

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**ANALIZA PRISOTNOSTI RNA, PLAŠČNEGA PROTEINA IN
VIRUSNIH DELCEV KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y V
OKUŽENIH RASTLINAH TOBAKA TER RAZMERJA MED
NJIMI**

DIPLOMSKO DELO

Katja Koblar

Mentor: doc. dr. Maruša Pompe Novak

Nova Gorica, 2013

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat mojega 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.

Katja Koblar

ZAHVALA

Diplomsko delo je bilo večinoma opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) v Ljubljani. Del raziskav je potekal na francoskem Nacionalnem inštitutu za agronomske raziskave (INRA) v Rennesu.

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Maruši Pompe Novak za vse nasvete, znanje in izkušnje ter vodenje pri nastajanju diplomske naloge. Zahvala gre tudi dr. Magdi Tušek Žnidarič in Matevžu Ruparju za ves trud in pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Zahvala tudi moji družini, fantu Alenu in prijateljem.

Hvala članom komisije za pregled diplomskega dela.

POVZETEK

Krompirjev virus Y (*Potato virus Y*, PVY) spada v rod *Potyvirus* in družino *Potyviridae*, ki je največja družina rastlinskih virusov. PVY je peti najpomembnejši rastlinski virus in najpomembnejši krompirjev virus z vidika znanstvene in ekonomske pomembnosti ter je razširjen po celem svetu. PVY povzroča veliko škodo na različnih poljščinah. Prenaša se z listnimi ušmi. Listne uši s sesanjem rastlinskega soka tako okuženih kot zdravih rastlin prenesejo virusne delce na zdravo rastlino. Za uspešen prenos virusa s prenašalci je potrebna zadostna količina virusa v rastlini. Trenutno najpogosteje uporabljeni metodi za določanje količine PVY v rastlinskem materialu sta test ELISA in PCR v realnem času (qPCR). Ti dve metodi nam podata informaciji o količini plaščnega proteina oz. virusne RNA, za prenos z listnimi ušmi pa je pomembno število virusnih delcev, ki pa jih lahko preštejemo s pomočjo elektronskega mikroskopa. V primeru poznavanja razmerja med količino virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev lahko iz količine virusne RNA ali plaščnega proteina sklepamo na količino virusnih delcev. Pri izoliranem virusu je večina virusne RNA in večina plaščnih proteinov vključena v virusni delec. V okuženih rastlinah pa so poleg virusnih delcev tudi prosti plaščni proteini in prosta virusna RNA. V okviru diplomske naloge smo primerjali razmerje med količino virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev v okuženih rastlinah in izoliranem PVY. z uporabo metod qPCR, ELISA in EM. V ta namen smo pripravili redčitve virusa, v katerih smo imeli znane relativne količine izoliranega virusa PVY^o. Poleg tega smo pripravili tudi s PVY^o okužene rastline, pri katerih smo pobirali različne liste v različnih časih po inokulaciji, da so vsebovali različne količine virusa. Rezultati vseh treh metod so pokazali visok korelacijski koeficient med količino virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev tako pri redčitveni vrsti iz izoliranega virusa, kot tudi pri vzorcih okuženih rastlin. Ugotovili smo, da je bilo razmerje med količino virusne RNA in virusnih delcev 4.000-krat višje v vzorcih okuženih rastlin v primerjavi z izoliranim virusom.

Ključne besede: krompirjev virus Y, PVY^o, plaščni protein, virusni delec, virusna RNA, razmerje.

SUMMARY

Potato virus Y (PVY) is classified to the genus *Potyvirus* of the family *Potyviridae*. Family *Potyviridae* is the largest family of plant viruses. PVY is the fifth most important plant virus and most important potato virus in terms of scientific and economic importance and is widely spread around the world. PVY causes a lot of damage to various crops. The virus is most commonly transmitted by aphids. With sucking infected and after that healthy plant's juice viral particles are transferred to the next plant. For the successful transmission of the virus by vectors a sufficient quantity of the virus in the plant is needed. Currently, the most commonly used methods for the determination of the quantity of PVY in plant material are ELISA and real-time PCR. These methods give us the information about the quantity of coat protein and viral RNA, while for the transmission with aphids there have to be virus particles. The number of virus particles can be obtained by electron microscope. In the case of known ratio between the quantity of viral RNA or the coat protein and the viral particles, the amount of virus particles could be estimated from the quantity of viral RNA or coat protein. In the isolated virus the majority of viral RNA and coat protein are integrated in viral particles, while in infected plants, there are in addition to the virus particles also free coat proteins and free viral RNA. In the frame of diploma thesis we compared the ratios between the amounts of viral RNA, coat protein and viral particles in infected plants, compared to isolated PVY. Therefore we prepared a series of dilutions with known relative amounts of isolated PVY^o. Besides, we prepared also PVY^o infected plants, from which we collected different leaves at different times after inoculation to obtain leaves containing various amounts of virus. Samples were analysed by ELISA, qPCR, and electron microscope. The results showed a high correlation between the amount of viral RNA, coat protein and viral particles in the serial dilutions of isolated virus, as well as in samples of the infected plants. The ratio between the quantity of viral RNA and viral particles was 4.000 times higher in the samples of the infected plants, compared to the isolated virus.





Key words: Potato virus Y, PVY^o, coat protein, viral particle, viral RNA, ratio.

KAZALO VSEBINE

UVOD	1
1.1 Cilji	1
1.2 Hipoteze	1
2 TEORETIČNE OSNOVE	2
2.1 Krompirjev virus Y (<i>Potato virus Y</i>, PVY)	2
2.1.1 Organizacija genoma PVY in virusni proteini	3
2.1.2 Različki virusa PVY in bolezenska znamenja	4
2.1.3 Prenos virusa PVY.....	6
2.1.4 Širjenje PVY v rastlinah	7
2.2 Metode za določanje količine PVY v rastlinskem tkivu	8
2.2.1 Test ELISA	8
2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo	9
2.2.3 Elektronska mikroskopija	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Priprava raztopin	14
3.2 Analiza izoliranega PVY^o	15
3.2.1 Priprava rastlinskega materiala.....	16
3.2.2 Priprava redčin virusa	16
3.2.3 Priprava homogenata	17
3.3 Analiza s PVY^o okuženih rastlin	17
3.3.1 Priprava rastlinskega materiala.....	18
3.3.2 Mehanska inokulacija rastlin	18
3.3.3 Vzgoja uši.....	18
3.3.4 Prenos virusov z listnimi ušmi.....	19
3.3.5 Priprava homogenata	20
3.4 Test ELISA	20
3.5 RT-qPCR v enem koraku	21
3.5.1 Izolacija virusne RNA.....	21
3.5.2 Oligonukleotidi začetniki	21
3.5.3 Obratno prepisovanje (RT) in qPCR v enem koraku	22
3.5.4 Obdelava podatkov qPCR	23
3.6 Elektronska mikroskopija	23
3.7 Analiza podatkov	23
4 REZULTATI	25
4.1 Analiza izoliranega PVY^o	25
4.2 Analiza količine virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev v s PVY^o okuženih rastlinah tobaka	28
4.3 Razmerje med virusno RNA, plaščnim proteinom in virusnimi delci v s PVY^o okuženih rastlinah	31
4.4 Primerjava razmerja med virusno RNA in virusnimi delci v s PVY^o okuženih rastlinah in izoliranem PVY^o	33
5 RAZPRAVA	35
5.1 Analiza izoliranega PVY^o	35
5.2 Analiza količine virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev v s PVY^o okuženih rastlinah tobaka	36

5.3	Razmerje med virusno RNA, plaščnim proteinom in virusnimi delci pri rastlinah, ki služijo kot vir PVY pri prenosu virusa z listnimi ušmi.....	36
5.4	Primerjava razmerja med virusno RNA in virusnimi delci v s PVY ^o okuženih rastlinah in izoliranem PVY ^o	37
6	ZAKLJUČKI	38
7	VIRI	39

SEZNAM SLIK

Slika 1: Virusni delec PVY, posnet s presevnim elektronskim mikroskopom (foto: Katja Koblar).....	3
Slika 2: Organizacija genoma PVY (Urcuqui - Inchima in sod., 2001).....	3
Slika 3: Primarna znamenja okužbe (foto: Polona Kogovšek).....	6
Slika 4: Obročasta nekroza gomoljev (foto: Polona Kogovšek).....	6
Slika 5: Shematski prikaz testa ELISA.  – protitelo,  – virus,  – encim,  – substrat.....	9
Slika 6: Prikaz krivulje fluorescence (ΔRn) v odvisnosti od števila ciklov pri qPCR. Cq predstavlja število ciklov, potrebnih za dvig fluorescence nad prazno vrednostjo (Mackay, 2004).....	11
Slika 7: Shema analize izoliranega PVY ^o . Uporabili smo 21 virusnih redčin, katerim smo dodali rastlinski material. R1 – 1. redčina virusa, R21 – 21. redčina virusa, starejši list – disk iz velikega spodnjega starejšega lista 10 tednov stare rastline, mlajši listi – disk iz manjšega zgornjega mlajšega lista 10 tednov stare rastline, mladi listi – disk iz mladega lista 4 tedne stare rastline.	16
Slika 8: Shema analize s PVY ^o okuženih rastlin. Na štirih listih vsake rastline (različno dni po okužbi) so se hranile listne uši. Po hranjenju smo listne uši prenesli na zdrave rastline tobaka, na mestu hranjenja pa izrezali iz lista disk, v katerem smo analizirali količino virusnih delcev, virusnih plaščnih proteinov in virusne RNA. dpi - dni po okužbi.	17
Slika 9: Pobiranje listov tobaka z listnimi ušmi v času izvajanja poskusa (foto: Katja Koblar).....	18
Slika 10: Listne uši različnih velikosti na listu tobaka (foto: Katja Koblar).....	18
Slika 11: Listne uši v mikrocentrifugirkah (foto: Katja Koblar).	19
Slika 12: Shematski prikaz večje rastline tobaka v času izvajanja mehanske inokulacije.	19
Slika 13: Shematski prikaz manjše rastline tobaka v času izvajanja mehanske inokulacije.....	19
Slika 14: Prenos listnih uši iz mikrocentrifugirke na liste tobaka (foto: Matevž Rupar).20	
Slika 15: Kletka za listne uši (foto: Katja Koblar).....	20
Slika 16: Količina RNA izmerjena s qPCR pri različnih redčitvah PVY. Prikazana je dCq med amplikonoma PVY ^o in COX. 0, –1, – 2, – 3, – 4 predstavlja redčenje 2 ⁰ , 2 ⁻¹ , 2 ⁻² , 2 ⁻³ , 2 ⁻⁴	26
Slika 17: Število virusnih delcev določenih z EM pri različnih redčitvah PVY ^o . 0, –1, – 2, –3, –4, –5, –6, –7, predstavlja redčenje 2 ⁰ , 2 ⁻¹ , 2 ⁻² , 2 ⁻³ , 2 ⁻⁴ , 2 ⁻⁵ , 2 ⁻⁶ , 2 ⁻⁷	27
Slika 18: Količina virusne RNA v različnih listih v različnem času po okužbi (dpi), zmerjena s qPCR. N.d – ni virusne RNA.....	28

Slika 19: Količina plaščnega proteina v različnih listih v različnem času po okužbi (dpi), zmerjena s testom ELISA. OD – optična gostota (optical density).....	29
Slika 20: Število virusnih delcev v različnih listih v različnem času po okužbi (dpi), preštetu z EM. N. p. - ni podatka, n. d. - ni virusnih delcev.....	29
Slika 21: Število okuženih rastlin po prenosu virusa z listnimi ušmi, ki so se hranile na različnih listih v različnem času po okužbi (dpi).....	30
Slika 22: Razmerje med količino virusne RNA in številom virusnih delcev. Prikazane so \log_2 vrednosti števila virusnih delcev in razlika med vrednostma Cq za amplikona PVYO in COX.....	31
Slika 23: Razmerje med količino virusne RNA (razlika med vrednostmi Cq za amplikona PVYO in COX) in količino virusnega plaščnega proteina.	32
Slika 24: Razmerje med količino plaščnega proteina in številom virusnih delcev. Prikazane so \log_2 vrednosti števila virusnih delcev.	33
Slika 25: Razmerje med virusno RNA in virusnimi delci v okuženih rastlinah in izoliranem PVY ^o . Prikazana je dCq med amplikonoma PVY ^o in COX za izoliran PVY ^o , in dCq za amplikon PVYO in COX pri okuženih rastlinah.....	34

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 mehanizma prenašanja povzročiteljev bolezni s prenašalci med rastlinami. Pri tem je pomembno tudi poznavanje količine povzročitelja bolezni, ki je potrebna za uspešen prenos s prenašalci. Trenutno najpogosteje uporabljeni metodi za določanje količine krompirjevega virusa Y (*Potato virus Y*, PVY) v rastlinskem materialu sta test ELISA in PCR v realnem času (qPCR), ki nam data informaciji o količini plaščnega proteina oz. virusne RNA, ne povesta pa nam količine virusnih delcev. Znano pa je, da so za prenos z ušmi potrebni virusni delci.

1.1 Cilji

V okviru diplomskega dela bomo vpeljali postopek za določanje razmerja med količino virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev ter določili omenjeno razmerje pri s PVY^o okuženih rastlinah v primerjavi z izoliranim PVY^o.

1.2 Hipoteze

Pričakujemo, da bo razmerje med količino virusne RNA oz. plaščnega proteina in številom virusnih delcev v okuženem rastlinskem tkivu večje kot pri izoliranem virusu.

2 TEORETIČNE OSNOVE

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) spada v družino *Solanaceae*. V to družino med drugim sodijo še paradižnik, tobak in paprika. Krompir poleg riža, koruze in žita spada med najpomembnejše poljščine. Iz Južne Amerike so ga v Evropo v 16. stoletju prinesli Španci. V 18. stoletju so ga Angleži in Irci začeli uporabljati kot živilo (Arends in Kus, 1999). V zadnjih desetletjih se proizvodnja krompirja povečuje, pridelek pa zmanjšujejo številni povzročitelji bolezni in razni škodljivci (Acosta in sod, 1999). Za zmanjšanje števila povzročiteljev bolezni in škodljivcev se uporablja kemično tretiranje, izogibanje virom okužbe ali vzgajanje odpornih sort (Hull, 1990). Uporaba fitofarmaceutskih sredstev predstavlja negativen vpliv na okolje, virom okužbe se je težko izogniti, zato je vzgajanje odpornih sort najučinkovitejši način. Pri vzgajanju odpornih sort je zelo pomembno poznavanje mehanizma prenašanja povzročiteljev bolezni s prenašalci med rastlinami. Krompir se razmnožuje vegetativno, kar pomeni, da se preko sajenja okuženega rastlinskega materiala okuženost z virusi prenaša iz generacije v generacijo, zato virusi predstavljajo kmetovalcem velik problem (Glais in sod., 2005). Za upad količine in kvalitete pridelka je najbolj odgovoren zelo razširjen krompirjev virus Y (*Potato virus Y*, PVY), odkrit leta 1931 (Brunt in sod, 1996). Različne sorte krompirja so na PVY različno občutljive. Nekatere sorte, kot na primer sorta Igor, so zelo občutljive za okužbo s PVY^{NTN} in kažejo močna bolezenska znamenja na nadzemnih delih rastlin in na gomoljih. Druge sorte, na primer sorta Desirée, so nekoliko manj občutljive, po okužbi se pri njih s PVY^{NTN} pojavijo bolezenska znamenja na nadzemnih delih rastlin in na manjšem številu gomoljev (Kus, 1994). Nekatere sorte, na primer sorta Pentland Squire, so tolerantne na PVY^{NTN}, kar pomeni, da se PVY v njih namnoži in širi, vendar rastline skoraj ne kažejo bolezenskih znamenj. Obstajajo tudi odporne sorte, v katerih se s PVY^{NTN} ne more razširiti po rastlini, kot na primer sorta Rywal, ki se na okužbo odzove s preobčutljivostno reakcijo (HR, hypersensitive reaction), in sorta Sante, ki je ekstremno odporna (ER, extreme resistance) (Hinrichs - Berger in sod., 1999).

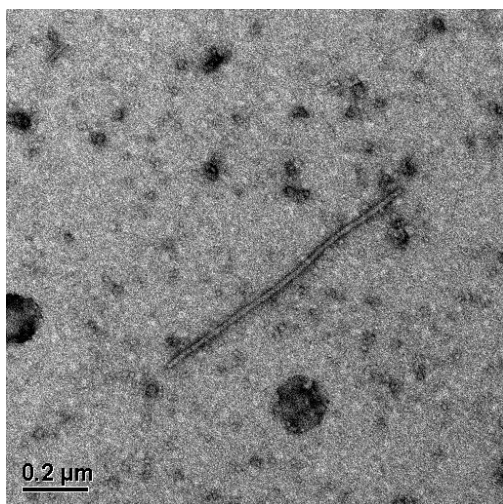
2.1 Krompirjev virus Y (*Potato virus Y*, PVY)

PVY spada v rod *Potyvirus* in družino *Potyviridae*. Družina *Potyviridae* je največja družina rastlinskih virusov ter povzroča veliko škodo na različnih poljščinah. Poleg krompirja okužuje tudi druge rastline iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*). To so paradižnik (*Solanum lycopersicum*), paprika (*Capsicum annuum*) in tobak (*Nicotina tabacum*). Lahko pa prizadene tudi vrste družin ščitnic (*Amaranthaceae*), lobodovke (*Chenopodiaceae*), metuljnice (*Fabaceae*) in nebinovke (*Asteraceae*). PVY je peti najpomembnejši rastlinski virus in najpomembnejši krompirjev virus z vidika znanstvene in ekonomske pomembnosti in je razširjen po celem svetu (de Bokx in Huttinga, 1981; Kus, 1994; Valkonen, 1997). PVY se razmnožuje v živih celicah, kjer izzove pomnoževanje virusne nukleinske kisline in nastanek virusnih beljakovin. Virusna nukleinska kislina načeloma lahko okuži rastlino tudi brez prisotnosti virusnih delcev, vendar le v določenih razmerah. Proteinski plašč virusnega delca namreč obdaja in varuje virusno nukleinsko kislino pred škodljivimi vplivi okolja. V za okužbo dovzetnih rastlinah se virus iz mesta okužbe hitro širi po vsej rastlini in okuženost traja do propada rastline. Od mesta okužbe v listu do gomoljev virus PVY potrebuje od 10 do 14 dni (Arends in Kus, 1999). Širjenje virusa je povezano s širjenjem fotoasimilatov. Ti nastajajo v listih, ki aktivno fotosintetizirajo, in nato potujejo v liste, ki fotoasimilate porabljajo (Mas in Pallas, 1996). Podobno kot se sladkorji v splošnem prenašajo iz spodnjih listov rastline v korenine in iz zgornjih listov rastline v razvijajoče poganjke, je širjenje virusov odvisno od položaja okuženih listov, ki delujejo kot izvor za nadaljnjo sistemsko okužbo

(Gilbertson in Lucas, 1996). Širjenje PVY z ene rastline na drugo poteka najpogosteje z listnimi ušmi, prenaša pa se lahko tudi preko zemlje ali vode. Škoda, ki jo povzroča virus na krompirju, je trajna (Arends in Kus, 1999).

2.1.1 Organizacija genoma PVY in virusni proteini

Virusni delci PVY so nitasti, dolgi približno 800 nm in široki 13 nm (slika 1). Virusna RNA je pozitivno usmerjena, enoverižna, dolga približno 9,7 kb. V virusnem delcu je obdana s približno 2000 molekulami plaščnega proteina (coat protein, CP). RNA ima na 3' koncu poli(A) rep, na 5' koncu pa kovalentno vezan protein VPg, ki služi kot začetek pri podvajanju verige RNA.



Slika 1: Virusni delec PVY, posnet s presevnim elektronskim mikroskopom (foto: Katja Koblar).

Genom PVY ima en sam bralni okvir. Pred in za njim, to je na 5' in 3' koncu, sta nekodirajoči regiji. Bralni okvir se prepiše v en poliprotein, sestavljen iz več kot 3.000 aminokislin. Po translaciji se poliprotein razcepi na devet funkcionalnih proteinov: P1 (first protein, prvi protein), HC-Pro (helper component proteinase, proteinaza s pomožno komponento), P3 (third protein, tretji protein), 6K1 (first 6 kDa protein, prvi 6 kDa velik protein), CI (cylindrical inclusion body, valjasto vključitveno telesce), 6K2 (second 6 kDa protein, drugi 6 kDa velik protein), VPg (viral genome linked protein, na genom vezan virusni protein), NIa (nuclear inclusion protein a, jedrni vključitveni protein a), Nib (nuclear inclusion protein b, jedrni vključitveni protein b) in CP (coat protein, plaščni protein) (slika 2, preglednica 1) (Agrios, 1997; Urcuqui - Inchima in sod., 2001).



Slika 2: Organizacija genoma PVY (Urcuqui - Inchima in sod., 2001).

Preglednica 1: Vloga proteinov PVY (povzeto po Urcuqui - *Inchima in sod.*, 2001).

PROTEIN	VLOGA
P1	Nukleotidno zaporedje, ki kodira informacijo proteina P1, leži na začetku bralnega okvirja. P1 je 32 kDa velik protein. Je najmanj ohranjen protein družine <i>Potyviridae</i> .
HC-Pro	HC-Pro je protein z več vlogami, med drugim sodeluje pri pomnoževanju virusa in prenosu po rastlini, sodeluje pri interakciji prenašalcev (listnih uši) in virusnih delcev, sodeluje pri imunskem odgovoru rastline, povezan je z razvojem bolezenskih znamenj. Protein se cepi na tri dele.
P3	P3 je najmanj poznan protein. Ima pomembno vlogo pri patogenosti virusa in pomnoževanju virusa v rastlini.
6K1	6K1 se povezuje s P3; skupaj sodelujeta pri nastanku bolezenskih znamenj.
CI	CI v rastlinski celici tvori vključke v obliki vetrnice. Ima posredno vlogo pri transportu virusa po rastlini.
6K2	6K2 sodeluje pri pomnoževanju virusnega genoma, pri čemer se veže na endoplazmatski retikulum v rastlinski celici. Sodeluje tudi pri transportu virusa in razvoju bolezenskih znamenj.
Nla	Nla je pomemben za uspešen začetek sinteze RNA. Sodeluje tudi pri nastanku nekroz.
Nlb	Nlb je od RNA odvisno RNA polimeraza.
CP	CP tvori plašč virusnega delca. Sam potek enkapsidacije še ni popolnoma poznan. Velik je od 32 kD do 36 kD. Ključen je za prenos z vektorji. Sodeluje pri premikanju virusa po rastlini ter pri pomnoževanju virusa.

2.1.2 Različki virusa PVY in bolezenska znamenja

Različni različki PVY na različnih sortah krompirja povzročajo različna bolezenska znamenja. Glede na lokalna in sistemska bolezenska znamenja na štirih sortah krompirja in tobaku delimo PVY na pet skupin: PVY^O, PVY^N, PVY^C, PVY^E in PVY^Z (Kerlan, 2011). Glede na molekularne značilnosti pa ločimo veliko različkov PVY, ki so večinoma nastali z rekombinacijami med PVY^O in PVY^N, na primer PVY^{NTN}, PVY^W, PVY^{N:O} (Singh in sod., 2008).

Različek PVY^O povzroča mozaik na listih ter odpadanje listov krompirja. Tobak prizadene z mozaikom in lisavostjo listov. PVY^O je odgovoren za približno 50-odstotno izgubo pridelka krompirja po okužbi (Jacquot in sod., 2005).

Primarna bolezenska znamenja se pokažejo po okužbi zdrave rastline, tiste, ki so se okužile preko gomoljev, pa kažejo sekundarna bolezenska znamenja. Primarna bolezenska znamenja (slika 3) se pri rastlinah na polju po navadi pojavijo na enem stebelu. Na okuženem listu se najprej pojavijo temnorjave črte in polkrogi zelene barve

(klorofilni liki). List najprej porumeni, nato pa se prične sušiti. Listi nad okuženim ter sosednji listi lahko prav tako kažejo bolezenska znamenja. Pojavi se nekroza (odmiranje) listnih žil in listnega tkiva (Kus, 1995).

Sekundarna bolezenska znamenja, ki se izražajo na rastlinah, zraslih iz okuženih gomoljev, se lahko kažejo kot:

- mozaik, rahlo gubanje listne površine ter blaga kodravost,
- gubanje listov, jasen mozaik in opazna kodravost,
- izrazit mozaik in kodravost ter črtaste nekroze na listnih žilah in klorofilni liki na porumenelih listih, bolezenska znamenja na steblih in predčasno odmiranje ali
- močna črtavost na listih in steblih ter propad rastline pred tvorbo gomoljev.

Okužba tobaka s PVY^N se kaže najprej z gubanjem listov, ki kasneje porjavijo in odpadejo. Pojavi se tudi jasna nekroza žil, po čemer se loči od okužbe s PVY^O (Kus, 1995).

Pri krompirju so primarna in sekundarna znamenja blaga in se med seboj ne razlikujejo. Bolezenska znamenja so mozaik listov, blago gubanje ter kodravost listov. Pojavijo se pozno v sezoni (Kus, 1995).

PVY^{NTN} na tobaku kaže podobna bolezenska znamenja kot različek PVY^N. Na krompirju PVY^{NTN} povzroča najhujša bolezenska znamenja – poleg bolezenskih znamenj na listih povzroča tudi bolezen, imenovano obročkasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD) (slika 4), ki se je prvič pojavila na Madžarskem leta 1979 in se nato hitro razširila po vsem svetu. V Sloveniji se je pojavila leta 1988 in je nedvomno bolezen, ki je slovenskim pridelovalcem krompirja povzročila največjo škodo. Zaradi občutljivosti sorte Igor, ki je takrat predstavljala več kot polovico celotne pridelave krompirja, se je ta sorta popolnoma nehala pridelovati. V Sloveniji je bila močno prizadeta tudi pridelava semenskega krompirja (Kus, 1995).

Različek PVY^W tudi lahko povzroča PTNRD, vendar na manjšem deležu rastlin kot PVY^{NTN} (Kus, 1995).



Slika 3: Primarna znamenja okužbe (foto: Polona Kogovšek).



Slika 4: Obročasta nekroza gomoljev (foto: Polona Kogovšek).

2.1.3 Prenos virusa PVY

PVY se v naravi najpogosteje prenaša z listnimi ušmi, lahko pa se prenaša tudi z vodo, z vegetativnim razmnoževanjem ali pa s semeni. Umetno se prenaša z mehansko inokulacijo ter s cepljenjem.

Virus v naravi prenaša preko 40 vrst listnih uši, med katerimi je najpomembnejši prenašalec siva breskova uš (*Myzus persicae*). Prenos poteka najprej s prebodom okužene rastline ter nato prebodom zdrave rastline. Listna uš najprej s prebodom povrhnjice poskusi, ali ji sok rastline ustreza. Če ji ustreza, prodre do prevodnih snopov. Okušanje traja do nekaj sekund, medtem ko za hranjenje potrebuje več kot pol ure. Za prenos virusa zadostuje okušanje. Ko listna uš prebode povrhnjico okužene rastline, se nanjo primejo tudi virusnimi delci. Z nekaj zaporednimi vbodi v zdravo tkivo kužnost mine (Kus, 1995).

Uspešnost prenosa je odvisna od številnih dejavnikov. Dovzetnost za okužbo močno poveča sočasna okužba z drugimi virusi (Matthews, 1992). Virus se po rastlini hitreje širi do mlajših listov, zato so mlade rastline bolj občutljive (Walkey, 1985). Temperatura okolja rasti rastline zelo vpliva na prenos – pri optimalni temperaturi sta množenje in prenos virusov po rastlini hitrejša. Množenje virusov pospešita tudi daljši dan in višja svetlobna intenziteta, dovzetnost rastlin za okužbo pa je odvisna od dela dneva; tako je ob zori najmanjša ter popoldne največja možnost prenosa (Matthews, 1992). Koncentracija hranil, ugodna za rastline oslabi možnost okužbe (Walkey, 1985).

Najpomembnejši način preprečevanja okužbe je sajenje zdravih rastlin. Za potrditev zdravega sadilnega materiala so pomembne natančne diagnostične metode. Kot najbolj natančna in uporabna se je izkazala metoda qPCR, najpogosteje pa se uporablja test ELISA. Polja s semenskim krompirjem so kontrolirana večkrat na leto. Rastline, ki kažejo bolezenska znamenja, se takoj uniči. Težja kontrola je pri sortah s slabše izraženimi bolezenskimi znamenji. Pomembno je tudi odstranjevanje rastlin, ki služijo kot rezervoarji virusa ali pa omogočajo njegovo pomnoževanje, kot na primer razne plevelne rastline.

Zelo pomembno je tudi omejevanje števila listnih uši na posevku, še posebej zgodaj v sezoni. Najbolj učinkovita je uporaba kombinacije insekticidov in mineralnih olj. Problem kontrole širjenja virusov z insekticidi je v tem, da prenos poteka že samo z okušanjem sokov, za kar je potrebno samo nekaj sekund, kar pomeni, da se virus prenese hitreje, kot insekticid učinkuje na listno uš (Pernezny in sod., 2003). Pri uporabi mineralnih olj v primerjavi z uporabo insekticidov je vpliv na okolje veliko manjši. Naoljena površina lista naolji tudi listno uš in s tem onemogoči prenos virusnih delcev. Vendar vremenski dejavniki vplivajo na učinkovitost mineralnih olj. UV-svetloba povzroči njihovo razgradnjo, dež in namakalni sistemi pa odstranijo oljno plast iz rastlin. Mineralna olja lahko tudi zmanjšajo kvaliteto pridelka (Hooks in Fereres, 2006).

Biološka kontrola nadzora prenašalcev s pomočjo naravnih sovražnikov se je izkazala kot neučinkovita. Zaradi kratke inokulacijske dobe, potrebne za okužbo, je nemogoče zatreti vse listne uši pred širjenjem okužbe na zdrave rastline. Listne uši ob napadu sproščajo opozorilne feromone, ki povzročijo, da se listne uši v bližini prenehajo hraniti in gredo na druge rastline. Če so okužene, se s tem prenos še pospeši (Hooks in Fereres, 2006).

Zanimive so študije vpliva robnih rastlin na posevek. Listne uši med letom izberejo gostiteljsko rastlino na podlagi vida. Večji kot je kontrast med rjavo zemljo in zelenim rastjem, večja je verjetnost hranjenja listnih uši na teh rastlinah. Po drugi strani pa več zelene površine pomeni manjšo verjetnost ustavljanja listnih uši na tej površini. Tako so najbolj ranljiva zgodaj posejana polja z veliko rjave robne površine. Tudi če se s PVY okužena listna uš ustavi na robni rastlini, s poskušanjem izgubi virulenco in s tem se zmanjša možnost okužbe posevka. Pomembno je, da se v robnih rastlinah virus ne pomnožuje. Kot najboljša robna rastlina poljem krompirja se je izkazala soja, ker se v soji PVY ne pomnožuje. Pri nasadih paprik so se kot zelo učinkovite robne rastline izkazale sončnice, kjer so prenos PVY skoraj odpravile. Pri krompirju robne rastline niso zmanjšale števila listnih uši v primerjavi s poljem brez njih, so pa pripomogle k zmanjšanju števila okuženih rastlin krompirja približno na polovico. Tako obstajajo štiri hipoteze vpliva robnih rastlin:

- Sajenje robnih rastlin, za listne uši privlačnejših kot sam posevek, močno zmanjša število kolonij na posevku.
- Robne rastline delujejo kot fizična pregrada, s čimer preprečijo nalet kolonij uši na gostiteljske rastline.
- Robne rastline ne zmanjšajo števila kolonij uši, vendar z ustavljanjem kolonij na njih zmanjšajo virulenco.
- Kamuflačne rastline, posajene med poljščinami, otežijo listnim ušem prepoznavanje gostiteljskih rastlin. Tudi bolj gosto sajeni posevki zmanjšajo odstotek okuženih rastlin (Hooks in Fereres, 2006).

2.1.4 Širjenje PVY v rastlinah

Virusi so intracelularni patogeni, ki se lahko razmnožujejo le v živih celicah, saj nimajo lastnega metabolizma. Prav zato so odvisni od rastlinskih faktorjev, ki vplivajo na lokalno in sistemsko širjenje po gostiteljski rastlini (Murphy in sod., 1999).

Virus vstopi v rastlino preko poškodbe (mehansko skozi listne laske ali s prenašalci). Pomnožuje se v epidermalnih ali mezofilnih celicah (Carrington in sod., 1996). V

rastlinski celici poteka celoten infekcijski cikel virusa. Najprej se loči virusna nukleinska kislina od proteinskega plašča, ki jo obdaja. Nato virusna RNA preusmeri celično presnovo v izgradnjo virusnih komponent. Virusi iz rodu Potyvirus imajo pozitivno orientirano RNA, zato od RNA odvisna RNA-polimeraza najprej sintetizira komplementarno negativno orientirano RNA. Ta služi kot matrica za sintezo novih pozitivno orientiranih nukleinskih kislin. Transkripciji nato sledi translacija. Na novo sintetizirani proteini med drugim sodelujejo pri pomnoževanju in transportu virusa, plaščni proteini pa se organizirajo okoli novo nastale RNA, da nastane nov virusni delec (Agrios, 1997). Pri mehanski inokulaciji lahko rastlino okuži tudi sama virusna RNA brez prisotnosti virusnih beljakovin (Maule in sod., 2002).

Počasno gibanje virusa od celice do celice poteka preko plazmodezm (Maule in sod., 2002), hitrejše gibanje na daljše razdalje od lista do lista pa poteka preko žilnega sistema. Virusi se širijo po floemu in tudi po ksilemu (Mas in Pallas, 1996).

Količina virusa v rastlini ni vedno odvisna od občutljivosti sorte. Študijo so Mehle s sodelavci (2004) opravili na treh različno odpornih sortah. Uporabili so metode ELISA, odtis tkiva (tissue printing), elektronsko mikroskopijo in metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Ugotovili so, da se virus bolj namnoži v tolerantni sorti Pentland Squire in manj občutljivi sorti Desirée kot v zelo občutljivi Igor.

Študija kopičenja virusnih delcev (detektiranih z EM) in virusne RNA (detektirane s qPCR) PVY^{NTN} v organih in tkivih rastlin krompirja sorte Igor je pokazala največjo količino virusne RNA v listih z bolezenskimi znamenji, stebli in koreninah ter v listnem peclju lista z znaki staranja. Največja količina virusnih delcev pa je bila najdena v listnem peclju, listu z znaki staranja ter v centralnem strženu stebela (Kogovšek in sod., 2010).

Okužba z virusom v rastlini povzroči fiziološke, biokemijske in metabolne spremembe. Posledica teh sprememb so pogosto bolezenska znamenja (Mehle in sod., 2004).

2.2 Metode za določanje količine PVY v rastlinskem tkivu

Trenutno najpogosteje uporabljeni metodi za določanje količine PVY v rastlinskem materialu sta test ELISA in qPCR, ki data informaciji o količini plaščnega proteina oz. virusne RNA, elektronska mikroskopija pa omogoči določitev količine virusnih delcev.

2.2.1 Test ELISA

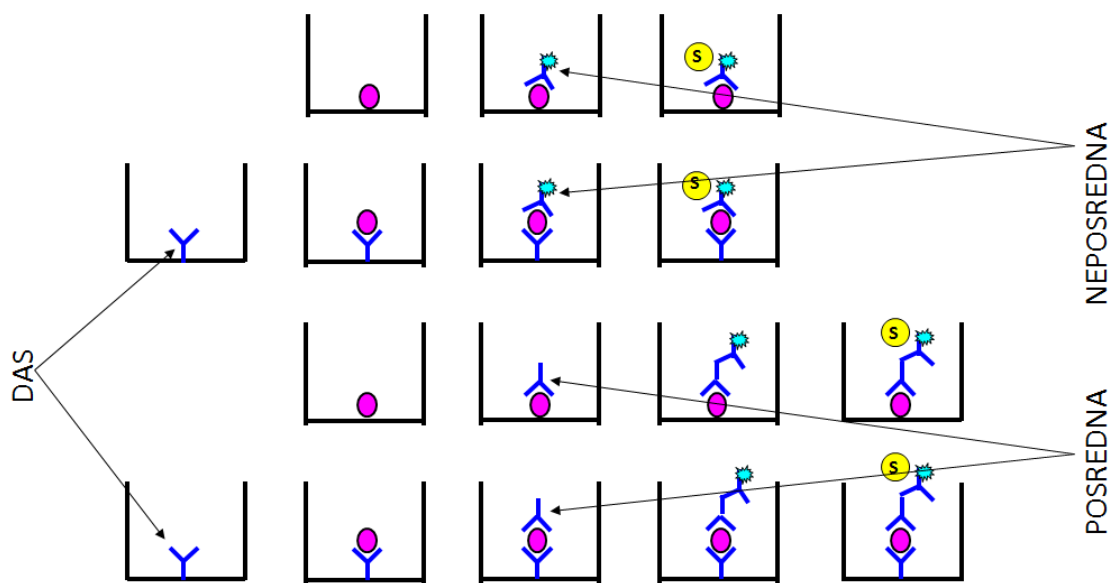
Encimskoimunski test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) temelji na specifični interakciji antigen-protitelo. Test je bil prvič opisan leta 1977 in od takrat je najpogosteje uporabljena metoda za dokazovanje prisotnosti virusov v rastlinskem materialu, živalskih prenašalcih in semenih (Crowther, 1998).

Virusni delci so lahko dobri antigeni, zato lahko proizvedemo specifična protitelesa za določen virus. Protitelesa, uporabljena pri testu ELISA, so proteini, proizvedeni v živalih kot odgovor na vnesene antigene (Crowther, 1998).

Na podlagi specifičnih protiteles lahko dokazujemo prisotnost specifičnih virusov. Virus oz. antigen lahko vežemo neposredno na mikrotitrsko ploščico, lahko pa se uporablja t. i. sendvič ali DAS-test, pri katerem na mikrotitrsko ploščico najprej nanese primarna protitelesa, na katera se veže virus oz. antigen (slika 5) (Crowther, 1998).

Pri neposrednem testu ELISA nato dodamo z encimom konjugirana specifična sekundarna protitelesa. Pri posrednem testu ELISA pa se najprej na antigen vežejo specifična sekundarna protitelesa brez konjugiranega encima, nato pa na sekundarna protitelesa še z encimom konjugirana terciarna protitelesa. Ob dodatku substrata encima se razvije barvna reakcija. Posredni test ni tako specifičen kot neposredni. Uporablja se predvsem za prepoznavanje širšega spektra antigenov (Crowther, 1998).

Metoda ELISA je preprosta, hitra, dokaj poceni, varna in dostopna, zato se uporablja v številnih laboratorijih za rastlinsko analiziranje prisotnosti PVY v vzorcih krompirja. Po vsaki fazi z izpiranjem odstranimo nevezane snovi. Zaradi tega je učinkovitost reakcije skoraj enaka ob uporabi grobega rastlinskega materiala ali očiščenega virusnega izvlečka (Crowther, 1998).



Slika 5: Shematski prikaz testa ELISA. Y – protitelo, ● – virus, ● – encim, ● – substrat.

2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda, s katero pomnožujemo specifični odsek nukleinske kisline (Deng in sod., 1994). Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (PCR v realnem času, real-time PCR, quantitative PCR, qPCR) za razliko od klasične metode PCR omogoča natančno določanje koncentracije nukleinskih kislin (Walker, 2002).

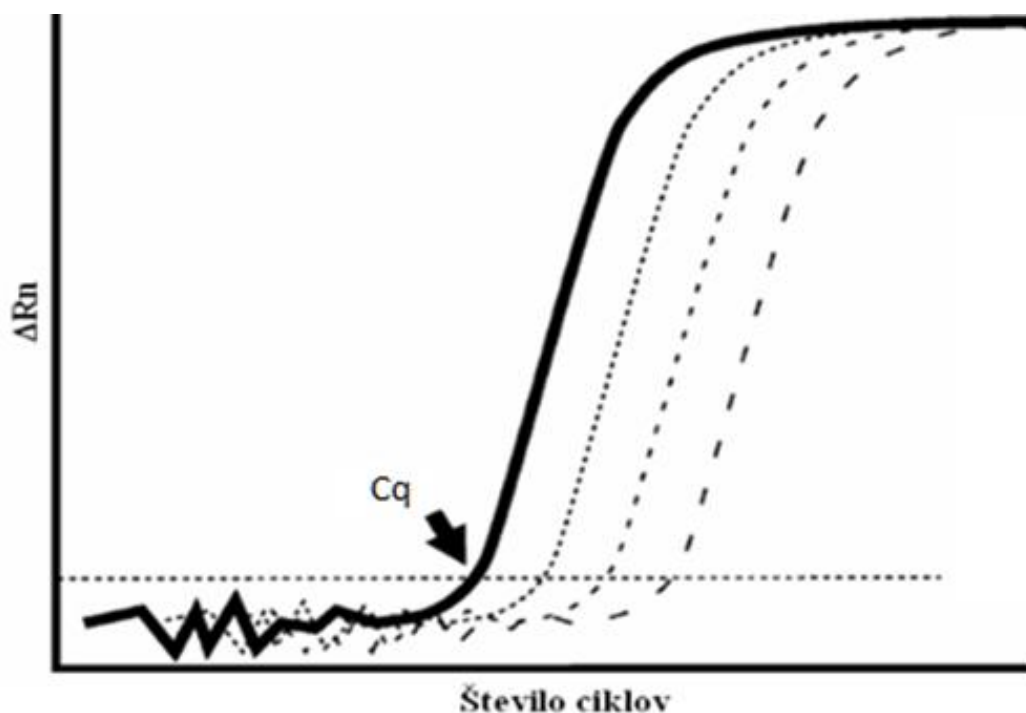
V primeru študija izražanja genov ali detekcije RNA-virusov kot tarčo pomnoževanja uporabimo RNA. V tem primeru je pred izvedbo PCR potrebna reverzna transkripcija (RT) RNA v komplementarno DNA (cDNA) (Walker, 2002). Metoda RT- qPCR lahko poteče v dveh ločenih korakih, kjer najprej reverzna transkriptaza RNA prepíše v cDNA v eni in nato v drugi, ločeni reakciji, poteče še qPCR. Lahko pa analiza poteče le v enem koraku (Nolan in sod., 2006). PCR je metoda, pri kateri termostabilna Taq DNA polimeraza v ciklih pomnožuje kratek, z začetnima oligonukleotidoma specifično določen del matrične DNA (amplikon). V cikličnem procesu najprej poteče denaturacija nukleinskih kislin pri 95 °C, kar povzroči razklepanje dvojnih verig v enojne. Sledi

ohlajanje, kar omogoča vezavo komplementarnih začetnih oligonukleotidov na enoverižno matrično DNK. Sledi podaljševanje pri 60 °C do 72 °C (odvisno od polimeraze), to je pri temperaturi optimalno za delovanje polimeraze (Valasek in Repa, 2005). Postopek pri qPCR je podoben, razlikuje pa se analiza produktov. Pri klasični PCR nastale produkte vizualiziramo z gelsko elektroforezo, pri qPCR pa detekcija pomnoževanja poteka med samo reakcijo. Pri qPCR detekcija pomnoževanja med reakcijo poteka s pomočjo fluorescentnih barvil. Količina fluorescence je direktno sorazmerna količini pomnožene DNA (Valasek in Repa, 2005). Tako končna analiza produktov PCR, za razliko od klasične PCR, ni potrebna. S tem se zmanjša možnost kontaminacije po poteku reakcije, do katere lahko pride pri klasični PCR (Bustin in sod., 2005).

Najpogosteje uporabljeni kemiji sta uporaba vrinjevalnih molekul (npr. SYBR Green) in Taq man kemija. Barvilo SYBR Green se veže na vsako na novo nastalo dvojno verigo DNA. Vezava je nespecifična, zato lahko zaznamo tudi nespecifične produkte. Njihov nastanek preverimo z uporabo disociacijske krivulje, redkeje z gelsko elektroforezo. Disociacijska krivulja je dodatna stopnja po qPCR. Meri se fluorescenca med postopnim dvigovanjem temperature od 60 °C do 95 °C. Različni produkti imajo različne temperature taljenja, tako se razklenijo disociirajo in sprostijo barvilo SYBR Green pri različni temperaturi. Tako lahko produkte ločimo med seboj glede na temperature taljenja (Giulietti in sod, 2001; Vandesompele in sod., 2002).

Taq man kemija je bolj specifična in zato najbolj pogosto uporabljena (Gachon in sod., 2004). Značilnost te kemije je uporaba sond, specifičnih za del amplikona med obema začetnima oligonukleotidoma. Na 5' koncu so sonde označene s fluorescentno poročevalsko molekulo, na 3' koncu pa z dušilcem, ki zaduši fluorescenco poročevalske molekule, kadar se nahaja v njeni bližini. Ko Taq polimeraza podaljšuje verigo, hkrati razgrajuje sondo. Posledica tega je, da se dušilec oddalji od poročevalske molekule, s tem pa narašča fluorescenca poročevalskega barvila. Zaradi specifičnosti sonde zaznamo le specifične produkte (Kumar in sod, 1998).

Med linearno fazo je fluorescenca produkta nižja od ozadja in v tej fazi določimo bazno linijo. V zgodnji eksponentni fazi fluorescenca produkta preseže fluorescenco ozadja. Tukaj določimo linijo prazne vrednosti. Vrednost C_q je dosežena, ko fluorescenca vzorca preseže linijo prazne vrednosti. C_q je sorazmerna količini tarčnega zaporedja. Fluorescenca v tej fazi narašča linearno nekaj ciklov. Količina reagentov in encima se nato zmanjša, zato se pomnoževanje prekine. To fazo imenujemo plato faza. Podatki o fluorescenci v tej fazi niso več uporabni za analizo (slika 6) (Wong in Medrano, 2005).



Slika 6: Prikaz krivulje fluorescence (ΔRn) v odvisnosti od števila ciklov pri qPCR. Cq predstavlja število ciklov, potrebnih za dvig fluorescence nad prazno vrednostjo (Mackay, 2004).

Računalniški program, ki se uporablja za izvedbo qPCR, preračuna fluorescenco (ΔRn) v kateri koli časovni točki med pomnoževanjem, ki ji je odšteto ozadje. Točka, kjer pride do dviga signala fluorescence poročevalske molekule nad vrednostjo praga, predstavlja Cq vrednost. Ta se izraža v številu ciklov, ki so bili potrebni za dvig signala fluorescence nad prag (Giulietti in sod., 2001). Za bolj natančno analizo podatkov se uporablja pasivno barvilo 6-karboksi-X-rodamin (ROX), ki je notranja referenca za normalizacijo fluorescenčnega signala (Wong in Medrano, 2005). Računalniški program nariše diagram odvisnosti ΔRn od števila ciklov reakcije (slika 6) (Giulietti in sod., 2001). Več kopij tarčnega zaporedja pomeni manjše število ciklov, potrebnih za dvig fluorescence nad prag (Walker, 2002).

Kvantifikacijsko območje je široko do sedem redov velikosti (Gachon in sod., 2004). Poznamo absolutno in relativno kvantifikacijo podatkov. Obe metodi uporabita Cq vrednost (Wong in Medrano, 2005).

Z absolutno kvantifikacijo izmerimo točno število kopij gena v vzorcu. Da lahko dosežemo, potrebujemo standardno krivuljo znanega števila kopij gena. Za to lahko uporabimo ampikon iz vzorca ali sintetični oligonukleotid. Standardna krivulja predstavlja razmerje med Cq vrednostmi in količino kopij ampikona (Wong in Medrano, 2005).

Z relativno kvantifikacijo določimo razmerje med številom kopij analiziranega tarčnega gena in referenčnega gena. Vrednost Cq tarčnega gena je tako normalizirana z vrednostjo Cq referenčnega gena v vzorcu. Izbira primerne referenčnega gena je zato nujno potrebna za določitev relativne količine cDNA (Bustin, 2005). Kot najboljši referenčni geni so se izkazali endogeni vzdrževalni geni, ker le tako lahko upoštevamo vse dejavnike variabilnosti. Pri izbiri referenčnega gena je potrebno upoštevati vrsto preučevanega organizma, tkiva in eksperimentalne pogoje (Giulietti in sod., 2001). Program GeNorm pomaga pri izbiri primernih referenčnih genov (Vandesompele in sod.,

2002). Med najbolj standardne referenčne gene sodijo gen za citokrom c oksidazo (COX), gen za β -aktin, gen za elongacijski faktor 1 (EF-1) in 18S rRNA (Pfaffl, 2001).

Relativno količino cDNA lahko izračunamo iz razlik med vrednostjo Cq med vzorcem in kontrolo ($\Delta\Delta Cq$ metoda) ali iz umeritvene krivulje, kar je bolj natančno, ker se upošteva tudi učinkovitost PCR reakcije (Livak in Schmittgen, 2001).

Prednosti qPCR pred klasično metodo PCR so:

- Pomnoženo DNA zaznamo že tekom PCR reakcije, zato ni potrebe po dodatni detekciji na koncu reakcije, kot je npr. agarozna gelska elektroforeza (Freeman in sod, 1999).
- Analiza končnih produktov ni potrebna, zato je možnost kontaminacije manjša (Freeman in sod, 1999).
- qPCR je zelo občutljiva metoda in omogoča zaznavanje le nekaj kopij DNA (tudi samo eno) (Mumford in sod., 2004).
- Kvantificiramo lahko zelo različne količine začetne DNA, ki se razlikujejo za 7 redov velikosti (Livak in Schmittgen, 2001).

Slabosti qPCR pred klasično metodo PCR so:

- Zaradi kompleksne narave bioloških vzorcev, nepopolnega očiščenja DNA oz. RNA tekom izolacije nukleinskih kislin itd. lahko pride do inhibicije. Neionski detergenti, (npr. Tween 20) navadno ne inhibirajo PCR, če je njihova vsebnost manjša od 5 %. Po drugi strani pa lahko že majhna količina ionskih detergentov inhibira delovanje *Taq* polimeraze (Newton in Graham, 1994).
- qPCR je izjemno občutljiva metoda, zato je posledično občutljiva tudi na napake. Najmanjša napaka lahko bistveno vpliva na rezultat. Najbolj variabilna in kritična točka je priprava vzorcev (izolacija nukleinskih kislin in RT) (Giulietti in sod., 2001).

2.2.3 Elektronska mikroskopija

Elektronski mikroskop (EM) omogoča opazovanje objektov, premajhnih za opazovanje z optičnim mikroskopom. Omogoča, da opazujemo objekte velikostnega reda nekaj nanometrov. Tako lahko z elektronskim mikroskopom opazujemo virusne delce (Bozzola in Russell, 1999).

Prvi elektronski mikroskop sta leta 1931 izdelala Ernst Ruska in Max Knoll. Že leta 1939 je Siemens predstavil prvi praktično uporabni presevalni elektronski mikroskop. Tako so lahko prvič v zgodovini videli manjše organizme, viruse in nukleinske kisline. Sedaj se EM široko uporablja, še posebej na področju anatomije, biokemije, botanike, celične biologije, mikrobiologije, fiziologije in toksikologije (Bozzola in Russell, 1999).

Elektronski mikroskop za razliko od svetlobnega za svoje delovanje uporablja elektrone. Zaradi njihove kratke valovne dolžine teoretično omogoča do 100.000-krat boljšo ločljivost od svetlobnega mikroskopa (Bozzola in Russell, 1999).

Glavne komponente EM so elektronska puška, ki je vir elektronov, elektro-magnetne leče, ki izsevane elektrone zberejo v ozek snop, krmilje za optimiranje pogojev dela in

zaslon za prikaz elektronske slike. Potrebna je tudi vakuumaska enota zaradi omejenosti gibanja elektronov v zraku (Bozzola in Russell, 1999).

Poznamo dve vrsti elektronskih mikroskopov:

- vrstični elektronski mikroskop (Scanning Electron Microscope, SEM)
- presevni elektronski mikroskop (TEM).

Z vrstično elektronsko mikroskopijo dobimo tridimenzionalno sliko. Elektronski snop se premika po površini vzorca. Ob stiku snopa elektronov s površino preparata pride do izbijanja sekundarnih elektronov iz površine preparata. Na detektorju nastane električni signal, ki ga lahko ojačimo. Tako krmilimo jakost elektronskega curka na zaslonu. Slika na zaslonu tako nastaja sočasno s pomikanjem snopa elektronov po površini preparata. Čim večji je tok odbitih elektronov svetlejša je točka na zaslon (Bozzola in Russell, 1999). Za razliko od TEM debelina preparata ni pomembna, saj SEM zbira podatke o površini. Prav zaradi tega je potrebna dobra odbojnost vzorca. Vzorec se najprej dehidrira, nato sledi naporitev tanke plasti prevodnika (zlato, platina ali mešanica obojega) (Bozzola in Russell, 1999).

Presevna elektronska mikroskopija omogoča ločljivost pod 1 nm. Vzorec mora biti zelo tanek (30–100 nm) in kontrastiran z raztopino težkih kovin (uran, svinec, volfram, molibden). Debelejše vzorce se predhodno nareže na rezine (bakterije, glive, rastlinsko tkivo, živalsko tkivo ...). Pri TEM snop elektronov potuje skozi preparat. Na mestih manjših optično redkih atomov preparat snop elektronov spušča skozi in na zaslonu dobimo svetlo točko. Na mestu težkih, optično gostih atomov pa se snop elektronov odbije ali vsrka in na zaslonu dobimo temno točko. S kontrastiranjem se poveča razlika v elektronski gostoti, kar omogoča nastajanje slike. Pri pripravi večjih vzorcev se vzorec najprej fiksira, kar zamreži strukture v vzorcu. Sledi dehidracija z alkoholom ali acetonom, vklapljanje v smole (epoksidne ali akrilne), ki omogočajo trdnost vzorca, ter rezanje vzorca. Vzorec se nato lahko označi s protitelesi in kontrastira. Zelo majhnih vzorcev (nukleinske kisline, proteini, virusi, bakterije ...) ni potrebno rezati, preparat se pripravi z metodo adsorpcije na mrežico za elektronsko mikroskopijo, pri čemer lahko uporabimo negativni kontrast (NK), lovljenje na protitelesa (ISEM), označevanje s protitelesi (dekoracija) ali lovljenje na protitelesa in označevanje s protitelesi (ISEM in dekoracija) (Bozzola in Russell, 1999).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Priprava raztopin

3.1.1 Priprava raztopin za mehansko inokulacijo

Pufer za mehansko inokulacijo:

2,6 mM NaH_2PO_4 ,
15,2 mM Na_2HPO_4 ,
0,1 % DIECA,
pH umerimo na 7,6.

3.1.2 Priprava raztopin za homogenizacijo

0,1 M PB:

3,12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$,
4,26 g NaH_2PO_4 ,
pH umerimo na 6,8 in dopolnimo z dH_2O do skupnega volumna 500 ml.

3.1.3 Priprava raztopin za pripravo redčin virusa

Boratni pufer:

3,09 g H_3BO_3 ,
4,77 g Borax,
500 ml dH_2O ,
pH umerimo na 8,4.

3.1.4 Priprava raztopin za test ELISA

Karbonatni pufer:

1,59 g Na_2CO_3 ,
2,93 g NaHCO_3 ,
900 ml destilirane H_2O ,
umerimo pH na 9.6 in dopolnimo z dH_2O do skupnega volumna 1000 ml.

10-krat koncentrirani PBS pufer:

80 g NaCl ,
2 g KH_2PO_4 ,
11,4 g Na_2HPO_4 ,
2 g KCl ,
dopolnimo z dH_2O do skupnega volumna 1000 ml.

Pufer za spiranje (PBS-Tween pufer):

100 ml 10-krat koncentriranega PBS,
0,5 ml Tween 20,
 dH_2O (800 ml),

dobro premešamo in umerimo pH na 7.4. Dopolnimo z dH₂O do skupnega volumna 1000 ml.

Ekstrakcijski pufer:

1000 ml PBS-Tween pufra,
20 g PVP (polivinil pirolidon, K 40.000),
2 g BSA (bovin serum albumin),
pH umerimo na 7.4.

2-kratni ekstrakcijski pufer:

500 ml 2-kratnega PBS Tween pufra,
40 g PVP (polivinil pirolidon, K 40.000),
4 g BSA (bovin serum albumin),
pH umerimo na 7.4.

Substratni pufer:

97 ml dietolamina,
800 ml dH₂O,
0,2 g MgCl₂.

Konjugatni pufer:

100 ml PBS-Tween pufra,
2 g PVP (polivinil pirolidon, K 40.000),
0,02 g MgCl₂ x 6H₂O,
pH umerimo na 7.4.

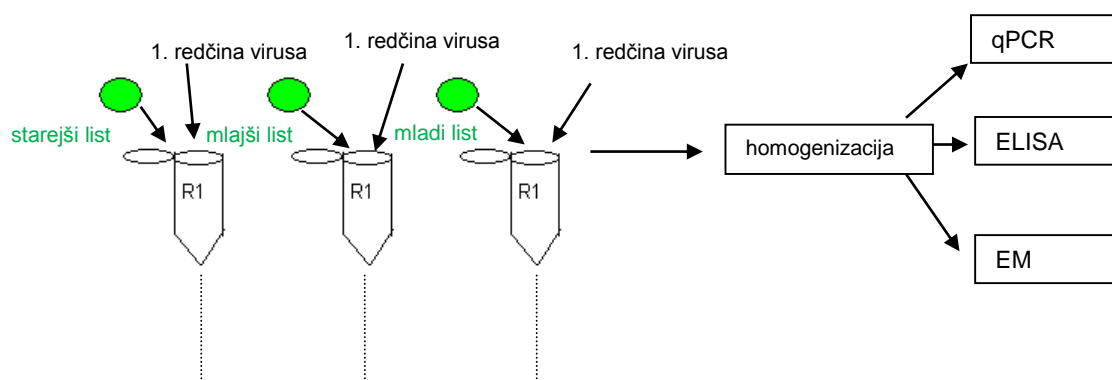
3.1.5 Priprava raztopin za EM

1-% raztopina uranil acetata:

1 g (CH₃COO)₂UO₂ x 2H₂O,
100 ml dH₂O.

3.2 Analiza izoliranega PVY⁰

Pripravili smo redčitve izoliranega virusa PVY⁰, ki smo jim dodali diske zdravih rastlin tobaka, s čimer smo zagotovili primerljivost analize izoliranega virusa z analizo s PVY⁰ okuženih rastlin. V tako pripravljenih vzorcih smo analizirali količino virusnih delcev, količino plaščnega proteina in količino virusne RNA (slika 7).



Postopek smo ponovili do 21. redčine (R21)

Slika 7: Shema analize izoliranega PVY^o. Uporabili smo 21 virusnih redčin, katerim smo dodali rastlinski material. R1 – 1. redčina virusa, R21 – 21. redčina virusa, starejši list – disk iz velikega spodnjega starejšega lista 10 tednov stare rastline, mlajši listi – disk iz manjšega zgornjega mlajšega lista 10 tednov stare rastline, mladi listi – disk iz mladega lista 4 tedne stare rastline.

3.2.1 Priprava rastlinskega materiala

Zdrave rastline tobaka (*Nicotiana tabacum*) sorte Xanthi smo vzgojili iz semen. Rastline so rastle v rastni komori, v kateri je bila relativna zračna vlaga $75 \pm 2 \%$, temperatura $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ v času osvetljevanja in $18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ v času teme, gostota pretoka fotonov $129\text{--}150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo.

Za pripravo redčin smo uporabili tri tipe listov tobaka:

- velike spodnje starejše liste 10 tednov starih rastlin (starejši listi),
- manjše zgornje mlajše liste 10 tednov starih rastlin (mlajši listi) in
- mlade liste 4 tedne starih rastlin (mladi listi),

da smo preverili, ali starost listov in s tem povezana debelina listov vpliva na rezultate (slika 7).

3.2.2 Priprava redčin virusa

Za pripravo redčin PVY smo uporabili izolat PVY^o 139, ki je bil pripravljen na Nacionalnem inštitutu za agronomske raziskave INRA, Rennes, Francija.

20 μl koncentriranega izolata smo dodali v 20 μl boratnega pufru. Od tako dobljenih 40 μl smo 20 μl prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 20 μl boratnega pufru. Redčenje smo po enakem postopku ponovili še 19-krat, da smo skupaj dobili 21 redčin. Pripravili smo 21 diskov iz vseh treh tipov listov tobaka. Vsak disk smo dali v dvo mililitrsko mikrocentrifugirko z varnostnim zapiralom in dodali 6 μl virusne redčine (slika 7). Pripravili smo tudi kontrole. Za pozitivno kontrolo smo uporabili diske listov rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture, okužene s PVY^{NTN}. Za negativno kontrolo smo vzeli diske neokuženega tobaka.

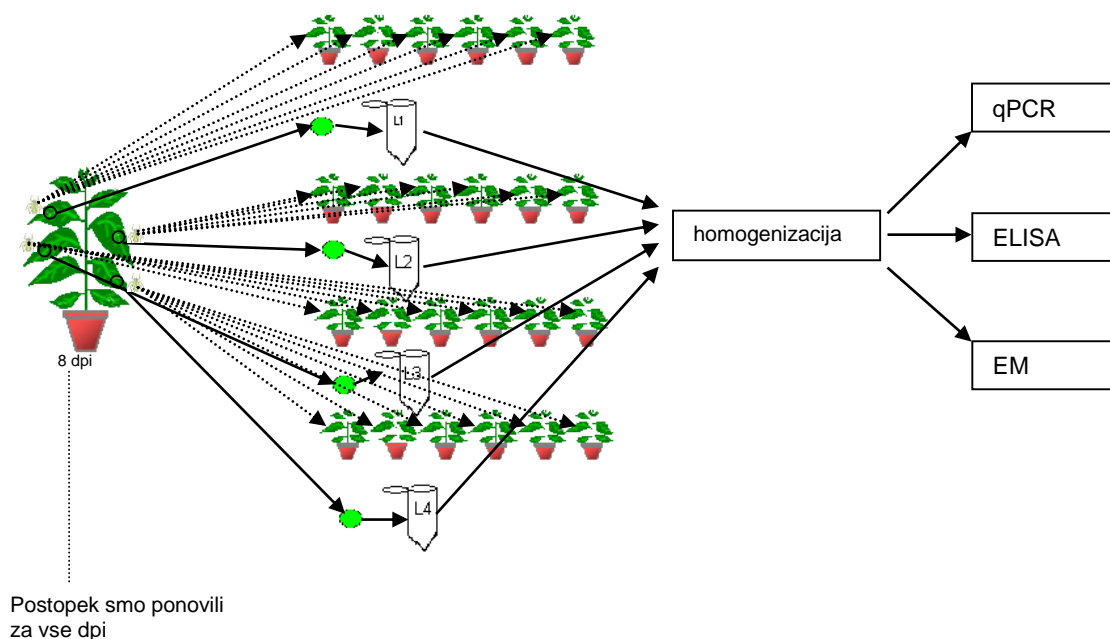
Diski so bili narejeni s pomočjo pokrovčka mikrocentrifugirke.

3.2.3 Priprava homogenata

V vsako dvomililitrsko mikrocentrifugirko z varnostnim zapiralom z vzorci smo dodali 600 μ l 0,1 M PB in železno kroglico. Vzorce smo homogenizirali eno minuto pri 30 Hz z napravo TissueLyser (Qiagen). V ločenih mikrocentrifugirkah smo shranili na temperaturo -80°C po 100 μ l homogenata za qPCR in 200 μ l za test ELISA, 40 μ l homogenata pa smo takoj uporabili za EM (slika 7).

3.3 Analiza s PVY^O okuženih rastlin

Na INRA, Rennes, Francija so predhodno pripravili s PVY^O mehansko inokulirane rastline ter listne uši. V listih, ki so vsebovali različne količine PVY^O, smo analizirali količino virusnih delcev, količino plaščnega proteina in količino virusne RNA ter učinkovitost prenosa virusa z listnimi ušmi (slika 8).



Slika 8: Shema analize s PVY^O okuženih rastlin. Na štirih listih vsake rastline (različno dni po okužbi) so se hranile listne uši. Po hranjenju smo listne uši prenesli na zdrave rastline tobaka, na mestu hranjenja pa izrezali iz lista disk, v katerem smo analizirali količino virusnih delcev, virusnih plaščnih proteinov in virusne RNA. dpi - dni po okužbi.

3.3.1 Priprava rastlinskega materiala

Na INRA, Rennes, Francija so predhodno iz semen vzgojili rastline tobaka sorte Xanthi. Rastline so rastle v rastni komori podnevi pri temperaturi 20 °C ter zračni vlagi 60–70 % in ponoči pri temperaturi 18 °C ter zračni vlagi 85–98 %.

3.3.2 Mehanska inokulacija rastlin

Mehansko inokulacijo rastlin so predhodno izvedli na INRA, Rennes, Francija. Sok za inokulacijo rastlin so pripravili iz poganjkov z izolatom PVY^o 139 okuženih rastlin tobaka sorte Xanthi. Poganjke so homogenizirali v pufru za mehansko inokulacijo v razmerju 3 ml pufra na en list. Raztopini so dodali 2,5 g karborunda in 1,5 g aktivnega oglja. Zdrave rastline tobaka sorte Xanthi so okužili tako, da so na dva mlada lista nanesli po 50 µl homogenata, nežno razmazali po listu in sprali z vodovodno vodo. Mehansko inokulacijo so izvedli v ustreznih časovnih intervalih, da je na dan poskusa od inokulacije minilo 8, 9, 11, 13, 15 in 31 dni.

3.3.3 Vzgoja uši

Klonirane listne uši vrste siva breskova uš (*Myzus persicae*) so predhodno pripravili na INRA, Rennes, Francija. Listne uši so gojili na zdravih rastlinah tobaka, pokritih z mrežo, kjer so bili svetlobni in temperaturni pogoji prilagojeni nespolnemu razmnoževanju listnih uši.

Z listov tobaka smo po pet listnih uši (sliki 9 in 10) s tankim čopičem prenesli v mikrocentrifugirke (slika 11), da bi postale lačne in bi se takoj po prenosu na rastline tobaka začele hraniti. Paziti smo morali, da so bile brez hrane vsaj 45 minut, vendar ne več kot dve uri (takrat so že prešibke za hranjenje).



Slika 9: Pobiranje listov tobaka z listnimi ušmi v času izvajanja poskusa (foto: Katja Koblar).



Slika 10: Listne uši različnih velikosti na listu tobaka (foto: Katja Koblar).

3.3.4 Prenos virusov z listnimi ušmi

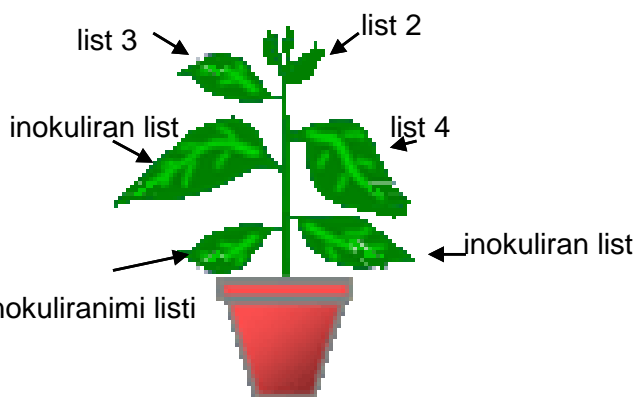


Slika 11: Listne uši v mikrocentrifugirkah (foto: Katja Koblar).

Na mehansko inokuliranih rastlinah tobaka smo 8, 9, 11, 13, 15, in 31 dni po inokulaciji izbrali po 4 liste nad inokuliranima listoma (slika 12). V kolikor je bila rastlina premajhna in nad inokuliranima listoma ni imela štirih dovolj velikih listov, smo tri liste izbrali nad inokuliranima listoma in en list pod inokuliranima listoma (slika 13). Na spodnjo stran izbranega lista (listna uš lažje prebode spodnjo stran lista kot zgornjo) smo dali hraniti pet listnih uši iz mikrocentrifugirke za eno minuto (slika 14). Po eni minuti smo listne uši prenesli na zdravo rastlino tobaka in jih pokrili s kletko (slika 15), da smo jim onemogočili premikanje na druge rastline. Nato smo na isti list in na isto mesto zopet dali hraniti pet listnih uši iz naslednje mikrocentrifugirke za eno minuto. Te smo nato prenesli na drugo zdravo rastlino ter jih pokrili s kletko. To smo ponovili šestkrat. Nato smo v mikrocentrifugirko spravili disk lista, kjer so se hranile listne uši (disk je bil narejen s pomočjo pokrovčka mikrocentrifugirke, pri čemer smo pazili, da nismo vzeli listne žile). Postopek smo ponovili na vseh štirih izbranih listih vsake rastline.



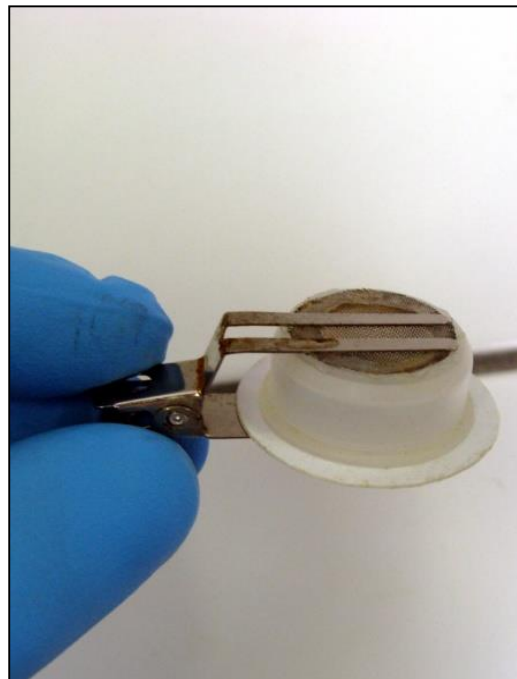
Slika 12: Shematski prikaz večje rastline tobaka v času izvajanja mehanske inokulacije.



Slika 13: Shematski prikaz manjše rastline tobaka v času izvajanja mehanske inokulacije.



Slika 14: Prenos listnih uši iz mikrocentrifugirke na liste tobaka (foto: Matevž Rupar).



Slika 15: Kletka za listne uši (foto: Katja Koblar).

Z rastlin tobaka, na katere smo prenesli listne uši, smo po 24 urah listne uši odstranili kemično z insekticidi. Po treh tednih so te rastline na INRA, Rennes, Francija, analizirali na prisotnost PVY^o.

3.3.5 Priprava homogenata

V vsako dvo mililitrsko mikrocentrifugirko z varnostnim zapiralom z vzorci smo dodali 600 μ l 0,1 M PB in železno kroglico. Vzorce smo homogenizirali eno minuto pri 30 Hz z napravo Tissuelyser (Qiagen). V ločenih mikrocentrifugirkah smo shranili na -80°C po 100 μ l homogenata za qPCR in 200 μ l za test ELISA, 40 μ l homogenata pa smo takoj uporabili za EM.

3.4 Test ELISA

Primarna protitelesa proti PVY (Bioreba VE 03-99) smo razredčili v karbonatnem pufru v razmerju 1 : 1000. V vdolbinice mikrotitrne ploščice (Greiner) smo odpipetirali po 200 μ l razredčenih primarnih protiteles. Ploščice smo pokrili in jih inkubirali štiri ure pri temperaturi 30°C . Po inkubaciji smo ploščice 4-krat sprali s pufom za spiranje. K 200 μ l shranjenega homogenata smo dodali 200 μ l 2-kratnega ekstrakcijskega pufra za ELISA. Luknjice smo po pripravljeni shemi napolnili s 190 μ l tako pripravljenih vzorcev in kontrol. Vse vzorce smo na ploščico nanašali v dveh ponovitvah. Kot negativno kontrolo smo uporabili ustrezna tkiva zdravih rastlin. Robne luknjice smo napolnili z bidestilirano vodo. Inkubirali smo čez noč (vsaj 16 ur) v hladni sobi pri 4°C . Po inkubaciji smo 5-krat sprali s pufom za izpiranje. Pripravili smo razredčena konjugirana protitelesa proti PVY (Bioreba VE 03-100) v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000. V vsako luknjico

smo jih nanesti po 180 μ l razredčenih konjugiranih protiteles, robne luknjice pa smo napolnili z bidestilirano vodo. Po petih urah inkubacije pri 30 °C smo ploščice 5-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 200 μ l p-nitrofenilfosfata s koncentracijo 1 mg/ml v substratnem pufru. Tokrat za robne luknjice nismo uporabili bidestilirane vode, ampak substrat. Pokrite ploščice smo inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Rezultate smo odčitali po 30 minutah, 1 uri, 2 urah, 3 urah in po 18 urah. Rezultate smo odčitali fotometrično pri 405 nm. Uporabili smo čitalec mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in program BioLinx 2.20.

Podatke smo obdelali v programu Microsoft Excel (Microsoft, ZDA). Za vsak vzorec smo izračunali povprečje paralelk. Kot pozitiven rezultat smo upoštevali vrednosti, ki so bile dvakrat višje od ozadja.

3.5 RT-qPCR v enem koraku

3.5.1 Izolacija virusne RNA

Celokupno RNA smo izolirali s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ZDA). Pri izolaciji RNA smo upoštevali navodila proizvajalca, priredili smo le količino začetnega homogenata (100 μ l) in količino ekstrakcijskega puфра RLT (600 μ l).

V 100 μ l shranjenega homogenata smo dodali 600 μ l puфра RLT iz kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiahen). Pufer RLT je vseboval gvanidin tiocianat, ki je povzročil lizo rastlinskih celic in tako inaktivira RNaze. Mešanico homogenata in puфра RLT smo inkubirali 3 minute pri 56 °C. Zmes smo prenesli na kolono QIAshredder, vstavljeno v 2 ml-mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 minuti pri 14.000 vrtljajih na minuto. Tekočino, ki se je nabrala na dnu, smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko (660 μ l) in dodali 330 μ l absolutnega etanola, ki je omogočil ustrezne razmere za vezavo RNA na membrano kolone. Vzorec smo prenesli v kolono RNeasy mini spin in centrifugirali 30 sekund pri 14.000 vrtljajih na minuto. Kolono smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko, dodali 700 μ l puфра RW1 iz kompleta RNeasy Plant Mini Kit in centrifugirali 20 sekund pri 14.000 vrtljajih na minuto. Kolono smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko in dodali 500 μ l puфра RPE. Centrifugirali smo 20 sekund pri 14.000 vrtljajih na sekundo. Ponovno smo prenesli zgornji del kolone in dodali 500 μ l puфра RPE ter centrifugirali 2 minuti pri 14.000 vrtljajih na minuto. Kolono smo še enkrat prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri 14.000 vrtljajih na minuto. Nato smo kolono prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko in dodali 50 μ l vode brez RNaz, segreto na 65 °C. Po 3-minutni inkubaciji smo centrifugirali 1 minuto na 14.000 vrtljajev na minuto. Na koncu smo ponovno dodali 50 μ l vode brez RNaz iz kompleta, segreto na 65 °C. Inkubirali smo 10 minut ter centrifugirali 1 minuto. Izolirano RNA smo shranili pri – 80 °C.

3.5.2 Oligonukleotidi začetniki

Za določanje količine virusne RNA PVY^o s qPCR smo uporabili oligonukleotidne začetnike, ki so jih konstruirali Kogovšek in sodelavci (2010). Uporabili smo par oligonukleotidnih začetnikov in sondo, ki nalegajo na vse različke PVY (amplikon PVYuni), ter par oligonukleotidnih začetnikov in sondo, ki detektira le PVY^o (amplikon PVY^o). Pri načrtovanju so upoštevali prednastavljene pogoje programa, ki so se nanašali na delež nukleotidov G in C (30–80 %), T_m (58–60 °C), dolžino amplikona (50–150 bp) in optimalno dolžino oligonukleotidnih začetnikov (20 nukleotidov). V programu so dodatno preverili, da začetni oligonukleotidine tvorijo sekundarnih struktur in dimerov. Sonde so označili po principu TaqMan®, kar pomeni, da so bile sonde na 5' koncu

označene s fluorescentnim poročevalnim barvilom 6-karboksifluorescein (FAM), na 3' koncu pa s fluorescentnim dušilcem 6-karboksi-tetrametilrodaminom (TAMRA). Kot referenčni gen smo uporabili gen za citokrom oksidazo (COX) (Weller in sod., 2000) (preglednica 2).

Preglednica 2: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov (FP, RP) in sond (S).

PVYO – S	TAYCCGTTGAAACCAATC
PVYO – FP	TGGATGGGAATGAACAAGTTGA
PVYO – RP	TGCCTAAGGGTTGGTTTTGC
PVYuni – S	TGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCA
PVYuni – FP	CATAGGAGAACTGAGATGCCAACT
PVYuni – RP	TGGCGAGGTTCCATTTTCA
COX – S	TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT
COX – FP	CGTCGCATTCCAGATTATCCA
COX – RP	CAACTACGGATATATAAGAGCCAA AACTG

3.5.3 Obratno prepisovanje (RT) in qPCR v enem koraku

Reakcijo RT-qPCR v enem koraku smo izvedli na inštrumentu ABI PRISM 9700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) v optičnih ploščicah s 384 luknjicami, ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems).

Za RT-qPCR v enem koraku smo uporabili komplet Brilliant QPCR Core Reagent Kit (Stratagene). Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz:

- 1 µl RNA,
- 1 µl pufra Core PCR,
- 1,1 µl 50 mM MgCl₂,
- 0,4 µl 20 mM dNTP-jev,
- 0,15 µl 0,1 mM referenčnega barvila ROX,
- 0,1 µl SureStart Taq DNA polimeraze,
- 0,4 µl M-MLV reverzne transkriptaze (Promega; 200U/µl, redčena 1 : 100),
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida forward,
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida reverse in
- 0,3 µl sonde.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 30 minut pri 48 °C. Nato je sledilo pomnoževanje pri univerzalnih pogojih: 2 minuti pri 50 °C in 10 minut pri 95 °C (aktivacija polimeraze), nato pa 40 ciklov po 10 sekund pri 95 °C in 1 minuto pri 60 °C.

V vsakem vzorcu smo analizirali amplikona PVYO in PVYuni ter amplikonom za referenčni gen COX, s katerim kontrolirali tudi pomnoževanje rastlinske RNA.

3.5.4 Obdelava podatkov qPCR

Podatke smo analizirali s programom LightCycler® 480 SW 1.5. Program je izrisal graf pomnoževanja produktov PCR, pri katerem je bilo število ciklov naneseno na os x, fluorescenca pa na os y. 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, smo imenovali Cq. Vrednosti Cq smo prenesli v program Excel (Microsoft, ZDA), v katerem smo analizirali izražanje izbranih genov. Najprej smo vstavili podatke za referenčne gene, nato za tarčne gene. Program smo uporabili za kontrolo kvalitete (odstopanja v vrednosti Cq med ponovitvami) in izračun povprečne Cq vrednosti med ponovitvami istega vzorca. Relativno količino virusne RNA smo izračunali iz razlik med vrednostjo Cq med tarčnim in referenčnim genom ($\Delta\Delta Cq$ metoda) ter jih antilogaritmirali (enačba 1).

$$X = 2^{(Cq_{COX} - Cq_{PVY})} \quad (1)$$

Iz izračunanih rezultatov smo v programu Excel (Microsoft ZDA) narisali grafe.

3.6 Elektronska mikroskopija

Homogenat smo vezali na bakrene mrežice za elektronsko mikroskopijo, ki so bile prevlečene s formavarjem in stabilizirane z ogljikom. Po petminutni inkubaciji smo mrežice sprali z vodo in virusne delce kontrastirali z 1-odstotno raztopino uranil acetata. Za vsak vzorec smo naredili po dve mrežici.

Količino virusnih delcev smo določili s presevnim elektronskim mikroskopom (transmission electron microscopy, TEM). Virusne delce smo opazovali z elektronskim mikroskopom (Philips CM 100, Eindhoven, Nizozemska) pri 80 kV. Slike smo zajeli s CCD kamero Bioscan v programu Digital Micrograph (Gatan Inc., Washington, DC).

Za vsak vzorec smo pogledali 10 kvadrantov na mrežici. Pri redčitveni vrsti smo pogledali obe mrežici za isti vzorec, pri vzorcih, pripravljenih iz okuženih rastlin, smo drugo mrežico istega vzorca pregledali le v primeru slabše kvalitete prve mrežice.

Podatke smo obdelali v programu Excel (Microsoft, ZDA).

3.7 Analiza podatkov

Podatke smo pridobile z metodami qPCR, ELISA in EM med sabo primerjali v programu Excel (Microsoft, ZDA). Velikost linearne povezanosti podatkov, pridobljenih s qPCR, ELISA in EM smo določili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (r), ki nam pove, kolikšna je linearna povezanost dveh spremenljivk (enačba 2).

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} \quad (2)$$

Koeficient lahko zavzame vrednosti med -1 in 1 . Pozitivna povezanost obstaja takrat, kadar so vrednosti prve (x) in druge (y) spremenljivke visoke. Tedaj je koeficient pozitiven. Negativna povezanost pa je takrat, kadar so vrednosti prve spremenljivke

visoke in vrednosti druge spremenljivke nizke oz. obratno. Tedaj je koeficient negativen. Bliže kot so vrednosti številu 1, močnejše sta spremenljivki povezani (Cramer, 1998).

Zaradi boljše preglednosti smo v nekaterih grafih uporabili \log_2 podatke vrednosti podatkov.

4 REZULTATI

Analizirali smo količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev z metodami qPCR, ELISA in EM v vzorcih izoliranega PVY^o in v vzorcih s PVY^o okuženih rastlinah tobaka ter določili razmerja med njimi.

4.1 Analiza izoliranega PVY^o

Z metodami qPCR, ELISA in EM smo analizirali vzorce izoliranega virusa PVY^o, kateremu smo dodali:

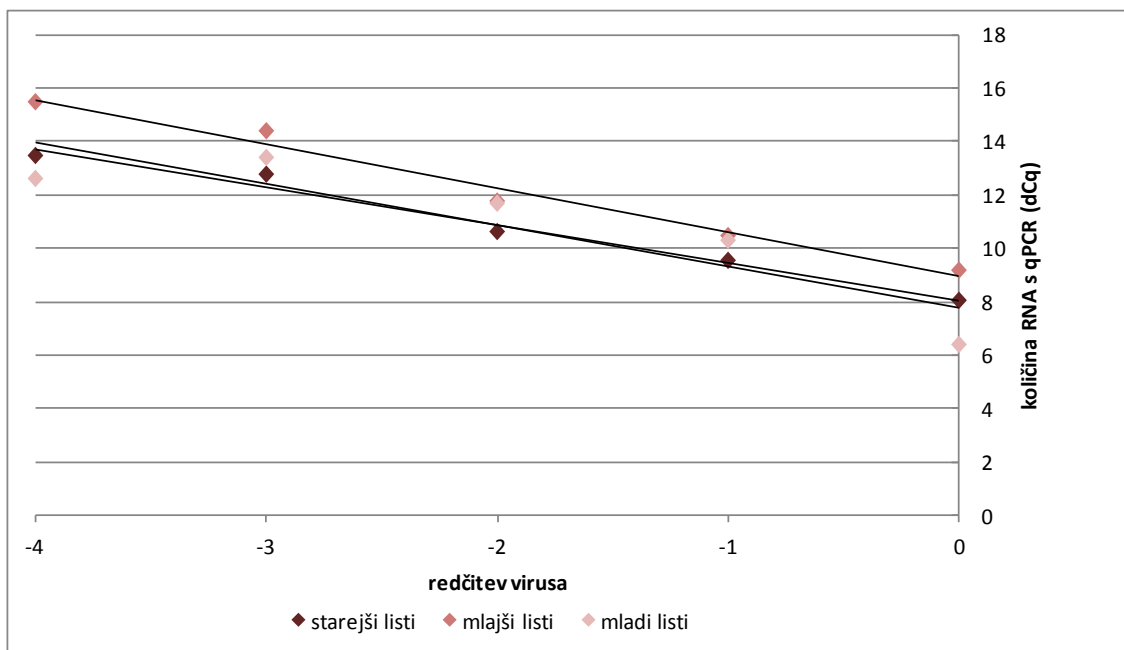
- velike spodnje starejše liste 10 tednov starih rastlin (starejši listi),
- manjše zgornje mlajše liste 10 tednov starih rastlin (mlajši listi),
- mlade liste 4 tedne starih rastlin (mladi listi).

S tem smo preverili vpliv starosti listov in rastlin na analize in naredili primerjavo občutljivosti uporabljenih metod.

Analiza vzorcev s qPCR je pokazala zelo podobne vrednosti C_q za referenčni gen citokrom oksidazo (COX) znotraj redčitvenih vrst (največja razlika je bila 1,0 C_q), kar smo pričakovali glede na zelo podobne količine rastlinskega materiala pri vseh vzorcih, in sicer zaradi enakega načina pobiranja rastlinskega materiala. Večje razlike smo dobili med redčitvenimi vrstami iz različnih tipov listov. Povprečna vrednost C_q za COX pri listih rastlin, velikih spodnjih starejših listih 10 tednov, starih rastlin je znašala 21,8, vrednost manjših zgornjih mlajših listov enako starih rastlin pa je znašala 19,6. Povprečna vrednost C_q za COX pri mladih listih 4 tednov starih rastlinah 23,3.

Za analizo količine virusne RNA smo uporabili metodo delta C_q (dC_q) med vrednostjo C_q za PVY in vrednostjo C_q za COX. Virusno RNA smo zaznali le v prvih petih redčinah, vrednost C_q je pri peti redčini znašala že 36,1, v nadaljnjih redčinah pa je bilo virusne RNA premalo, da bi jo s qPCR zaznali.

V celotnem območju, v katerem smo virusno RNA s qPCR zaznali, smo pri vseh treh tipih vzorcev dobili linearno odvisnost med količino dodanega virusa v vzorec in količino detektirane virusne RNA (slika 16). Pri vseh treh tipih vzorcev smo dobili tudi zelo visoke koeficiente korelacije ($r = 99,1, 99,0$ in $89,0$). Nakloni regresijskih premic so bili med vzorci iz vseh treh tipov listov zelo podobni ($k = -1,41, -1,65$ in $-1,55$), nekoliko pa so se razlikovala mesta križanja z osjo y ($n = 8,94, 8,06, 7,76$) (slika 16), kar lahko pripišemo nekoliko različni masi dodanega rastlinskega materiala, na kar kažejo razlike v povprečnih vrednostih C_q za COX pri različnih tipih vzorcev.

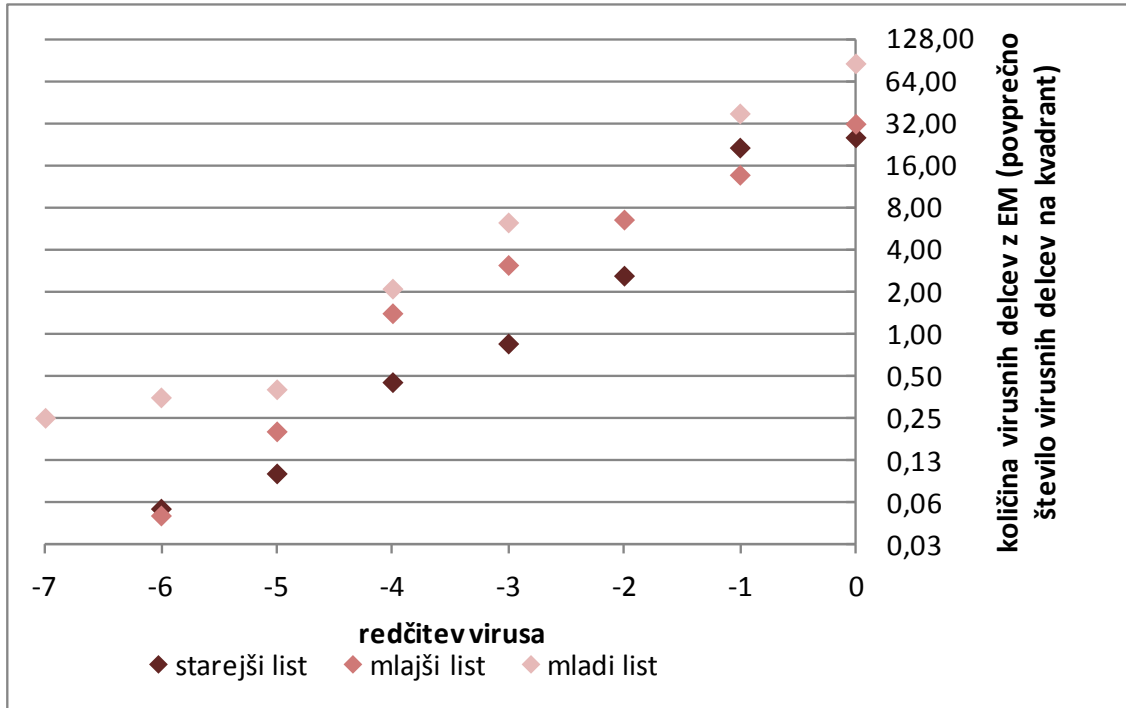


Slika 16: Količina RNA izmerjena s qPCR pri različnih redčitvah PVY. Prikazana je dCq med amplikonoma PVY⁰ in COX. 0, -1, -2, -3, -4 predstavlja redčenje 2⁰, 2⁻¹, 2⁻², 2⁻³, 2⁻⁴.

Pri analizi vzorcev s testom ELISA pri vseh treh redčitvenih vrstah virusnih plaščnih proteinov nismo zaznali pri nobeni redčini (niti pri najbolj koncentriranih vzorcih).

Virusne delce smo z EM pri vseh treh redčitvenih vrstah zaznali v prvih sedmih redčinah, pri eni redčitveni vrsti pa še v osmi redčini. V območju prvih sedmih redčin smo pri vseh treh tipih vzorcev dobili linearno odvisnost med količino dodanega virusa v vzorec in količino detektiranih virusnih delcev (slika 17). Pri vseh treh tipih vzorcev smo dobili visoke koeficiente korelacije ($r = 80,4, 82,5$ in $84,8$). Nakloni regresijskih premic so bili med vzorci iz vseh treh tipov listov zelo podobni, smo pa v vseh točkah redčitve vrste zaznali rahle razlike v številu virusnih delcev med različnimi tipi vzorcev, pri čemer je bilo večinoma največ virusnih delcev v vzorcih mladih listov 4 tedne starih rastlin in najmanj virusnih delcev v vzorcih starejših listov 10 tednov starih rastlin.

Iz tega lahko zaključimo, da ima velikost, lega in starost listov minimalen vpliv na analizo količine virusne RNA s qPCR in virusnih delcev z EM.

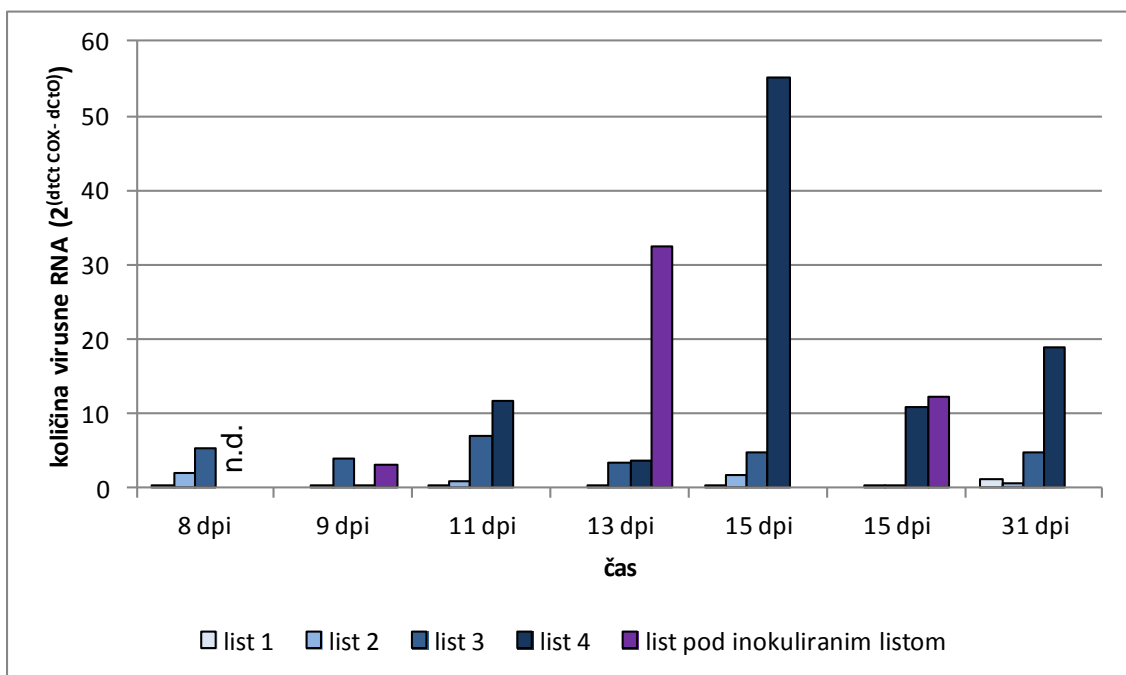


Slika 17: Število virusnih delcev določenih z EM pri različnih redčitvah PVY⁰. 0, -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, predstavlja redčenje 2⁰, 2⁻¹, 2⁻², 2⁻³, 2⁻⁴, 2⁻⁵, 2⁻⁶, 2⁻⁷

4.2 Analiza količine virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev v s PVY^O okuženih rastlinah tobaka

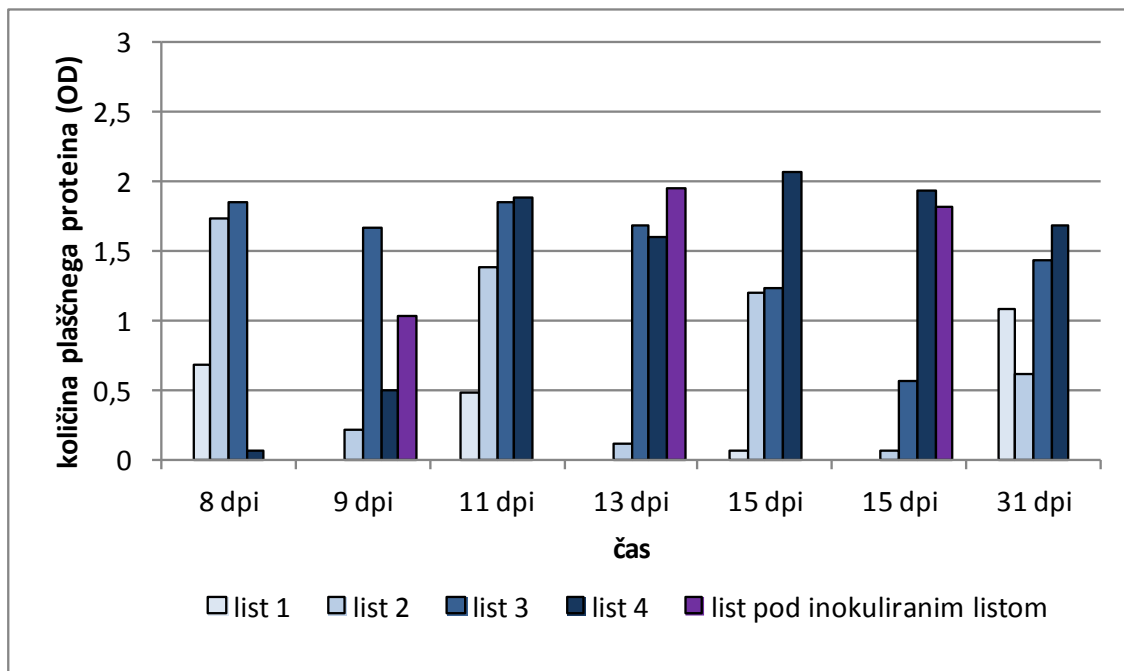
Količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev smo s qPCR, ELISA in EM analizirali v listih rastlin tobaka, ki so bile okužene različno število dni. Na vsaki testni rastlini smo analizirali 4 liste (sliki 12 in 13).

Opazili smo trend večje količine virusne RNA v listih, ki so bili bliže inokuliranim listom. Količina virusne RNA je do trinajstega dneva po okužbi rastlin tobaka naraščala in dosegla največje vrednosti med trinajstim in petnajstim dnevom po okužbi (slika 18).



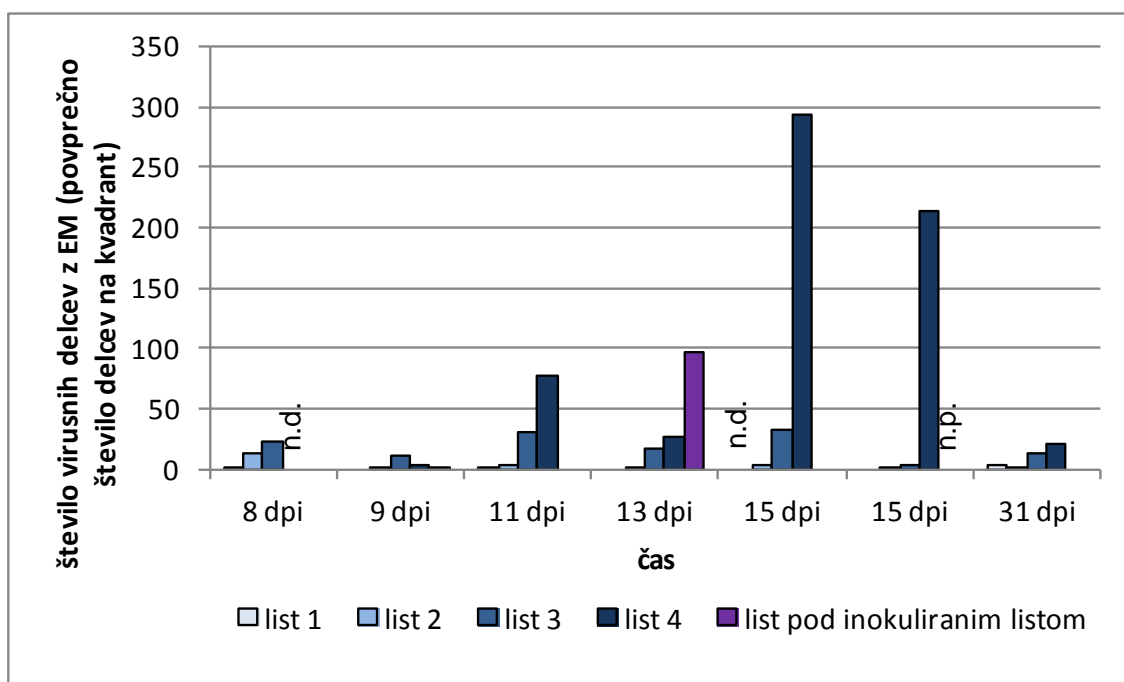
Slika 18: Količina virusne RNA v različnih listih v različnem času po okužbi (dpi), zmerjena s qPCR. N.d – ni virusne RNA.

Količina virusnega plaščnega proteina izmerjena s testom ELISA je pokazala enak trend kot količina virusne RNA. Listi bliže inokuliranim listom so imeli večjo količino plaščnega proteina v primerjavi z bolj oddaljenimi listi (slika 19).



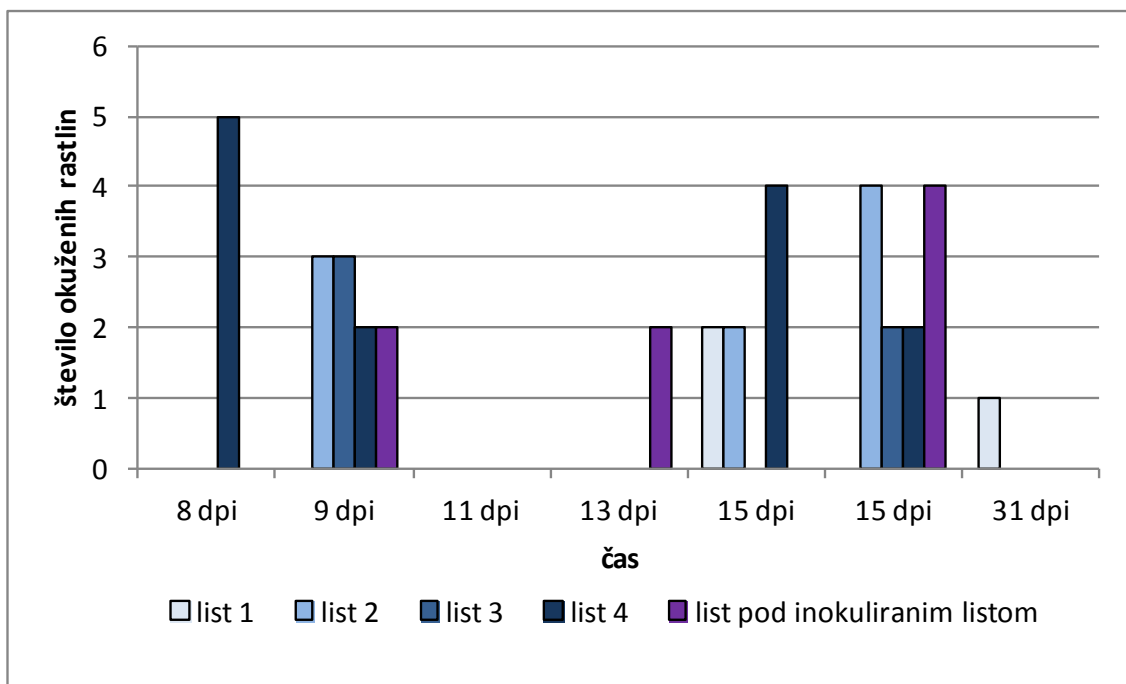
Slika 19: Količina plaščnega proteina v različnih listih v različnem času po okužbi (dpi), zmerjena s testom ELISA. OD – optična gostota (optical density).

Tudi podatki o količini virusnih delcev pridobljeni z EM, so pokazali trend večjega števila virusnih delcev v listih bližje inokuliranim listom. Število virusnih delcev je, tako kot količina virusne RNA, do trinajstega dneva po inokulaciji naraščalo in doseglo največjo vrednost petnajst dpi. V kasnejšem času po okužbi je bilo število virusnih delcev manjše (slika 20).



Slika 20: Število virusnih delcev v različnih listih v različnem času po okužbi (dpi), prešteto z EM. N. p. - ni podatka, n. d. - ni virusnih delcev.

Na istih listih, v katerih je bila analizirana količina virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev, so se hranile tudi listne uši, ki smo jih po hranjenju prenesli na zdrave rastline tobaka, ki so bile nato analizirane na prisotnost PVY. Uspešnost prenosa virusa z listnimi ušmi je bila nizka, iz nobenega od preiskovanih listov listne uši niso prenesle virusa na vseh 6 zdravih rastlin. Iz 14 listov so uši prenesle virus na 1 do 5 od šestih zdravih rastlin. Iz kar 14 listov pa uši niso uspele prenesti virusa na nobeno od šestih zdravih rastlin tobakov(slika 21).



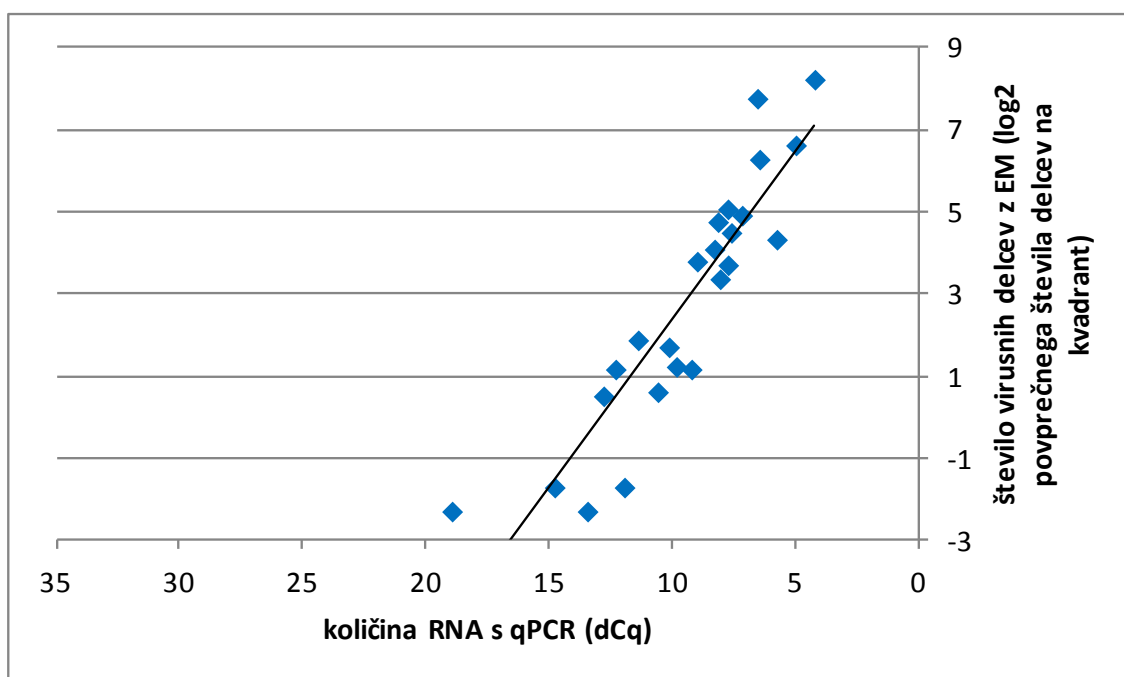
Slika 21: Število okuženih rastlin po prenosu virusa z listnimi ušmi, ki so se hranile na različnih listih v različnem času po okužbi (dpi).

4.3 Razmerje med količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev v s PVY^O okuženih rastlinah

V vsakem izmed analiziranih listov smo analizirali razmerje med količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev.

Pri primerjavi količine virusnih delcev, zmerjene z EM, in virusne RNA, zmerjene s qPCR, smo opazili, da je bila v primeru večje količine RNA tudi količina virusnih delcev večja. Odvisnost količine virusnih delcev od količine RNA je bila linearna (slika 22). Med količino RNA in številom virusnih delcev smo določili visok korelacijski koeficient ($r = 89,5$).

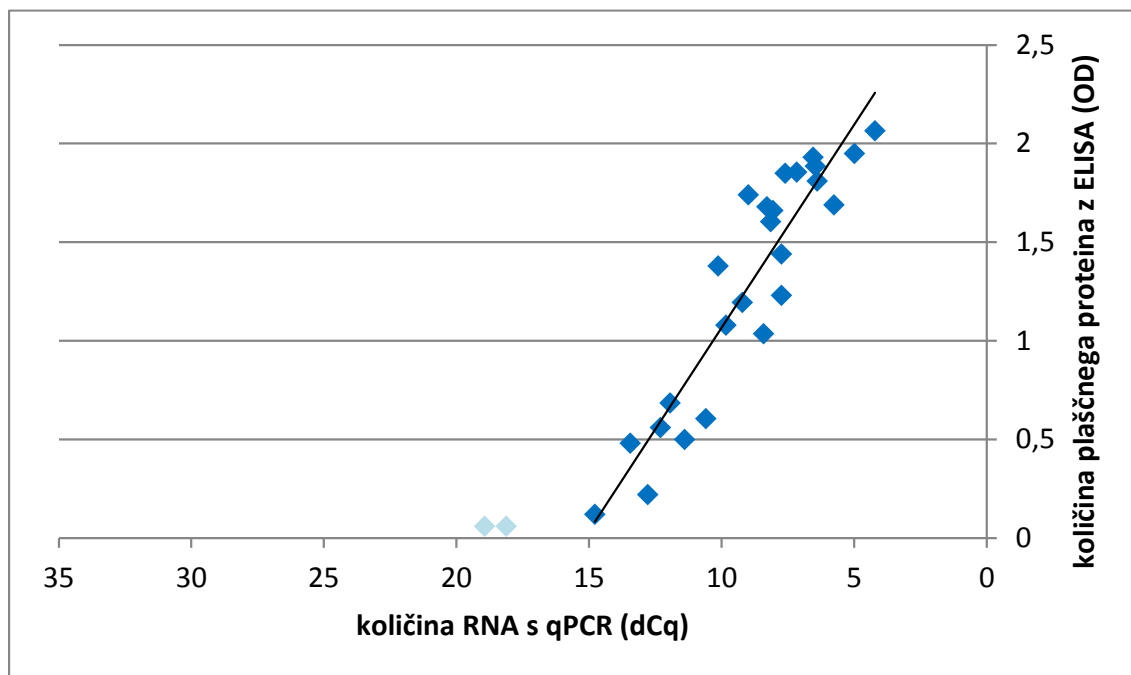
Virusne RNA nismo zaznali v enem vzorcu. Virusnih delcev nismo zaznali v dveh vzorcih in sicer v istem vzorcu kot virusne RNA in v vzorcu s povprečno Cq vrednostjo za amplikon PVYO 25,3 Cq.



Slika 22: Razmerje med količino virusne RNA in številom virusnih delcev. Prikazane so \log_2 vrednosti števila virusnih delcev in razlika med vrednostma Cq za amplikona PVYO in COX.

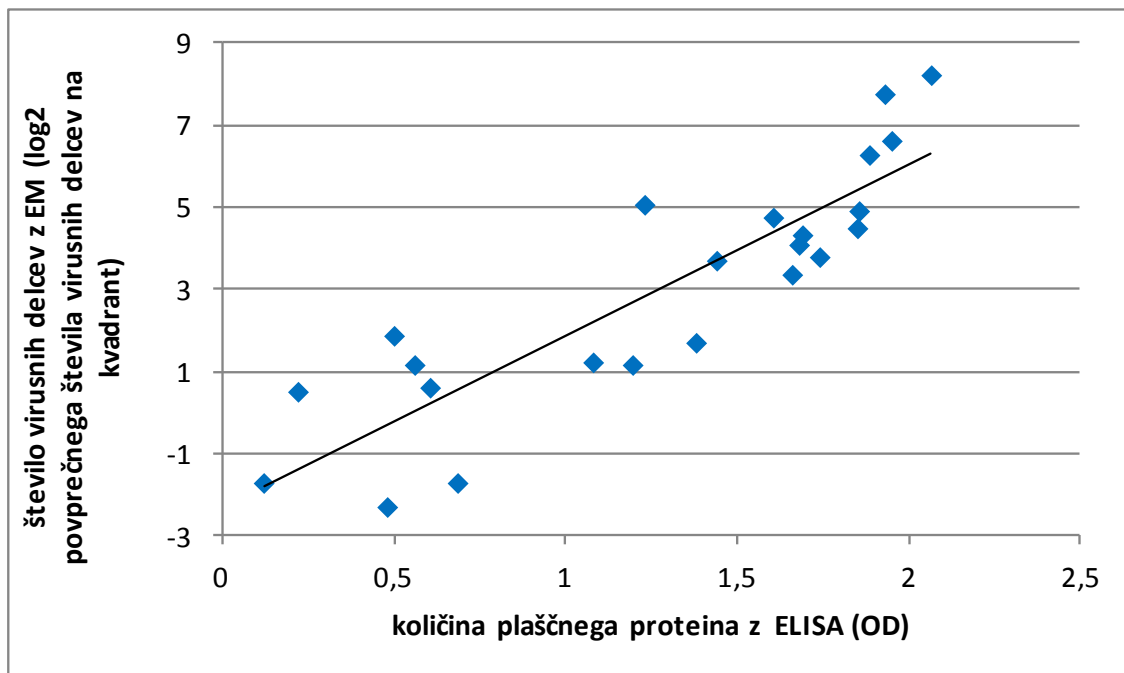
Podobno kot število virusnih delcev je bila tudi količina plaščnega proteina pri večji količini virusne RNA večja. Odvisnost količine plaščnega proteina od količine virusne RNA je bila linearna. Med količino virusne RNA in količino plaščnega proteina smo določili visok korelacijski koeficient ($r = 91,9$) (slika 23).

Virusnega plaščnega proteina nismo zaznali v istem vzorcu kot virusne RNA poleg tega pa še v vzorcih s povprečnimi Cq vrednostmi za amplikon PVYO 25,7 Cq in 25,3 Cq (na sliki 23 označeni s svetlo modro).



Slika 23: Razmerje med količino virusne RNA (razlika med vrednostmi Cq za amplikona PVYO in COX) in količino virusnega plaščnega proteina.

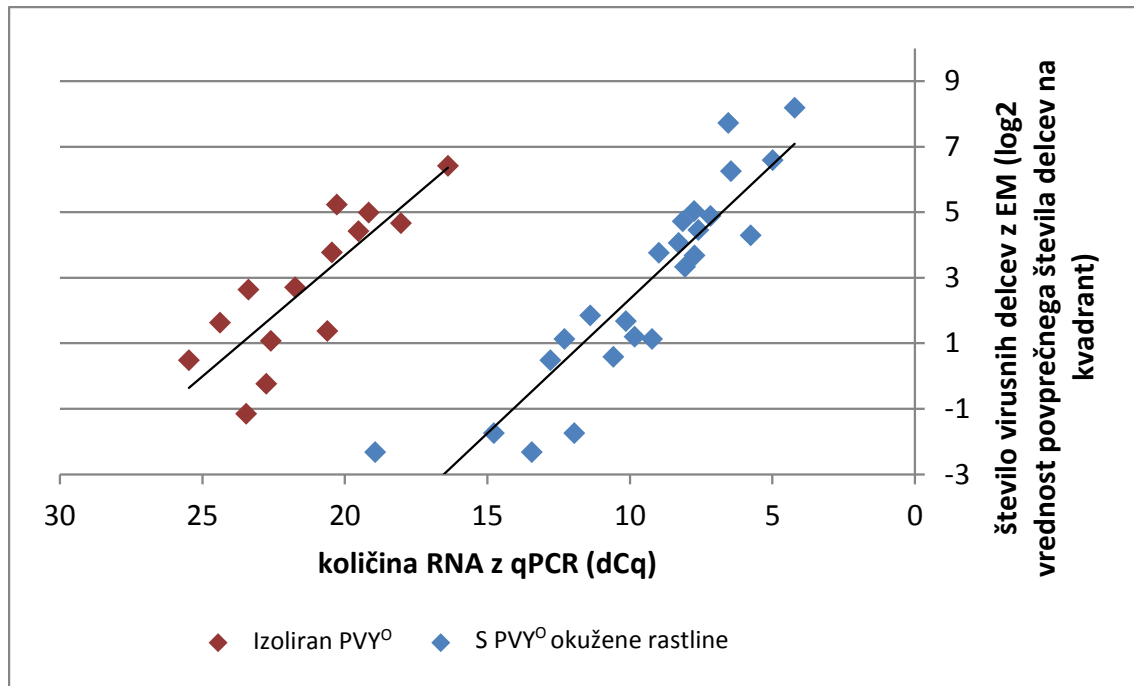
Količina virusnih delcev je bila prav tako višja v primeru večje količine plaščnega proteina. Količina plaščnega proteina je bila v treh vzorcih pod detekcijo, medtem ko je bila količina virusnih delcev v dveh istih vzorcih pod detekcijo, v enem pa je bilo število 0,2 virusnih delcev na kvadrant. Visok korelacijski koeficient ($r = 85,5$) je pokazal na veliko linearno odvisnost med količino plaščnega proteina in številom virusnih delcev (slika 24).



Slika 24: Razmerje med količino plaščnega proteina in številom virusnih delcev. Prikazane so \log_2 vrednosti števila virusnih delcev.

4.4 Primerjava razmerja med virusno RNA in virusnimi delci v s PVY^o okuženih rastlinah in izoliranem PVY^o

Razmerje med virusno RNA in virusnimi delci smo primerjali v s PVY^o okuženih rastlinah in v izoliranem PVY^o. V obeh primerih sta imeli regresijski premici podoben naklon ($k = -0,82, -0,74$) zelo pa sta se razlikovali v mestih križanja z osmi ($n = 10,55, 18,54$). Iz tega sledi, da je bilo pri enaki količini virusnih delcev okuženi s PVY^o, okuženi rastlinah veliko več kopij virusne RNA kot pri izoliranem virusu PVY^o. Preračunano iz enačb premic je znašala razlika približno 12 Cq, kar pomeni približno 4.000-krat. To pomeni, da je bilo v okuženih rastlinah poleg vsake kopije virusne RNA, vključene v virusni delec, še približno 3.999 prostih molekul RNA (slika 25).



Slika 25: Razmerje med virusno RNA in virusnimi delci v okuženih rastlinah in izoliranem PVY⁰. Prikazana je dCq med amplikonoma PVY⁰ in COX za izoliran PVY⁰. in dCq za amplikon PVYO in COX pri okuženih rastlinah.

5 RAZPRAVA

5.1 Analiza izoliranega PVY^o

Da smo preverili uporabnost metod qPCR, ELISA in EM za določanje količine virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev smo pripravili redčitvene vrste PVY^o z znanimi relativnimi količinami izoliranega virusa. Pri vseh redčitvenih vrstah smo dobili izjemno visoke korelacijske koeficiente (od 88,6 do 99,1) med dodano količino virusa v vzorec in izmerjeno količino virusne RNA oz. številom virusnih delcev ter izredno majhna odstopanja od regresijskih premic, kar potrjuje veliko natančnost in uporabnost metod qPCR za določanje količine virusne RNA in EM za določanje števila virusnih delcev.

Da smo zagotovili primerljivost analize izoliranega virusa z analizo s PVY^o okuženih rastlin smo redčinam izoliranega PVY^o dodali rastlinski material odvzet iz zdravih rastlin tobaka. Ker smo pri s PVY^o okuženih rastlinah analizirali različne liste (različno velike, različno stare in z različno lego na rastlini), smo tudi izoliranemu PVY^o dodali tri tipe listov:

- velike spodnje starejše liste 10 tednov starih rastlin (starejši listi),
- manjše zgornje mlajše liste 10 tednov starih rastlin (mlajši listi) in
- mlade liste 4 tedne starih rastlin (mladi listi)

in tako pripravili tri redčitvene vrste. Analiza vzorcev s qPCR je pokazala zelo podobne vrednosti C_q za referenčni gen citokrom oksidazo (COX) znotraj redčitvenih vrst in nekoliko večje razlike med redčitvenimi vrstami iz različnih tipov listov. Pri listih 10 tednov starih rastlin smo dobili nižji povprečni vrednosti C_q za COX (pri velikih spodnjih starejših listih 21,8 ter pri manjših zgornjih mlajših listih 19,6) kot pri mladih listih 4 tednov starih rastlin (23,3), kar pomeni, da smo pri listih 10 tednov starih rastlin izmerili večje število kopij mRNA za COX kot pri listih 4 tednov starih rastlin. To si razlagamo s tem, da so imele 4 tedne stare rastline tanjše liste, s tem pa smo pri enaki površini vzorca (vzorci so bili odvzeti s pokrovčkom mikrocetrifugirke) vzeli manjšo maso vzorca. Razlik med povprečnimi vrednostmi C_q za COX med mlajšimi in starejšimi listi 10 tednov starih rastlin ne moremo pojasniti na enak način, kajti pri tanjših mlajših listih smo izmerili večje število kopij mRNA za COX (povprečna vrednost C_q za COX 19,6) kot pri starejših debeljših listih (povprečna vrednost C_q za COX 21,8). Ta razlika bi bila lahko posledica različno učinkovite izolacije RNA ali reverzne transkripcije, kajti pri različno starih listih pričakujemo različno metabolno aktivnost in posledično tudi metabolno sestavo, ki pa lahko vpliva na učinkovitost izolacije RNA in reverzne transkripcije.

Različna sestava rastlinskega soka bi bila lahko razlog tudi za različno učinkovito prijemanje virusnih delcev na mrežice za elektronsko mikroskopijo, kajti pri vzorcih mladih listov 4 tedne starih rastlin, ki so bili na otip in videz različni od listov 10 tednov starih rastlin, je bilo na mrežici nekoliko več virusnih delcev kot pri vzorcih 10 tednov starih rastlin.

Razlike, ki smo jih dobili med tremi redčitvenimi vrstami iz različnih tipov listov, so bile kljub vsemu relativno majhne, zato lahko zaključimo, da ima velikost, lega in starost listov minimalen vpliv na analizo količine virusne RNA s qPCR in virusnih delcev z EM ter da lahko metodi qPCR in EM uporabimo za analizo količine virusne RNA oz. virusnih delcev v okuženih rastlinah.

Virusni izolat PVY^O, ki so ga predhodno pripravili na INRA, Rennes, Francija, je proti pričakovanjem vseboval zelo nizko koncentracijo virusa. Posledično smo s qPCR virusno RNA zaznali le v prvih petih redčinah, to je le do 16-kratnega redčenja. S testom ELISA virusnega plaščnega proteina nismo zaznali niti pri najbolj koncentriranih vzorcih, kar se sklada z ugotovitvami Kogovšek in sodelavcev (2008), ki so pokazali, da je qPCR lahko tudi do 10⁷-krat bolj občutljiv od testa ELISA.

Literaturni podatki za vzorce iz okuženih rastlin navajajo podobno občutljivost metod ELISA in EM (Biel in Gelderblom, 1999) ter do 10⁵-krat boljše občutljivost qPCR od EM (Kogovšek in sod. 2008). V naši raziskavi smo pokazali, da za virusni izolat te ugotovitve ne držijo, saj je v virusnem izolatu razmerje med številom virusnih delcev in številom molekul virusne RNA oz. virusnega plaščnega proteina drugačno kot v okuženih rastlinah. Pri virusnem izolatu smo celo obratno pokazali 4-krat (dve točki redčitvene vrste) boljše občutljivost metode EM od qPCR.

5.2 Analiza količine virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev v s PVY^O okuženih rastlinah tobaka

Količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev smo s qPCR, ELISA in EM analizirali v listih rastlin tobaka, ki so bile okužene različno število dni. Na vsaki testni rastlini smo analizirali 4 liste. Tako smo za analize uporabili liste, ki so vsebovali različne količine virusa. Opazili smo trend večje količine virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev v listih, ki so bili bližje inokuliranim listom. Podobni trendi količin virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev kažejo na to, da na mestih, kjer prihaja do sinteze virusne RNA, prihaja tudi do sinteze virusnih proteinov in sestavljanje virusnih delcev.

Podobno je bilo pokazano tudi s študijo kopičenja virusnih delcev (z EM) in virusne RNA (s qPCR) PVY^{NTN} v rastlinah krompirja. Ugotovili so, da je bila največja količina virusne RNA v listih z bolezenskimi znamenji, stebli in koreninah ter v listnem peclju lista z znaki staranja. Največja količina virusnih delcev pa je bila najdena v listnem peclju lista z znaki staranja ter v centralnem strženu stebela (Kogovšek in sod., 2010). Zaradi razlik v količini virusne RNA in virusnih delcev PVY^{NTN} v žilah in lamili listov (Kogovšek in sod., 2010), smo pri pobiranju rastlinskega materiala pazili, da nismo vzeli listne žile.

Širjenje virusa po rastlini je zaradi smeri floemskega toka povezano s širjenjem fotoasimilantov, to je sladkorjev, ki nastajajo v listih, ki aktivno fotosintetizirajo in potujejo v liste, ki te sladkorje porabljajo (Mas in Pallas, 1996). Podobno kot se sladkorji v splošnem prenašajo iz spodnjih listov v korenine in iz zgornjih listov v razvijajoče poganjke, je širjenje virusov odvisno od položaja okuženih listov, ki delujejo kot izvor za nadaljnjo sistemsko okužbo (Gilbertson in Lucas, 1996). Tudi pri naših vzorcih smo opazili trend, da so vsebovali listi bližje inokuliranim listom več virusa.

5.3 Razmerje med količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev v s PVY^O okuženih rastlinah

V vsakem izmed analiziranih listov smo analizirali razmerje med količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev z metodami qPCR, ELISA in EM. Med količinami virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev smo izračunali

visoke koeficiente korelacij ($r = 89,5$, $r = 91,9$ in $r = 85,5$) in opazili majhna odstopanja vzorcev od regresijskih premic, kar je pokazalo, da je razmerje med količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev v okuženih rastlinah konstantno. Z drugimi besedami to pomeni, da je v okuženih rastlinah v listih, v katerih je več virusne RNA ali virusnega plaščnega proteina, tudi več virusnih delcev. Pri znanem razmerju med količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev pa lahko iz količine virusne RNA ali količine plaščnega proteina sklepamo kakšna količina virusnih delcev je prisotna. To je zelo pomembna ugotovitev za študije prenosa virusa z listnimi ušmi, saj je znano, da so za prenos z listnimi ušmi potrebni virusni delci, z najpogosteje uporabljenimi metodami za detekcijo PVY (qPCR in ELISA) pa določamo količino virusne RNA oz. virusnega plaščnega proteina. Pri vzorcih, v katerih smo določili najnižje količine virusne RNA z metodo qPCR, je bila količina virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev pod mejo detekcije, kar se sklada z meritvami občutljivosti metod drugih avtorjev (Kogovšek in sod., 2008), ki so pri okuženih rastlinah ugotovili večjo občutljivost metode qPCR v primerjavi z metodama ELISA in EM.

Proti pričakovanjem v naši raziskavi nismo našli povezave med količino virusnih delcev v listih, na katerih so se hranile listne uši, in številom zdravih rastlin, na katere smo listne uši prestavili po hranjenju na okuženih rastlinah, ki so jih listne uši okužile. Možen razlog za odsotnost povezave bi lahko bil v različni velikosti in vitalnosti uporabljenih listnih uši.

5.4 Primerjava razmerja med virusno RNA in virusnimi delci v s PVY⁰ okuženih rastlinah in izoliranem PVY⁰

Razmerje med količino virusne RNA in virusnih delcev smo primerjali v s PVY⁰ okuženih rastlinah in v izoliranem PVY⁰. V obeh primerih smo izračunali visoke koeficiente korelacij med količino virusne RNA in virusnih delcev, kar pomeni, da je bilo razmerje med količino virusne RNA in virusnih delcev tako v s PVY⁰ okuženih rastlinah kot tudi v izoliranem PVY⁰ po celotnem merjenem koncentracijskem območju konstantno. Zelo pa sta se regresijski premici pri s PVY⁰ okuženih rastlinah in pri izoliranem PVY⁰ razlikovali v mestih križanja z osmi, kar kaže na razliko v razmerju med količino virusne RNA in virusnih delcev v s PVY⁰ okuženih rastlinah in izoliranem PVY⁰. Je pa bila razlika v razmerju po celotnem merjenem koncentracijskem območju konstantna, kar se je pokazalo v podobnem naklonu regresijskih premic.

V izoliranem virusu je bilo razmerje med količino virusne RNA in količino virusnih delcev manjše v primerjavi z virusom v rastlini. V izoliranem virusu z metodo klasične izolacije iz začetnega rastlinskega materiala osamimo samo virusne delce, ostale virusne in rastlinske komponente pa v veliki meri odstranimo, saj postopek klasične izolacije virusa med drugim vsebuje serijo zaporednih centrifugiranj (med njimi tudi ultracentrifugiranj v gradientu saharoze) in precipitacij. Tako v izoliranem virusu ostane samo tista RNA, ki je vključena v virusne delce, večino proste RNA pa med postopkom izolacije odstranimo. V rastlinah pa je poleg virusne RNA, ki je vključena v virusne delce, prisotna še prosta virusna RNA, saj se v rastlini virus pomnožuje (Agrios, 1997). Z našimi analizami smo pokazali, da v rastlinskih celicah poleg novo nastalih virusnih delcev ostane še veliko proste virusne RNA. Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da je bilo poleg vsake molekule virusne RNA, ki je bila vključena v virusni delec PVY⁰ v rastlini še približno 4.000 prostih molekul virusne RNA.

6 ZAKLJUČKI

Z uporabo redčitvenih vrst izoliranega virusa smo pokazali visoko korelacijo med dodano količino virusa v vzorec in izmerjeno količino virusne RNA oz. številom virusnih delcev. S tem smo potrdili veliko natančnost in uporabnost metod qPCR za določanje količine virusne RNA in EM za določanje števila virusnih delcev.

V listih s PVY^O okuženih rastlin smo opazili večje količine virusne RNA, plaščnega proteina in virusnih delcev v listih bliže inokuliranim listom.

Uspešno smo vpeljali metodo določanja razmerja med virusno RNA, virusnim plaščnim proteinom in virusnimi delci. V celotnem preiskovanem koncentracijskem območju smo zaznali linearno odvisnost med količino virusne RNA, virusnega plaščnega proteina in virusnih delcev ter izračunali visok korelacijski koeficient med količino virusne RNA, količino plaščnega proteina ter številom virusnih delcev. S tem smo pokazali, da pri okuženih rastlinah iz izmerjene količine virusne RNA ali plaščnega proteina lahko sklepamo na količino virusnih delcev, prisotnih v rastlini.

Ugotovili smo, da je količina virusne RNA v primerjavi s številom virusnih delcev v okuženem rastlinskem tkivu približno 4.000-krat večja kot pri izoliranem virusu.

7 VIRI

1. Acosta, O., Barker, H., Mayo, M. A. 1999. Prospect for improving virus resistance of potato crops in Colombia by transgenic technology. *Fitopatologia Colombiana*, 18, 1: 66–77.
2. Agrios, G. N. 1997. *Plant pathology*. 4th ed. London, Academic Press: 479–518.
3. Arends, P., Kus, M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj, Mercator – KŽK Kmetijstvo. Kranj, Laboratorij za fiziologijo in virusne bolezni.
4. Biel, S. S., Gelderblom, H. R. 1999. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *Journal of Clinical virology*, 13: 105–119.
5. Bozzola, J. J., Russell, D. L. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*.
6. Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., Zurcher, E. J. 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Potato Y potyvirus. Version: 20th August 1996.
7. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 3: 597–666.
8. 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.
9. Cramer, D. 1998. *Fundamental Statistics for Social Research. Step-by-step calculations and computer techniques using SPSS for Windows*. London and New York: Routledge.
10. Crowther, J. R. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). V: *Molecular bio methods handbook*. Walker, J. K., Rapley, R. (ed.) Humana Press: 595–617.
11. De Bokx, J. L., Huttinga, H. 1981. Potato virus Y. V: *Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists Description of Plant Viruses*. Surrey, Commonwealth Mycological Institute: 242: str 6.
12. Deng, D., McGrath, P. F., Robinson, D. J., Harrison, B. D. 1994. Detection and differentiation of Whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology*, 125: 327–336.
13. Freeman, W. M., Walker, S. J., Vrana, K. E. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *Bio Techniques*, 26: 112–125.
14. Gachon, C., Mingam, A., Bénédicte, C. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies. *Journal of Experimental Botany*, 55, 402: 1445–1454.
15. Gilbertson, R. L., Lucas, W. J. 1996. How do viruses traffic on the 'vascular highway'? *Trends in Plant science*, 1, 8: 260–269.

16. Giulietti, A., Overberg, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 4: 386–662.
17. Glais, L., Tribodet, M., Kerlan, C. 2005. Specific detection of the PVY^N – W variant of *Potato virus Y*. *Journal of Virological Methods* 125: 131–136.
18. Hinricsh - 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.
19. Hooks, C. R. R., Fereres, A. 2006. Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses: A review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus Research*, 120: 1–16.
20. Hull, R. 1990. Virus resistant plants – potential and risk. *Chemistry and Industry*, 17: 543–546.
21. Jacquot, E., Tribodet, M., Croizat, F., Balme - Sinibaldi, V., Kerlan, C. 2005. A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of YO and YN isolates of Potato virus Y (PVY). *J. Virol. Methods*, 125, 1: 83–93.
22. Kerlan, C., Nikolaeva, O. V., Hu, X., Meacham, T., Gray, S. M., Karasev, A. V. 2011. Identification of the Molecular Make-Up of the Potato virus Y Strain PVY^Z: Genetic Typing of PVY^Z-NTN. *Phytopathology* 101, 9: 1052–1060.
23. Kogovšek, P., Kladnik, A., Mlakar, J., Žnidarič Tušek, M., Dermastia, M., Ravnikar, M., Novak Pompe, M. 2010. Distribution of *Potato virus Y* in Potato Plant Organs, Tissues and Cells. *Phytopathology*. 101, 11: 1292–1300.
24. Kogovšek, P., Gow, L., Pompe – Novak, M., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N., Ravnikar, M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods* 149: 1–11.
25. Kumar, S., Reed, M. W., Gamper, H. B. Jr., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Foti, M., West, J., Meyer, R. B. Jr., Schweitzer, B. I. 1998. Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acid Research*, 26, 3: 831–838.
26. Kus, M. 1995. Investigations of sensitivity of potato cultivars to tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}). *EAPR Virology section Meeting Bled*, 18–22 : 135–138.
27. Kus, M., 1994. *Krompir*. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 107–115.
28. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-ΔΔC(T))} method. *Methods*, 25, 4: 402–408.
29. Mackay, I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190–212.
30. Mas, P., Pallas, V. 1996. Long-distance movement of cherry leaf roll virus in infected tobacco plants. *Journal of General Virology*, 77, 3: 531–540.

31. Matthews, R. E. F. 1992. *Fundamentals of plant virology*. London, Academic Press, Inc., 403 str.
32. 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.
33. Mehle, N., Kovač, M., Petrovič, N., Novak Pompe, M., Baebler, Š., Stres Krečič, H., Gruden, K., Ravnikar, M. 2004. Spread of potato virus YNTN in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 6: 293–300.
34. Mumford, R., Skelton, A., Metcalfe, E., Walsh, K., Boonham, N. 2004. The reliable detecton of Barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan(R9)). *Journal of Virological Methods*, 117, 2: 153–159.
35. Murphy, A. M., Chivasa, S., Singh, D. P., Carr, J. P. 1999. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends in Plant Science*, 4: 155–160.
36. Newton, C. R., Graham, A. 1994. *PCR-polymerase chain reaction*. Oxford, Bios Scientific Publishers: 9–53.
37. Nolan, T., Hands, E., Bustin, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, *Nature Protocols*, 1, 3: 1559–1582.
38. Pernezny, K., Roberts, P. D., Murphy, J. F., Goldberg, N. P. 2003. *Compendium of pepper diseases*. St. Paul, The American Phytopathological Society: 63 str.
39. Pfaffl, M. V. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002–2007.
40. 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.
41. Urcuqui - Inchima, S., Haenni, A.L., Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74: 157–175.
42. Valasek, M. A., Repa, J. J. 2005. The power of real-time PCR, *Adv. Physiol. Educ.*, 29: 151–159.
43. Valkonen, J. P. T. 1997. Novel resistances to four potyviruses in tuber-bearing potato species and temperature-sensitive expression of hypersensitive resistance to potato virus Y. *Annals of Applied biology*, 130: 91–104.
44. Vandesompele, J., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Elimiation of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green 1 real -time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*. 303: 95–98.
45. Walker, N. J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296: 557–559.
46. Walkey, D. G. A. 1985. *Applied plant virology*. 1st ed. London, William Heinemann Ltd: 61–92.
47. Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., Stead, D. E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-

time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.

48. Wong, M. L., Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 1: 75–85.