v zdravih kontrolah manjše kot v okuženih rastlinah (Slika 23).

|            | E    | F    | G    | H    |            | E    | F    | G    | H    |
|------------|------|------|------|------|------------|------|------|------|------|
| R-W 1      | 1,26 | 2,13 | 0,50 | 0,34 | RnahG-W 1  | 0,40 | 2,77 | 5,00 | 2,08 |
| R-W 2      | 2,45 | x    | x    | 1,26 | RnahG-W 2  | x    | x    | 3,40 | x    |
| R-W 3      | x    | 1,35 | 0,61 | 0,35 | RnahG-W 3  | x    | x    | x    | 0,63 |
| R-W 4      | 3,06 | x    | 0,67 | x    | RnahG-W 4  | 4,75 | 5,53 | 1,26 | 0,63 |
| R-W 5      | 5,24 | 5,16 | 1,78 | 0,90 | RnahG-W 5  | x    | 8,20 | 3,71 | 1,84 |
| Kontrola 1 |      |      |      | 0,09 | Kontrola 1 |      |      |      | 0,01 |
| Kontrola 2 |      |      |      | 0,01 | Kontrola 2 |      |      |      | 0,01 |
| Kontrola 3 |      |      |      | 0,01 | Kontrola 3 |      |      |      | 0,01 |
| Kontrola 4 |      |      |      | 0,05 | Kontrola 4 |      |      |      | 0,01 |

**Slika 23:** Izražanje gena za PR1b (W in zaporedna številka vzorca) pri sorti Rywal (R) in genotipu Rywal NahG (RnahG) okuženih s PVY<sup>W</sup> v točkasti nekrozi (E) in treh zaporednih koščkih poleg nje (F, G in H) in zdravih kontrolah (Kontrola)

## 5. RAZPRAVA

### 5.1. Vpliv letnega časa na izražanje bolezenskih znamenj

V vseh treh bioloških ponovitvah so se na rastlinah pokazala zelo ponovljiva bolezenska znamenja. Manjše razlike smo ugotovili v višini rastlin, številu listov in površini listne površine. Razlike so sovpadale z različnimi letnimi časi, kljub enakim pogojem v rastni komori in kljub temu, da so rastline predhodno že več let rastle v tkivni kulturi. Jesenski seriji (1. in 5. biološka ponovitev) sta imeli nižje rastline, z manj listi in manjšo listno površino, medtem ko so bile rastline v pomladanski seriji (6. biološka ponovitev) večje. To kaže na to, da imajo rastline svoj endogeni ritem, ki ga ohranjajo, ne glede na zunanje dejavnike.

Pri sorti Igor so se v 5. biološki ponovitvi bolezenska znamenja pojavila en dan prej kot v 6. biološki ponovitvi. Tudi v predhodnih študijah je bil opazen časovni zamik (1 - 2 dpi) pojavljanja bolezenskih znamenj pri rastlinah iste sorte med različnimi serijami (pomladanska, poletna, jesenska) (Vozelj, 2001). Pri sorti Rywal smo opazili da so v 5. biološki ponovitvi inokulirani listi rumeneli prej (5 dpi pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> in 13 dpi pri intaktnih in slepo inokuliranih rastlinah), kot v 6. biološki ponovitvi, kjer smo rumenenje inokuliranih listov opazili 6 dpi pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> in šele 27 dpi pri intaktnih in slepo inokuliranih rastlinah. Tudi razlike v rumenenju listov so sovpadale z letnimi časi poskusov, pri čemer lahko hitrejšo rumenenje slepo inokuliranih listov pripišemo vplivu jeseni.

### 5.2. Vpliv okuževanja na izražanje bolezenskih znamenj

Do razlik med serijami bi lahko prihajalo tudi zaradi inokuluma, s katerim smo okuževali rastline, ter zaradi načina okuževanja. Tema dvema vplivoma smo se izognili, kolikor je bilo mogoče, tako, da smo za inokulat vedno uporabili enako razmerje med rastlinskim materialom in pufrom, nismo pa imeli vpliva na to, kakšne koncentracije virusa je vseboval izhodni rastlinski material. Pri okuževanju smo pazili, da smo nanašali vedno enako količino inokulata na list, za kar smo uporabljali Pasterjevo pipeto, ter da rastlin nismo preveč poškodovali, ker prevelike poškodbe vodijo v slabšo okužbo. Pri mehanskem okuževanju moramo poškodovati le listne laske, skozi katere nato vstopi virus. Če so poškodbe prevelike, poškodovani deli lista odmrejo hitreje, kot se virus lahko v njih namnoži in razširi po rastlini.

### 5.3. Vpliv sorte na hitrost pojavljanja bolezenskih znamenj

Med sortami in genotipi, ki so različno občutljivi na PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> so bile vidne razlike v obrambnem odgovoru.

Pri sorti Igor so se prva bolezenska znamenja (obročaste kloroze in točkaste nekroze) pokazala 5 oz. 6 dpi po okužbi s PVY<sup>NTN</sup>. Sistemska znamenja okužbe pa so se pokazala med 7 in 13 dpi (rumenenje, odpadanje listov). Podoben odziv rastlin sorte Igor na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> je bil ugotovljen tudi v predhodnih raziskavah (Baebler, 2006). Sorta Igor je bila edina izmed preiskanih sort oziroma genotipov, ki se je na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> odzvala drugače. Kljub razmeroma podobnemu nukleotidnemu zaporedju različkov PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> (oba sta nastala z rekombinacijo iz

različkov PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>O</sup>), sorta Igor pri okužbi s PVY<sup>W</sup> ni kazala nobenih bolezenskih znamenj.

Sorta Desiree ni kazala bolezenskih znamenj pri izbranih različnih virusa, medtem ko so bila pri genotipu Desiree NahG bolezenska znamenja prisotna. Pri okužbi s PVY<sup>NTN</sup> so se prva bolezenska znamenja pokazala 5 oz 6 dpi. Podobna bolezenska znamenja je bilo opaziti tudi v drugih poskusih (Prezelj, 2008).

Pri sorti Rywal smo opazili prva bolezenska znamenja (točkaste nekroze) 5 oz 6 dpi tako pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> kot s PVY<sup>W</sup>. Od 7 oz. 9 dpi smo opazili sistemske znake okužbe (rumenenje in sušenje listov). Pri rastlinah sorte Rywal okuženih s PVY<sup>W</sup> in PVY<sup>NTN</sup> so opazili podobna bolezenska znamenja (Witek, 2010).

Prva bolezenska znamenja so bila pri genotipu Rywal NahG opazna 6 dpi tako pri rastlinah okuženih s PVY<sup>NTN</sup> kot s PVY<sup>W</sup>, kasneje smo opazili odpadanje inokuliranih listov.

#### **5.4. Vpliv sorte na velikost in obliko točkastih nekroz**

Med vsemi preiskanimi sortami in genotipi smo opazili razlike v velikosti, obliki in številu točkastih nekroz. Opazili smo tudi, da so bile točkaste nekroze pri genotipu Rywal NahG večje kot pri sorti Rywal. Predhodne raziskave genotipa Rywal NahG okuženega s PVY<sup>W</sup> so pokazale, da so se prvi bolezenska znamenja (točkaste nekroze na inokuliranih listih) pokazali 6 dpi, nadalje so opazili, da so se točkaste nekroze večale, ter dosegle največjo velikost pri 10 dpi in so bile v primerjavi z točkastimi nekrozami pri sorti Rywal približno 2x večje (Witek, 2010).

Sorta Rywal je imela najmanjše točkaste nekroze od vseh preiskanih sort in genotipov, kar bi lahko kazalo na hitrejšo reakcijo oziroma na hitrejši in s tem učinkovitejši odgovor rastlin na okužbo z virusom, saj je bila sorta Rywal med preiskovanimi sortami oziroma genotipi edina odporna sorta, ki s točkastimi nekrozami ustavi širjenje virusa po rastlini. Pri ostalih preiskovanih sortah in genotipih se kljub pojavu točkastih nekroz virus sistemsko razširi po rastlini.

Največje točkaste nekroze smo izmerili pri genotipu Desiree NahG. Pri genotipih Desiree NahG in Rywal NahG so primarna bolezenska znamenja in sistemska znamenja okužbe močnejša in bolj izrazita kot pri sortah Desiree in Rywal. Razlika med temi sortami oziroma genotipi je v tem, da genotipi NahG ne morejo akumulirati salicilne kisline. Iz tega lahko sklepamo, da ima salicilna kislina pomembno vlogo pri obrambnem odgovoru krompirja proti PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup>. Prav tako je bilo dokazano, da je večja občutljivost rastlin NahG posledica pomanjkanja salicilne kisline in ne akumulacije katehola (Halim, 2007; Witek, 2010).

#### **5.5. Vpliv okužbe na izražanje genov**

Pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG smo po okužbi s PVY<sup>W</sup> opazovali tudi izražanje genov krompirja in količino virusne RNA. Koncentracija virusne RNA PVY<sup>W</sup> je bila največja v vzorcih, ki so vsebovali točkasto nekrozo. Podobno so ugotovili pri okužbi krompirja s PVY<sup>NTN</sup>, kjer je bila večja koncentracija virusa v listih s točkastimi nekrozami kot v listih brez bolezenskih znamenj (Kogovšek, 2010).

Najvišjo koncentracijo virusa v točkasti nekrozi smo opazili tako pri sorti Rywal, ki je odporna sorta, kot pri genotipu Rywal NahG, ki je dovzeten. Sklepamo lahko, da točkaste nekroze, ne glede na občutljivost sorte oziroma genotipa predstavljajo aktiven odgovor rastline na okužbo.

Tudi izražanje gena za glukanozo II je bilo največje v vzorcih, ki so vsebovali točkasto nekrozo. Vzorec izražanja gena za glukanozo II je bil enak pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG, medtem ko je bilo izražanje glukanoze II mnogo izrazitejše pri sorti Rywal kot pri vzorcih genotipa Rywal NahG. Ugotovljeno je bilo, da izražanje genov za glukanozo vpliva na količino kaloze, ki ima neposredno vlogo pri omejevanju širjenja virusa po rastlini (Iglesias in Meins, 2000). Podobno je bilo ugotovljeno pri sorti Igor okuženi s PVY<sup>NTN</sup> (Baebler, 2006).

Izražanje gena za Pr1b pa je imelo pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG podobno intenziteto, vendar drugačen vzorec izražanja. Pri sorti Rywal je bilo izražanje največje v vzorcu, ki je vseboval točkasto nekrozo, ter se je manjšalo z oddaljevanjem od točkaste nekroze. Pri genotipu Rywal NahG pa je bilo izražanje tega gena največje v vzorcih poleg točkaste nekroze. To lahko kaže, da pri sorti Rywal obrambni proces poteka v sami točkasti nekrozi in ustavi širjenje virusa, medtem ko se pri genotipu Rywal NahG virus uspe razširiti, kar lahko vpliva tudi na prostorsko razporeditev metabolnih procesov. Witek (2010) je ugotovil, da je salicilna kislina nujna za vzdrževanje visoke ravni transkripcije genov PR. Ker rastline NahG ne morejo akumulirati salicilne kisline, je izražanje gena PR1b pri genotipu Rywal NahG različno kot pri sorti Rywal.

## 6. ZAKLJUČKI

Opazovali smo odziv rastlin sort in genotipov na dva različna krompirjevega virusa, PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup>.

Opazovanje odgovora rastlin v času je pokazalo, da se sorte oziroma genotipi različno odzivajo na okužbo s PVY. Sorta Igor je bila edina od preiskovanih sort oziroma genotipov, ki je drugače odgovorila na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup>. Na PVY<sup>NTN</sup> je bila zelo občutljiva. Na inokuliranih listih je poleg točkastih nekroz edina imela tudi obročkaste kloroze, bolezenska znamenja pa so bila vidna tudi na neinokuliranih listih. Po okužbi s PVY<sup>W</sup> pa sorta Igor ni kazala nobenih bolezenskih znamenj.

Pri sorti Desiree nismo zaznali nobenih bolezenskih znamenj, medtem ko so se pri genotipu Desiree NahG okužbi s PVY<sup>NTN</sup> in PVY<sup>W</sup> na inokuliranih listih pojavile točkaste nekroze.

Točkaste nekroze so se pri različnih sortah in genotipih razlikovale po obliki in velikosti. Pri sorti Igor so bile točkaste nekroze okrogle, pri genotipu Desiree NahG okrogle ali vretenaste ter pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG pa zvezdaste. Točkaste nekroze so bile največje pri genotipu Desiree NahG, po velikosti so sledile točkaste nekroze pri sorti Igor, manjše pa so bile točkaste nekroze pri genotipu Rywal NahG in najmanjše pri sorti Rywal.

Med sortami oziroma genotipi se je razlikovalo tudi število točkastih nekroz na list. Največ točkastih nekroz na list je bilo pri sorti Rywal, po številčnosti so sledile točkaste nekroze pri genotipu Rywal NahG. Manj točkastih nekroz je bilo pri genotipu Desiree NahG, najmanj pa pri sorti Igor.

Pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG smo poleg bolezenskih znamenj, opazovali tudi prostorsko izražanje genov za glukanazo II in PR1b po okužbi s PVY<sup>W</sup>, ter količino virusa. Količina virusa je bila največja v točkasti nekrozi, ter se je z razdaljo od točkaste nekroze zmanjševala.

Podobno izražanje kot pri virusu smo opazili tudi pri izražanju gena za glukanazo II, ki je bil v točkasti nekrozi najmočneje izražen, njegovo izražanje se je od točkaste nekroze dalje zmanjševalo. Pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG je bil vzorec izražanja gena za glukanazo II podoben, s tem da je bilo izražanje tega gena pri sorti Rywal močnejše kot pri Genotipu Rywal NahG. izražanje gena za PR1b pa je imelo pri sorti Rywal in genotipu Rywal NahG podobno intenziteto, vendar pa drugačen vzorec izražanja. Pri sorti Rywal se je gen PR1b najmočneje izražal v točkasti nekrozi, pri genotipu Rywal NahG pa v koščku poleg točkaste nekroze.

Različna dovzetnost sorte Rywal in genotipa Rywal NahG na okužbo s PVY<sup>W</sup> se odraža tudi v izražanju genov za glukanazo II in PR1b.

## 7. VIRI

Agrios G.N. 1997. Plant pathology 4<sup>th</sup> edition. London, Academic Press: 479-518

Arends P., Kus M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj, Merkator-KŽK Kmetijstvo Kranj

Baebler Š., 2006. Izražanje genov pri občutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okužbo s krompirjevim virusom Y<sup>NTN</sup>. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Baebler Š., Krečič-Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., Kok E.J., Gruden K., Kovač M., Žel J., Pompe-Novak M., Ravnikar M. 2009. PVY<sup>NTN</sup> elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology*, 10, 2: 263–275

Baebler Š., Stare K., Kovač M., Blejec A., Prezelj N., Stare T., Kogovšek P., Pompe-Novak M., Rosahl S., Ravnikar M., Gruden K. 2011. Dynamics of responses in compatible potato - Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid.

Beffa, M. and Meins, F. Jr. 1996. Pathogenesis-related functions of plant beta -1,3 glucanases investigated by antisense transformation. *Gene*, 179: 97-103

Benhamou N. 1999. Elicitor – induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 1,7: 233 – 239

Birch P.R.J., Kamoun S. 2000. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. *Trends in Plant Science*, Supplement: Life Science Research in the 21st Century: a Trends Guide: 77–82

Brunner A.M., Yakovlev I.A., Strauss S.H. 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*, 4, 14

Buckhout T.J., Thimm O. 2003. Insights into metabolism obtained from microarray analysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 3: 288–296

Carrington J.C., Kasschau K.D., Mahajan S.K., Schaad M.C. 1996. Cell-to-Cell and Long- Distance Transport of Viruses in Plants. *The Plant Cell*, 8, 1669–1681

Cervantes F.A., Alvarez J.M. 2011. Within plant distribution of Potato Virus Y in hairy nightshade (*Solanum sarrachoides*): An inoculum source affecting PVY aphid transmission. *Virus Res* 159:194-200

Coker J.S., Davies E. 2003. Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *Biotechniques*, 35, 4: 740–748

Davis P.J. 2004. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action. Dordrecht. Kluwer Academics Publishers: 610-653

Feys B.J., Parker J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, 16: 449–445

- Gachon C., Mingam A., Charrier B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55, 402: 1445–1454
- Gruden K., Štrukelj B., Ravnikar M., Herzog-Velikonja B. 2000. A putative virial resistance-connected protein isolated from potato cultivar Santé resistant to PVY<sup>NTN</sup> infection. *Phyton*, 40: 191–200
- Halim V.A., Vess A., Scheel D., Rosahl S. 2007. The Role of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Pathogene Defence
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773–1791
- Herbers K., Takahata Y., Melzer M., Mock H.P., Hajirezaei M., Sonnewald U. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 1, 1: 51–59
- Hinrich J., Berger S., Shaw J.G. 1998. A hypersensitive response – like mechanism is involved in resistance of potato plants bearing the Ry<sub>sto</sub> gene to the potyviruses potato virus Y and tobacco etch virus. *Journal of General Virology*, 79: 167 – 176
- Hinrich-Berger J., Harford M., Berger S., Buchenauer H. 1999. Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:143-150
- Invitrogen. 2012. Real Time PCR Handbook 2<sup>nd</sup> edition. Life Technologies Corporation  
Dostopno na:  
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-handbook.html> (januar 2013)
- Keefe D., Hinz U., Meins F. 1990. The effect of ethylene on the cell – type - specific and intercellular localization of the  $\beta$  - 1,3 - glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta*, 182: 43–51.
- Kim B.R., Nam H.Y., Kim S.U., Kim S.I., Chang Y.J. 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, 25, 21: 1869–1872
- Kogovšek P. 2010. Razlike v izražanju genov krompirja po okužbi s krompirjevim virusom Y<sup>N</sup> in njegovim nekrotičnim različkom Y<sup>NTN</sup>. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
- Krečič-Stres H., Vučak C., Ravnikar M., Kovač M. 2005. Systemic Potato virus Y<sup>NTN</sup> infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes. *Plant Pathology*, 54, 4: 441–447
- Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas
- Li W., Hartung J. S., Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 104–115

- Linthorst H., Melchers M., Mayer A., van Roekel J., Cornelissen B., Bol J. 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic  $\beta$ -1,3-glucanases of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 87: 8756 – 8760.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods*, 25, 4: 402–408
- Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Tallozy Z., Levine B., Dinesh-Kumar S.P. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121, 4: 567–577
- Maule A., Leh V., Lederer C. 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 4: 279–284
- Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Novak Pompe M., Baebler Š., Stres Krečič H., Gruden K., Ravnikar M. 2004. Spread of potato virus Y<sup>NTN</sup> in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 6: 293–300
- Milavec M., Gruden K., Ravnikar M., Kovač M. 2008. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by Potato virus Y<sup>NTN</sup>. *Plant Pathology*, 57, 5: 861–869
- Mosolov V.V., Valueva T.A. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 3: 227 – 246
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497
- Mysore K.S., Ryu C-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 10: 1360–1385
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 421: 2907–2914
- Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1, 3: 1559-1582
- Payne G., Ward E., Gaffney T., Goy P. A., Moyer M., Harper A., Meins F. Jr, Ryals J. 1990. Evidence for a third structural class of basic  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 15: 797 – 808.
- Pfaffl M.V. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002–2007
- Piche L.M., Singh R.P., Nie X., Gudmestad N.C. 2004. Diversity Among Potato virus Y Isolates Obtained from Potatoes Grown in the United States. *Phytopathology*, 94, 12: 1368 –1375
- Pompe Novak M. 2002. Razlike v izražanju genov med zdravimi in s krompirjevim virusom Y<sup>NTN</sup> okuženimi rastlinami krompirja (*Solanum tuberosum* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije



Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 3–5: 237–247

Prezelj N. 2008. Vpliv obrambnih mehanizmov krompirja na razmnoževanje in širjenje virusa PVY<sup>NTN</sup> po rastlini. Diplomski naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Reymond P., Farmer E.E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 404–411

Rushton P.J., Somssich I.E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 311–315

Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. 2012. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 12:938-954

Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones R.A.C., Kerlan C., Schubert J. 2008. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. *Archives of virology*, 153, 1–13

Sommsich I.E., Hahlbrock K. 1998. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3, 3: 86–90

Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. 2005. Mechanisms of Plant Resistance to Viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 10: 789-798

Talarczyk A., Hennig J. 2001. Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 6, 4: 955–970.

Toplak N., Okršlar V., Stanič-Racman D., Gruden K., Žel J. 2004. A high throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants using real-time PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 237–250

Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001 Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74: 157–175

Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 29: 151-159

van Eldik G.J., Wingers M., Ruiters R.K., Van Herpen M.M., Schrauwen J.A., Willems G.J. 1996. Molecular analysis of a pistil-specific gene expressed in the stigma and cortex of *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.*, 30: 171–176.

van Loon L.C., van Stiren E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 2: 85–97

Vozelj N. 2001. Širjenje krompirjevega virusa Y<sup>NTN</sup> v različnih, za virus dovzetnih sortah krompirja (*Solanum tuberosum* L.). Diplomski naloga. Ljubljana, BF, Oddelek za biologijo

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9, 5: 244–252

Ward E.R., Payne G.B., Moyer M.B., Williams S.C., Dincher S.S., Sharkey K.C., Beck J.J., Taylor H.T., Ahl-Goy P., Meins F.M., Ryals J.A. 1991. Differential regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 15: 797–808.

Witek K. 2010. Analysis of *Solanum tuberosum* response to *Potato virus Y* infection. PhD Thesis. Warsaw, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences

## Priloga A

Statistično značilna razlika ( \* p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001) v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> in slepo inokuliranimi rastlinami pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG

| sorta ali genotip | čas    | brez bolezenskih znamenj | listi z obročkastimi klorozami | listi s točkastimi nekrozami | rumenenje | sušenje | odpadel list |
|-------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|---------|--------------|
| Igor              | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  | *                        |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          | *                              | **                           |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          | *                              | **                           |           |         |              |
|                   | 12 dpi | ***                      |                                | *                            |           |         | ***          |
|                   | 22 dpi | **                       |                                |                              |           |         | *            |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Desiree           | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                |                              | ***       |         | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Desiree NahG      | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  | *                        |                                | *                            |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                | ***                          | *         |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                | ***                          | *         |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                | ***                          | *         |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                | ***                          | *         |         | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              | **        |         | **           |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Rywal             | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                | ***                          |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                | ***                          | **        |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                | ***                          | **        |         |              |

| sorta ali genotip | čas    | brez bolezenskih znamenj | listi z obročkastimi klorozami | listi s točkastimi nekrozami | rumenenje | sušenje | odpadel list |
|-------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|---------|--------------|
|                   | 9 dpi  |                          |                                | ***                          | **        |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                | ***                          |           |         | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Rywal NahG        | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  | ***                      |                                | ***                          |           |         |              |
|                   | 6 dpi  | ***                      |                                | ***                          |           |         |              |
|                   | 7 dpi  | ***                      |                                | ***                          |           |         |              |
|                   | 9 dpi  | ***                      |                                | ***                          |           |         |              |
|                   | 12 dpi | ***                      |                                | ***                          |           |         |              |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              | **        | *       | ***          |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              | ***       | *       | ***          |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           | **      | ***          |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           | **      | ***          |

## Priloga B

Statistično značilna razlika ( \* p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001) v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami okuženimi s PVY<sup>W</sup> in slepo inokuliranimi rastlinami pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG

| sorta ali genotip | čas    | brez bolezenskih znamenj | listi z obročkastimi klorozami | listi s točkastimi nekrozami | rumenenje | sušenje | odpadel list |
|-------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|---------|--------------|
| Igor              | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              | **        |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Desiree           | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Desiree NahG      | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                | ***                          | *         |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                | ***                          | *         |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                | ***                          | *         |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                | ***                          | *         |         | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              | **        |         | **           |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Rywal             | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                | ***                          | ***       | **      |              |

| sorta ali genotip | čas    | brez bolezenskih znamenj | listi z obročkastimi klorozami | listi s točkastimi nekrozami | rumenenje | sušenje | odpadel list |
|-------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|---------|--------------|
|                   | 9 dpi  |                          |                                | ***                          | ***       | **      |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                | ***                          |           |         | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Rywal NahG        | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  | ***                      |                                | ***                          |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                |                              |           | *       | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              | **        | *       | ***          |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           | *       | ***          |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         | ***          |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         | ***          |

## Priloga C

Statistično značilna razlika ( \* p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001) v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> in s PVY<sup>W</sup> okuženimi rastlinami pri sortah Igor, Desiree in Rywal ter genotipih Desiree NahG in Rywal NahG

| sorta ali genotip | čas    | brez bolezenskih znamenj | listi z obročkastimi klorozami | listi s točkastimi nekrozami | rumenenje | sušenje | odpadel list |
|-------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|---------|--------------|
| Igor              | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  | *                        |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  | ***                      | *                              | **                           |           |         |              |
|                   | 9 dpi  | ***                      | *                              | **                           |           |         |              |
|                   | 12 dpi | ***                      |                                |                              |           |         | ***          |
|                   | 22 dpi | *                        |                                |                              | **        |         | ***          |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Desiree           | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                |                              | ***       |         | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Desiree NahG      | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  | *                        |                                | *                            |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Rywal             | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              | **        |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           | **      |              |

| sorta ali genotip | čas    | brez bolezenskih znamenj | listi z obročkastimi klorozami | listi s točkastimi nekrozami | rumenenje | sušenje | odpadel list |
|-------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|---------|--------------|
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           | **      |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
| Rywal NahG        | 0 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 5 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 6 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 7 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 9 dpi  |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 12 dpi |                          |                                | ***                          |           |         | ***          |
|                   | 22 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 27 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 35 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |
|                   | 48 dpi |                          |                                |                              |           |         |              |