

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**RAZISKAVE VPLIVA ČASA OKUŽBE RASTLIN  
KROMPIRJA S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y NA POTEK  
BOLEZNI**

DIPLOMSKO DELO

**Maja Švigelj**

Mentor: doc. dr. Maruša Pompe Novak

Nova Gorica, 2013

## **IZJAVA**

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

Maja Švigelj

## ZAHVALA

Diplomsko delo je bilo opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc.dr. Maruši Pompe Novak za vse nasvete, znanje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Najlepše se zahvaljujem tudi mag. Neži Turnšek in dr. Magdi Tušek Žnidarič za ves trud in pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Posebej se zahvaljujem svoji mami, ki mi je vedno stala ob strani in me spodbujala.

## POVZETEK

Krompirjev virus Y (Potato virus Y, PVY) je najpomembnejši virus v gojenih krompirjevih nasadih po vsem svetu in povzroča veliko škode na pridelku. Sodi v rod *Potyvirus* in družino *Potyviridae*. Obstaja veliko različkov PVY, ki na različno občutljivih sortah krompirja povzročajo različna bolezenska znamenja. Najbolj nevaren je različek PVY<sup>NTN</sup>, ki na občutljivih sortah povzroča bolezen obročkasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD). V Sloveniji se je PVY<sup>NTN</sup> prvič pojavil leta 1988 in se od tedaj razširil po vsej Sloveniji. Sorte krompirja so za okužbo s PVY<sup>NTN</sup> različno dovzetne. Virus se prenaša večinoma z listnimi ušmi, lahko pa tudi mehansko. Rastlinski imunski odziv je strogo nadzorovan z namenom učinkovite obrambe proti patogenim organizmom in je uravnavan z abiotskimi dejavniki, kot so svetloba, vlažnost, cirkadiani ritem, temperatura in drugi. Cirkadiani ritmi izhajajo iz biološke ure organizma in so odgovor na 24-urne spremembe v fizičnem okolju, ki so povezani z dnevom in nočjo in delujejo tudi, kadar je rastlina prikrajšana za zunanja časovna znamenja. Cirkadiana ura je ključnega pomena za nadzor različnih fizioloških dejavnosti in izražanja genov. Transkripcijske povratne zanke igrajo pomembno vlogo cirkadiane ure za molekularni ravni. Raziskovali smo vpliv okužbe rastlin sorte Désirée in Igor z virusom PVY<sup>NTN</sup> ob različnih časih tekom dneva. Opazili smo različen odziv rastlin sorte Désirée in Igor na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> ob različnih časih tekom dneva. Pri okuževanju ob različnih urah so bila nekatere dni po okuževanju bolezenska znamenja različno izražena oziroma so se začela izražati po različnem številu dni po okuževanju. V splošnem je okužba s PVY<sup>NTN</sup> rastlin krompirja sort Igor in Désirée ob 14h in ob 20h v začetnih dnevih po okužbi povzročila pojavljanje bolezenskih znamenj na večjem deležu listov kot okužba ob 8h. Izjema je bilo povprečno število točkastih nekroz na list pri sorti Igor, saj je bilo pri rastlinah okuženih ob 20h večje kot pri rastlinah okuženih ob 14h. V kasnejšem poteku bolezni se je delež listov z bolezenskimi znamenji pri rastlinah okuženih ob 8h, 14h in 20h izenačil, 14 dni pa je bil lahko celo večji pri rastlinah okuženih ob 8h. Zelo podobno velja tudi za količino virusne RNA in virusnih proteinov v listih rastlin.

**Ključne besede:** PVY<sup>NTN</sup>, cirkadiani ritem, sorta Désirée, sorta Igor, bolezenska znamenja, virusni plaščni protein, virusna RNA

## SUMMARY

Potato virus Y (PVY) is the most important virus in cultured potato fields worldwide and causes a lot of damage to crops. It belongs to the genus *Potyvirus* and the family *Potyviridae*. There are many strains of PVY that cause various symptoms on differently sensitive potato varieties. The most aggressive strain is PVY<sup>NTN</sup> which causes potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) on sensitive potato varieties. PVY<sup>NTN</sup> first appeared in Slovenia in 1988 and since then it has spread all over Slovenia. Potato varieties are differently susceptible to infection with the PVY<sup>NTN</sup>. The virus is transmitted mainly by aphids but can also be transmitted mechanically. The plant immune response is strictly controlled in order to effectively defend against pathogenic organisms and is regulated by abiotic factors such as light, humidity, circadian rhythm, temperature and others. Circadian rhythms are driven by biological clock of the organism and are a response to 24-hour changes in the physical environment. They are associated with day and night and also function when the plant is deprived of external time indications. Circadian clock is essential for the control of various physiological activities and gene expression. Transcriptional feedback loops play an important role in circadian clock on a molecular level. We investigated the effect of inoculation with PVY<sup>NTN</sup> on potato plants of cultivars Désirée and Igor at different times during the day. In the case of infection in different parts of the day the symptoms in certain times after inoculation were differently expressed and symptoms began to express at different times after inoculation. In general, PVY<sup>NTN</sup> inoculation of potato plants of cultivars Igor and Désirée at 2 p.m. and 8 p.m. in the early days after infection led to the appearance of symptoms on greater proportion of leaves than the infection at 8 a.m. The exception was the average number of spot necrosis on the leaves of the cultivar Igor, which was higher in plants infected at 8 p.m. than in plants infected at 2 p.m. During later course of disease the proportion of leaves with disease symptoms in plants infected at 8 a.m., 2 p.m. and 8 p.m. equalized, 14 days after inoculation it was even higher in plants infected at 8 a.m. Very similar results were also obtained for the amount of viral RNA and viral protein in plant leaves.

**Key words:** PVY<sup>NTN</sup>, circadian rhythm, cultivar Désirée, cultivar Igor, disease symptoms, viral coat protein, viral RNA

## KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Namen dela</b> .....	<b>1</b>
<b>2 TEORETIČNE OSNOVE</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Splošno o krompirju</b> .....	<b>2</b>
2.1.1 Sorta Désirée .....	2
2.1.2 Sorta Igor .....	3
<b>2.2 Virusi krompirja</b> .....	<b>3</b>
2.2.2 Krompirjev virus Y .....	5
2.2.2.1 Krompirjev virus Y <sup>NTN</sup> .....	7
<b>2.3 Metode detekcije PVY</b> .....	<b>7</b>
2.3.1 Test ELISA .....	7
2.3.2 PCR in qPCR .....	9
<b>2.4 Cirkadiani ritem</b> .....	<b>12</b>
2.4.1 Cirkadiano uravnavanje rastlinske imunosti .....	14
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Rastlinski material</b> .....	<b>17</b>
3.1.1 Priprava izhodnega rastlinskega materiala .....	17
3.1.2 Mehanska inokulacija rastlin krompirja .....	17
3.1.3 Spremljanje pojavljanja bolezenskih znamenj .....	20
3.1.4 Vzorčenje rastlin .....	20
<b>3.2 Analiza količine PVY<sup>NTN</sup> s testom ELISA</b> .....	<b>21</b>
3.2.1 Priprava raztopin za test ELISA .....	21
3.2.2 Izvedba testa ELISA .....	22
3.2.3 Obdelava podatkov testa ELISA .....	23
<b>3.3 Analiza količine PVY<sup>NTN</sup> s qPCR</b> .....	<b>23</b>
3.3.1 Homogenizacija rastlinskega materiala .....	23
3.3.2 Izolacija RNA .....	23
3.3.3 Elektroforeza na agaroznem gelu .....	25
3.3.4 Merjenje koncentracije RNA .....	25
3.3.5 Rt-qPCR v enem koraku .....	25
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Bolezenska znamenja rastlin krompirja okuženih s PVY<sup>NTN</sup> v različnem delu dneva</b> .....	<b>28</b>
4.1.1 Bolezenska znamenja pri sortah Désirée in Igor .....	28
4.1.2 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na inokuliranih listih rastlin sorte Désirée .....	29
4.1.3 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na neinokuliranih listih rastlin sorte Désirée .....	30
4.1.4 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na inokuliranih listih rastlin sorte Igor .....	31
4.1.5 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na neinokuliranih listih rastlin sorte Igor .....	32
4.1.6 Vpliv časa okužbe na pojavljanje točkastih nekroz in obročkastih kloroz na rastlinah sorte Désirée .....	33
4.1.7 Vpliv časa okužbe na pojavljanje točkastih nekroz in obročkastih kloroz na rastlinah sorte Igor .....	35
<b>4.2 Vpliv časa okužbe na količino virusnih proteinov v rastlini</b> .....	<b>37</b>
<b>4.3 Vpliv časa okužbe na količino virusne RNA v rastlini</b> .....	<b>38</b>

<b>4.4 Vpliv časa okužbe rastlin krompirja s PVY na potek bolezni .....</b>	<b>40</b>
<b>5 ZAKLJUČKI.....</b>	<b>42</b>
<b>6 VIRI .....</b>	<b>43</b>

## SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavni povzročitelji virusnih bolezni krompirja (Kerlan, 2008). .....	5
Preglednica 2: Prikaz števila rastlin sorte Désirée, ki smo jim popisovali bolezenska znamenja in ki smo jih vzorčili za analizo prisotnosti virusne RNA in virusnih proteinov.....	18
Preglednica 3: Prikaz števila rastlin sorte Igor, ki smo jim popisovali bolezenska znamenja in ki smo jih vzorčili za analizo prisotnosti virusne RNA in virusnih proteinov.....	19
Preglednica 4: Shema nanosa vzorcev in reagentov na ploščico KingFischer-96. ....	24
Preglednica 5: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov (F, R) in sond (S). .....	26



## SEZNAM SLIK

Slika 1: Gomolji krompirja sorte Désirée. ....	3
Slika 2 Gomolji krompirja sorte Igor. ....	3
Slika 3: Struktura genoma PVY (vir: Karasev in Gray, 2013).....	6
Slika 4: Shematski prikaz testa DAS-ELISA.....	8
Slika 5: Shematski prikaz testa TAS-ELISA. ....	9
Slika 6: A - Prikaz delovanja principa SYBR Green I , B - delovanje TaqMan kemije desno (vir: Jaai in sod., 2013).....	11
Slika 7: Glavna struktura cirkadianega ritma ((Robertson McClung in sod., 2002) .....	13
Slika 8:Transkripcijske povratne zanke cirkadianega ritma (Robertson, 2009). ....	14
Slika 9: Levo: Shematski prikaz listov rastlin krompirja. Pobirali smo 2. inokulirani in 2. neinokulirani list. Desno: prikaz razreza listov sorte Igor. ....	21
Slika 10: Graf pomnoževanja produktov s PCR (Vir: Arya, 2005).....	27
Slika 11: Levo: rastlina sorte Désirée okužena s PVY <sup>NTN</sup> 10 dpi. Desno: rastlina sorte Igor okužena s PVY <sup>NTN</sup> 9 dpi.....	29
Slika 12: Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na inokuliranih listih sorte Désirée. ....	30
Slika 13: Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na neinokuliranih listih sorte Désirée. ....	31
Slika 14: Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na inokuliranih listih sorte Igor. ....	32
Slika 15: Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na neinokuliranih listih sorte Igor .....	33
Slika 16: Levo: obročkaste kloroze na inokuliranem listu sorte Désirée. Desno: Točkaste nekroze na inokuliranem listu sorte Désirée. ....	33
Slika 17: Pojavljanje obročkastih kloroz na listih sorte Désirée.....	34
Slika 18: Pojavljanje točkastih kloroz na listih sorte Désirée.....	34
Slika 19: Točkaste nekroze in obročkaste kloroze (ob desnem robu na sredini lista) sorte Igor. ....	35
Slika 20: Pojavljanje točkastih kloroz na listih sorte Igor.....	36
Slika 21: Pojavljanje obročkastih nekroz na listih sorte Igor. ....	36
Slika 22: Količina virusnega plaščnega proteina v inokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka. ....	37
Slika 23: Količina virusnega plaščnega proteina v neinokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka. ....	38
Slika 24: Količina virusne RNA v inokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka.....	39
Slika 25: Količina virusne RNA v neinokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka. ....	39
Slika 26: Količina virusne RNA v inokuliranih listih sorte Igor okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka.....	40

## 1 UVOD

Rastline so v naravi izpostavljene različnim oblikam stresa, ki vplivajo na njihovo preživetje, razmnoževanje, rast in razvoj. Pri poljščinah je posledica neugodnih razmer v okolju vidna kot zmanjšana količina pridelka ali pa kot povečana uporaba fitofarmaceutskih sredstev, kar ima negativen vpliv na okolje. Pri vzgajanju odpornih sort, ki prispevajo k večjemu pridelku in manjši uporabi fitofarmaceutskih sredstev, je zelo pomembno poznavanje interakcije rastlin in povzročiteljev bolezni .

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je poleg pšenice, riža in koruze četrta najpomembnejša poljščina na svetu z letno proizvodnjo okoli 300 milijonov ton (Loebenstein in Gaba, 2012). Krompir danes pridelujejo po vsem svetu, obstaja pa že več tisoč sort krompirja (Kus, 1994).

Poleg suše in sajenja gomoljev izrojenih sort so dandanes glavni vzroki manjših pridelkov glivne, bakterijske in virusne bolezni ter škodljivci (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Virusne bolezni so velika ovira za proizvodnjo krompirja in pogosto zmanjšajo pridelek za več kot 50% (Loebenstein, 2008). Med virusi pri gojenem krompirju dandanes velja za gospodarsko najbolj škodljiv virus krompirjev virus Y (Potato virus Y, PVY), saj pri občutljivih sortah krompirja povzroča zelo velik izpad pridelka. Sorte krompirja so različno občutljive na PVY in odgovori gostiteljskih rastlin na različne izolate PVY so zelo različni, posledica česar je spekter različnih izidov bolezni. Na izid bolezni vpliva tudi fiziološko stanje rastlin, na primer starost rastlin ali izpostavljenost stresu.

Znano je, da se aktivnost posameznih metabolnih poti v rastlinah čez dan spreminja. Rastline preko avtonomnega mehanizma, cirkadianega ritma s periodo približno 24 ur, uravnavajo fiziološke in metabolne procese. Rastline zaznavajo notranje in zunanje dejavnike, na katere se ustrezno odzovejo, kar jim omogoči večje preživetje in čim bolj uspešno razmnoževanje (Hua, 2013).

Rastlinski obrambni odziv je strogo nadzorovan z namenom učinkovite obrambe proti patogenim organizmom in hkratnemu zmanjševanju njihovih negativnih učinkov na rast in razvoj rastlin. Rastlinski obrambni sistem proti patogenim organizmom uravnavajo abiotski dejavniki, kot so svetloba, vlažnost, cirkadiani ritem, temperatura in drugi. Na izražanje metabolnih poti vpliva tudi svetloba (Hua, 2013), na primer svetloba ima pomembno vlogo pri nastanku salicilne kisline, ki sodeluje pri obrambnem odgovoru rastlin. Dokazani so bili s patogeni inducibilni geni, ki imajo cirkadiani ritem izražanja. Do sedaj je bilo ugotovljeno, da se s patogeni inducibilni geni izražajo, ko so indicurani s patogeni, signalnimi molekulami in abiotskim stresom, vendar učinek okužbe v različnih delih dneva na izražanje genov še ni bil raziskan (Roden in Ingle, 2009).

### 1.1 Namen dela

Namen diplomskega dela je bilo ugotoviti ali se pri rastlinah krompirja sorte Désirée in Igor, okuženih s PVY<sup>NTN</sup> v različnih delih dneva pojavljajo različno močna bolezenska znamenja in v različnem času po okužbi. Poleg tega je bil namen diplomskega dela tudi ugotoviti ali se v rastlinah krompirja okuženih s PVY<sup>NTN</sup> v različnih delih dneva razlikuje količina virusa in hitrost namnoževanja virusa v rastlini.

## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Splošno o krompirju

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je enoletna zelnata gomoljnica, ki sodi v:

- kraljestvo: rastline (Plantae),
- deblo: kritosemenke (Magnoliophyta),
- razred: dvokaličnice (Magnoliopsida),
- podrazred: štiriobročne zraslovenčnice (Asteridae),
- red: razhudnikovci (Solanales),
- družina: razhudnikovke (*Solanaceae*),
- rod: razhudnik (*Solanum*),
- vrsta: krompir (*S. tuberosum*).

Stebela krompirja zrastejo do 1 m visoko. Krompir ima liho pernate liste, socvetja z belimi do vijoličastimi cvetovi in užitne podzemne gomolje. Gomolj pokriva rjava do vijolična kožica, meso je ponavadi bele ali rahlo rumene barve. Gomolj ima zunanje kališče ali »očesca«, iz katerih poženejo nove rastline. Krompir razmnožujemo vegetativno z gomolji (Kocjan Ačko in Goljat 2005; Barrett, 2005; Arends in Kus, 1999).

Krompir izvira iz višavja Južne Amerike, natančneje iz perujskih Andov. V Evropo so ga prinesli španski osvajalci v poznem 16. stoletju (Arends in Kus, 1999). Sprva so ga Evropejci zavračali kot hrano, danes pa ima poleg pšenice, riža in koruze četrto največji pridelek hrane na svetu z letno proizvodnjo okoli 300 milijonov ton (Arends in Kus, 1999; Loebenstein in Gaba, 2012). Tako kot drugje v Evropi so ga tudi v Sloveniji kar 200 let zavračali v prehrani. Za krmo živine so v obdobju od 1730 do 1740 kmetje posadili prve njive krompirja v Sloveniji, leta 1767 pa je cesarica Marija Terezija izdala odredbo za sajenje krompirja (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

Danes obstaja že več tisoč sort krompirja (Kus, 1994). Pridelovalci vsako leto nekaj sort opustijo, prav tako pa se vsako leto pojavijo številne nove sorte kot rezultat dela žlahtniteljev. V Sloveniji vsako leto vpišemo v sortno listo po več tujih sort krompirja, imamo pa tudi svoje slovenske sorte. Stare domače sorte so: Cita, Cvetik, Dobrin, Igor, Jaka, Jasna in druge. Novejše slovenske sorte so: Pšata, Bistra, Sora, Mirna, Sotla, Kokra, Mura, Vipava in Krka. Tuje sorte so: Santé, Désirée, Pentland squire, Rywal, Bea, Bintje in druge. Pri nas je Désirée še vedno najbolj razširjena sorta krompirja (Arends in Kus, 1999).

Različne sorte krompirja so različno odporne proti različnim virusnim, bakterijskim in glivnim boleznim ter škodljivcem (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

#### 2.1.1 Sorta Désirée

Krompirjeva sorta Désirée je nizozemska sorta, ki sodi po dolžini rastne dobe med srednje pozne sorte. V obdobju rasti in razvoja oblikuje visok grm s številnimi srednje močnimi stebli, ki so rdeče vijoličasto obarvana (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Gomolji so veliki, podolgovato ovalni in imajo svetlo rumeno meso in rdečo kožico (Slika 1). Sorta proti PVY ni odporna in je občutljiva, čeprav prvo leto po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> ne kaže hudih bolezenskih znamenj. Pridelek okuženih rastlin se namreč prvo leto po

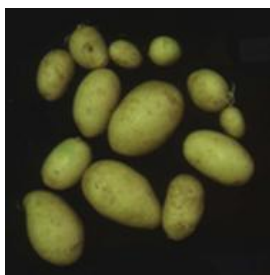
okužbi ne zmanjša preveč in tudi nekroze na gomoljih, kot posledica okužbe s PVY<sup>NTN</sup>, so redke in komaj opazne (Sluga, 1994).



**Slika 1:** Gomolji krompirja sorte Désirée.

### 2.2.2 Sorta Igor

Sorta krompirja Igor je v Sloveniji vzgojena sorta, ki sodi po dolžini rastne dobe med srednje pozne sorte. Stebla so številčna, močno olistana z velikimi listi, svetlo zelene barve. Kožica gomoljev je svetlo rjava, meso pa bele barve (Slika 2). Je dokaj odporna proti virusnim boleznim, vendar izredno občutljiva na PVY<sup>NTN</sup>, zaradi katerega že v prvem letu okužbe nastanejo velike nekroze na gomoljih (Sluga, 1994). Včasih je bila pri nas vodilna sorta krompirja za pridelovanje, predstavljala je preko 60% slovenske pridelave krompirja, vendar se po epidemiji PVY<sup>NTN</sup> v letu 1988 zaradi prevelike občutljivosti na PVY<sup>NTN</sup> ne prideluje več.



**Slika 2** Gomolji krompirja sorte Igor.

## 2.2 Virusi krompirja

Virusne bolezni so velika ovira za proizvodnjo krompirja in pogosto zmanjšajo pridelek za več kot 50 % (Loebenstein, 2008).

Opisanih je najmanj 38 vrst virusov, ki okužujejo krompir. Nekaj od teh jih je Mednarodni komite za taksonomijo virusov (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) razvrstil kot negotove vrste ali morebitne različke iste vrste (Kerlan, 2008). V Evropi so odkrili 22 patogenih vrst virusov, ki okužujejo krompir, od katerih jih je le okoli 10, ki povzročajo resno ekonomsko škodo (Šutić in sod., 1999). Glede na njihov pomen in razširjenost v območjih pridelave krompirja na svetu viruse, ki okužujejo krompir, lahko razdelimo v tri skupine.

V prvo skupino sodi 8 virusov, ki so glavni povzročitelji bolezni in povzročajo veliko škodo v nasadih krompirja:

- krompirjev virus Y (Potato virus Y, PVY),
- virus zvijanja listov krompirja (Potato leafroll virus, PLRV),
- virus X krompirja (Potato virus X, PVX),
- virus A krompirja (Potato virus, PVA),
- virus S krompirja (Potato virus, PVS),
- virus M krompirja (Potato virus M, PVM),
- virus šelestenja tobaka (Tobacco rattle virus, TRV),
- virus mop-top krompirja (Potato mop-top virus, PMTV).

Vsi virusi iz prve skupine so svetovno razširjeni in ekonomsko pomembni. Razširjajo se s pomočjo listnih uši ali z mehanskim stikom z okuženimi listi, poganjki ali gomolji (Preglednica1).

V drugo skupino sodijo virusi, ki se pojavljajo le v Latinski Ameriki in niso ekonomsko pomembni. Nekateri so bili najdeni samo enkrat v eni sami sorti. Sem sodijo:

- andski latentni virus krompirja (Andean potato latent virus, APLV),
- andski virus lisavosti krompirja (Andean potato mottle virus, APMoV),
- virus P krompirja (Potato virus P, PVP),
- virus T krompirja (Potato virus T, PVT),
- virus U krompirja (Potato virus U, PVU),
- virus rumenega mozaika krompirja (Potato yellow mosaic virus, PYMV)

in drugi. Razširjeni so na območju Bolivije, Kolumbije, Peruja, Ekvadorja in v drugih latinsko ameriških državah. Najpogosteje se razširjajo z listnimi ušmi, ogorčicami (Nematoda), bolhami in mehanskim stikom z okuženimi listi, poganjki ali gomolji.

V tretjo skupino uvrščamo viruse, ki se pojavljajo v drugih delih sveta in so lokalnega pomena ali brez pomena. Sem sodijo:

- virus mozaika lucerne (Alfalfa mosaic virus, AMV),
- virus mozaika kumare (Cucumber mosaic virus, CMV),
- virus aukuba mozaika krompirja (Potato aucuba mosaic virus, PAMV),
- latentni virus krompirja (Potato latent virus - PotLV),
- virus V krompirja (Potato virus V, PVV),
- virus mozaika tobaka (Tobacco mosaic virus, TMV)

in drugi. Razširjajo se z listnimi ušmi, cvetnim prahom in mehanskim stikom z okuženimi listi, poganjki ali gomolji (Kerlan, 2008).

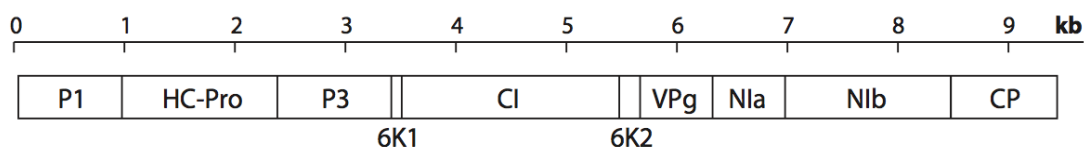
**Preglednica 1:** Glavni povzročitelji virusnih bolezni krompirja (Kerlan, 2008).

Kratica imena virusa	Rod	Ekonomska pomembnost	Geografska razširjenost	Prenos
PVY	<i>Potyvirus</i>	zelo visoka	svetovno	listna uš mehanski prenos
PLRV	<i>Polerovirus</i>	zelo visoka	svetovno	listna uš
PVX	<i>Potexvirus</i>	visoka	svetovno	mehanski prenos
PVA	<i>Potyvirus</i>	zmerna	svetovno	listna uš
PVS	<i>Carlavirus</i>	zmerna	svetovno	listna uš mehanski prenos
PVM	<i>Carlavirus</i>	zmerna	svetovno	listna uš mehanski prenos
TRV	<i>Tobravirus</i>	visoka	svetovno	ogorčice
PMTV	<i>Pomovirus</i>	precej visoka	večinoma v predelih s hladnejšo klimo	glive

### 2.2.2 Krompirjev virus Y

Krompirjev virus Y (Potato virus Y, PVY) je bil prvič odkrit leta 1931, vendar so bili bolezenski znaki, ki jih povzroča, odkriti že mnogo prej. Uvrščamo ga v rod *Potyvirus*, ki je eden od šestih rodov v družini *Potyviridae* (Kerlan in Moury, 2008). Rod *Potyvirus* predstavlja največjo skupino rastlinskih virusov, saj vsebuje 128 odobrenih in 89 negotovih vrst (Singh in sod., 2008). Gospodarsko je PVY najpomembnejši virus v gojenih nasadih krompirja po vsem svetu, vključno z Evropo, Ameriko in Azijo (Hu, 2009). Tudi pri nas je najbolj razširjen virus, ki pri občutljivih sortah zmanjša pridelek kar za 70 % (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Povzroča resne poškodbe nekaterih razhudnikovk (*Solanaceae*) kamor sodijo tudi paradižnik, paprika, tobak in druge rastline (Hu, 2009).

Virusni delci so nitasti, dolgi približno 740 nm in široki 11 nm. V okuženih celicah tvorijo vključke v obliki vetrnice (de Bokx in Huttinga, 1981). Delci so sestavljeni iz 95 % beljakovinskega plašča in 5 % iz RNA (Dougherty in Carrington, 1988). Beljakovinski plašč PVY je sestavljen iz okoli 2000 kopij plaščnih beljakovin (Talbot, 2004). Genom ima en bralni okvir in je enoverižna, pozitivno smiselna RNA velikosti 9,7 kb. RNA ima na 3' koncu poli A rep, na 5' konec pa je kovalentno vezan protein VPg (viral protein genome-linked). Genom se izraža kot en poliprotein, ki se avtoproteolitsko cepi na deset funkcionalnih proteinov: P1 (first protein, prvi protein), HC ali 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 (large nuclear inclusion protein b, jedrni vključitveni protein b) in CP (coat protein, plaščni protein). Na vsakem koncu genoma PVY je nekodirajoča regija: 5'NTR in 3'NTR (Slika 3) (Kerlan, 2006).



Slika 3: Struktura genoma PVY (Karasev in Gray, 2013).

Replikacijski kompleks sestavljajo proteini NIB, CI in VPg, verjetno vključuje tudi proteina 6K1 in 6K2. Protein CP je sestavljen iz 267 aminokislinskih ostankov. Vsebuje jedro (218 aminokislin) ter dva površinsko izpostavljena konca: N-konec (30 aminokislin) in C-konec (19 aminokislin). Terminalni regiji nista odgovorni za sestavljanje virusa in vzdrževanje infektivnosti. Hc-Pro naj bi imel biološko aktivno obliko dimera in je odgovoren za prenos virusa po rastlini, prenos virusa z listnimi ušmi, premikanje virusa iz ene celice v drugo, izražanje bolezenskih znamenj, krepitev patogenosti, vezavo RNA in zaviranje utišanja genov (Kerlan, 2008; Oana, 2009). CP je odgovoren za prenos virusa z listnimi ušmi, premikanje virusa iz celice v celico, prenos virusa po rastlini in sestavljanje virusnih delcev (Kerlan, 2008).

PVY lahko, glede na bolezenska znamenja, ki jih povzročajo na štirih izbranih sortah krompirja in na tobaku, razdelimo v pet skupin različkov: PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>E</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> in PVY<sup>Z</sup> (Singh in sod., 2008). Glede na nukleotidno zaporedje ločimo še druge različke PVY: PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>NW</sup> in PVY<sup>N:O</sup> in drugi, ki so večinoma nastali z rekombinacijo med različkoma PVY<sup>O</sup> in PVY<sup>N</sup> (Kerlan, 2008).

Virusi se razmnožujejo samo v živih celicah. Zato je za njihov obstoj nujno, da okužujejo nepretrgano verigo celic. To dosežejo na dva načina: s širjenjem iz ene celice v drugo v okuženi rastlini in s širjenjem z ene rastline na drugo. Virus se v okuženi rastlini hitro širi. PVY za pot z okuženega lista krompirja do gomoljev potrebuje od 10 do 14 dni (Arends in Kus, 1999).

PVY se širi iz rastline v rastlino z listnimi ušmi. Najboljši prenašalec PVY je siva breskova uš (*Myzus persicae*) (Šutić, 1999). Listne uši se hranijo tako, da zabodejo rilček v povrhnjico rastline in poskusijo ali jim sok ustreza. Če jim ustreza, se hranijo pol ure ali več, medtem ko poskušanje traja le nekaj sekund. Listne uši viruse prenašajo s hranjenjem na okuženi in za tem na zdravi rastlini, največ virusov prenašajo s poskušanjem (Kus, 1994). Velik problem širjenja PVY predstavlja vegetativno razmnoževanje krompirja z gomolji, saj se tako virus prenaša iz generacije v generacijo (Kus, 1966). Škoda, ki jo povzročajo virusi na krompirju ni enkratna, temveč trajna. Tako pravimo, da virusi na krompirju povzročajo njegovo izrojevanje ali degeneracijo (Arend in Kus, 1999).

Bolezenska znamenja, ki se izrazijo na krompirju so odvisna od različka PVY in sorte krompirja (Jones, 2009). Na primarno okuženih rastlinah se lokalna bolezenska znamenja lahko kažejo v obliki kloroz in točkastih nekroz na listih ter črtastih nekroz na listnih žilah. Sistemsko okuženi listi primarno okuženih rastlin imajo lahko rumen mozaik, listna površina se guba, rumenijo, se sušijo, visijo ob stebelu ali odpadejo. Stebla primarno okuženih rastlin rastejo počasneje, rastlina lahko tudi odmre. Sekundarno okužene rastline lahko kažejo podobna bolezenska znamenja, vendar v milejši obliki. Rastline lahko kažejo mozaik, nekroze na poganjkih in okrog žil ter so velikokrat deformirane (Kus, 1994).

Okužbam s PVY se lahko izognemo s klonsko selekcijo oziroma odbiro zdravega in odstranitvijo okuženega sadilnega materiala, odstranjevanjem listnih uši z uporabo insekticidov in mineralnih olj, ter proizvodnjo semenskega krompirja v višje ležečih hladnejših regijah, kjer okoljski pogoji onemogočajo razvoj listnih uši. Z uporabo diagnostičnih metod (test ELISA in PCR v realnem času) lahko preverimo zdravstveno stanje sadilnega materiala, termoterapija in kultura meristemov pa nam omogočata vzgojo zdravega sadilnega materiala, če tega ni na voljo (Šutić, 1999).

### 2.2.2.1 Krompirjev virus Y<sup>NTN</sup>

Krompirjev virus Y<sup>NTN</sup> (PVY<sup>NTN</sup>) je različek PVY, ki na občutljivih sortah krompirja povzroča bolezen obročkasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD), ki se je v Sloveniji prvič pojavila leta 1988 in se epidemično razširja po celi Sloveniji (Arends in Kus, 1999; Kus, 1994). Znamenja bolezni PTNRD, po kateri je bolezen dobila ime, se kažejo na gomoljih. PTNRD se ne pojavlja pri vseh sortah, pri nekaterih sortah se bolezenska znamenja kažejo na večini gomoljev, pri drugih pa le na manjšem številu gomoljev. Najprej se pojavijo precej pravilni izbočeni loki in obročki ali pa krogle temnejše barve. Čez nekaj časa se lahko tkivo izsuši, vdre in postane temnorjavo ali črno. Pod površinskimi nekrozami je plast odmrlega tkiva, ki se pri občutljivejših sortah širi v globlje plasti (Arends in Kus, 1999).

Sorte krompirja so za okužbo s PVY<sup>NTN</sup> različno dovzetne. Nekatere sorte, kot na primer sorta Igor, so zelo občutljive na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> in kažejo močna bolezenska znamenja na nadzemnih delih in gomoljih. Druge sorte, na primer sorta Désirée so nekoliko manj občutljive in se po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> 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<sup>NTN</sup>, kar pomeni, da se PVY<sup>NTN</sup> v njih namnoži in širi, vendar skoraj ne kažejo bolezenskih znamenj. Obstajajo tudi odporne sorte, v katerih se PVY<sup>NTN</sup> 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).

## 2.3 Metode detekcije PVY

Najpogosteje uporabljeni metodi za detekcijo PVY sta metodi ELISA in qPCR, obstajajo pa še številne druge metode, kot na primer PCR, SnaPshot, elektronska mikroskopija (Rupar, 2013).

### 2.3.1 Test ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, encimsko imunski test) je serološka metoda, kjer opazujemo reakcijo med antigenom (virusni plaščni protein) in za antigen specifičnim protitelesom, ki jo sledimo z barvno reakcijo.

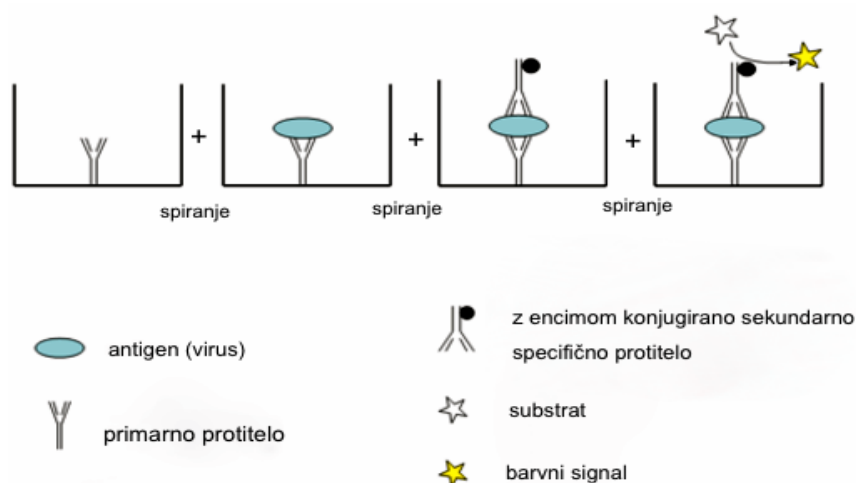
Poznamo številne različne izvedbe testa ELISA. Antigen lahko vežemo neposredno na mikrotitersko ploščico, lahko pa na mikrotitersko ploščico najprej vežemo primarna protitelesa proti antigenu, na katera se nato ujame antigen. V slednjem primeru je po dodajanju sekundarnih protiteles antigen vezan med dve protitelesi, zato tej izvedbi rečemo sendvič izvedba.



V primeru vezave encima na sekundarna protitelesa govorimo o neposrednem testu ELISA. Pri posrednem testu ELISA pa je encim vezan na terciarna protitelesa, ki prepoznajo sekundarna protitelesa. Specifičnost reakcije je ponavadi večja v primeru neposrednega testa ELISA. Prednost posrednega testa ELISA pred neposrednim testom ELISA je ta, da prisotnost kompleksa antigen-sekundarno protiteleso prepoznajo univerzalna konjugirana terciarna protitelesa. Splošno uporabna konjugirana protitelesa tega tipa so z alkalno fosfatazo označena kozja protitelesa proti zajčjim poliklonskim protitelesom in z alkalno fosfatazo označena kozja protitelesa proti mišjim monoklonskim protitelesom.

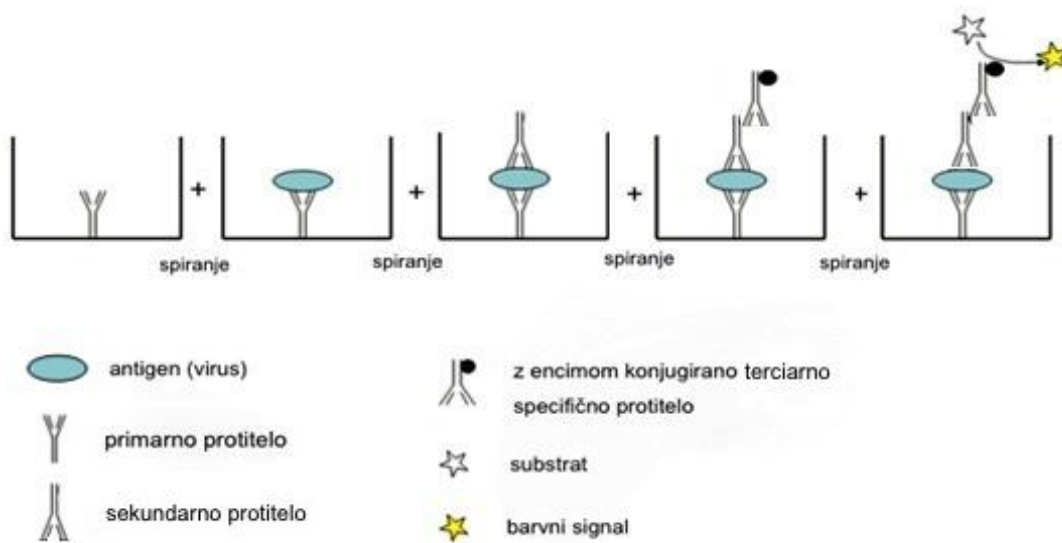
Najbolj pogosto uporabljeni izvedbi testa ELISA sta test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) in test TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich ELISA) (Clark in Adams, 1977; Hampton in sod., 1990).

Test DAS-ELISA je sendvič izvedba neposrednega testa ELISA, ki sta ga za rastlinske viruse priredila Clark in Adams (1977). Pri tem testu na nosilec (mikrotiterska ploščica) najprej vežemo primarna specifična protitelesa, na katera nato vežemo antigen. Po nanosu z encimom konjugiranih sekundarnih specifičnih protiteles, se le-ta vežejo na antigene, ki so prisotni le v primeru, če so vezani na primarna protitelesa. Po vsaki fazi z izpiranjem namreč odstranimo druge nevezane snovi, ki se tako ne nabirajo na reakcijskem mestu, ampak ostanejo tam le specifično vezani reaktanti. Zaradi tega je lahko test skoraj enako uspešen, če uporabimo grob rastlinski material ali očiščen virusni izvleček, ki vsebuje enako količino virusnih delcev. Po inkubaciji v ustreznem substratu, ki ga encim razgrajuje, ugotavljamo prisotnost antigena v vzorcu glede na obarvanost (Slika 4) (Dijkstra, 1988).



**Slika 4:** Shematski prikaz testa DAS-ELISA.

Test TAS-ELISA je sendvič izvedba posrednega testa ELISA (Slika 5), pri katerem na nosilec vezana primarna protitelesa ujamejo antigen, na antigen se nato vežejo specifična sekundarna protitelesa, ki jih prepoznajo z encimom konjugirana terciarna protitelesa. Prisotnost encima detektiramo v ustreznem substratu, ki ga encim razgrajuje. Vzorec se obarva (ADGEN Protocol 2).



**Slika 5:** Shematski prikaz testa TAS-ELISA.

### 2.3.2 PCR in qPCR

Verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain reaction, PCR) je eno izmed najpomembnejših odkritij na področju molekularne biologije in molekularne patologije v zadnjih 30 letih. Osnova PCR temelji na biokemijski reakciji, ki omogoča *in vitro* pomnoževanje (amplifikacijo) specifičnega dela molekule DNA, ki se normalno odvija v vseh živih organizmih.

Poznamo dve vrsti metod PCR: kvalitativno oziroma klasično PCR in kvantitativno PCR oziroma PCR v realnem času (real time PCR, quantitative PCR, qPCR) (Živković, 2007).

Za potek PCR je potrebna prisotnost matrične DNA, začetnih oligonukleotidov, nukleotidov in DNA polimeraze. Začetni nukleotidi so kratki deli DNA z zaporedjem, ki je komplementarno delu verige tarčne DNA, ki jo želimo pomnožiti. Začetni oligonukleotidi na matrični DNA poiščejo komplementarno mesto, na katerega se vežejo. Začetni oligonukleotidi služijo kot začetna točka za izgradnjo nove verige DNA. DNA polimeraza je ključni encim, ki povezuje posamezne nukleotide tako, da nastane veriga, ki je komplementarna matrični verigi in skupaj z matrično verigo tvori produkt PCR (amplikon). Nukleotidi vključujejo štiri baze; adenin, timin, citozin in gvanin (A, T, C, G), ki jih najdemo v molekuli DNA. Nukleotidi predstavljajo gradnike, ki jih DNA polimeraza uporabi za izdelavo amplikona (Garibyan in Avashia, 2013).

Pri PCR se DNA pomnožuje v ponavljajočih ciklih, od katerih je vsak sestavljen iz treh korakov:

- faza denaturacije matrične DNA, v kateri se komplementarni verigi DNA razpreta in dobimo enojni verigi, kar dosežemo z inkubacijo pri 95 °C, 3 do 5 minut (Hoffmann, 2007; Živković, 2007),
- faza hibridizacije oziroma prileganja, v kateri se temperatura zniža na 42 °C do 65 °C za 20 sekund do 1 minute, kar povzroči naleganje začetnih

oligonukleotidov na komplementarna mesta na 3' konec matrične molekule DNA (Živković, 2007) ter

- faza elongacije oziroma podaljševanja v kateri se temperatura za 20 sekund do 2 minuti dvigne na 65 °C do 72 °C, kar je optimalna temperatura za delovanje termostabilne DNA polimeraze. Polimeraza z dodajanjem nukleotidov izgradi komplementarno verigo DNA v smeri od 5' konca proti 3' koncu.

DNA, nastala v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih kopij v drugem ciklu. Vsakič, ko se vsi trije koraki ponovijo, se število kopij molekul DNA podvoji. Po prvem ciklu iz vsake matrične DNA dobimo 1 dodatno kopijo DNA, kar sta skupaj 2 molekuli DNA. Po drugem ciklu dobimo še 2 dodatni kopiji, kar so skupaj 4 kopije, po tretjem ciklu 4 dodatne kopije DNA, kar je skupaj 8 kopij in tako dalje (Živković, 2007). Ponavadi izvedemo 20 do 40 ciklov. Po 20 ciklih iz ene začetne matrice DNA dobimo približno milijon kopij (Hoffmann, 2007). V realnosti po 40 ciklih ne dobimo  $2^{40}$  kopij, saj se reaktanti po določenem številu ciklov PCR porabijo in reakcija doseže plato. Iz končnega števila kopij torej ne moremo izračunati začetne količine molekul, saj se DNA učinkovito podvaja samo do platoja (Valasek in Repa, 2005).

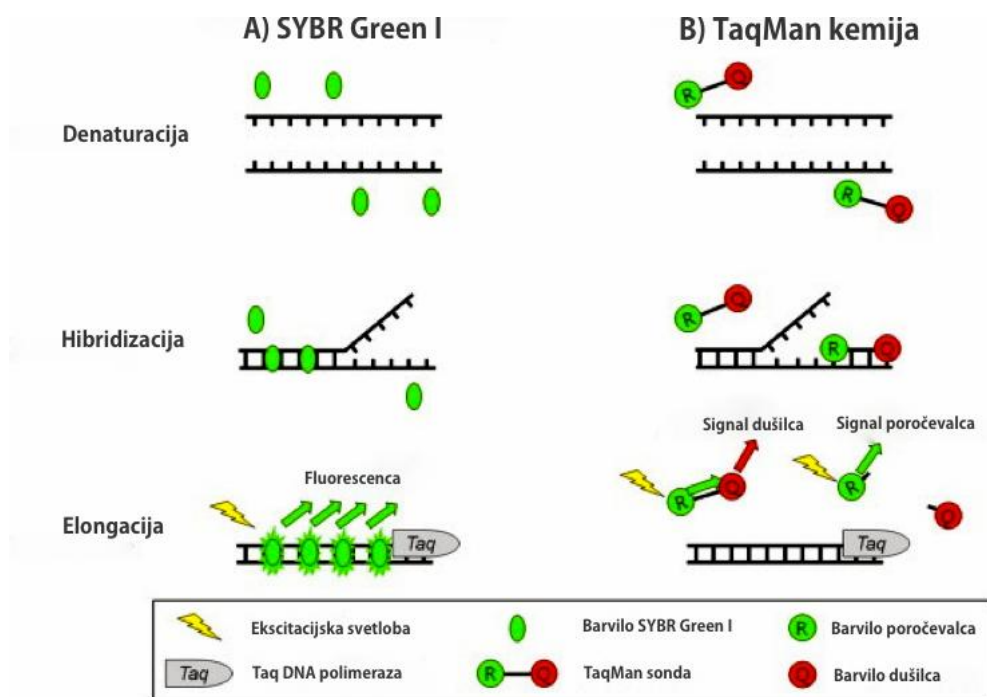
qPCR je izboljšana izvedba klasične PCR (Mackay in sod., 2002), saj omogoča tudi kvantifikacijo DNA. Od PCR se razlikuje v načinu detekcije produkta PCR. Za razliko od klasične PCR, kjer produkt detektiramo po končanem pomnoževanju z agarozno gelsko elektroforetsko, pri qPCR produkt detektiramo v realnem času med samo reakcijo (Bustin, 2005).

Detekcija produktov qPCR temelji na uporabi fluorescentnih molekul, ki omogočajo spremljanje količine produkta v vsakem ciklu reakcije. Poznamo specifične in nespecifične tehnike detekcije produkta. Nespecifične tehnike uporabljajo nespecifične molekule, ki se veže na naključne lokacije. Medtem ko specifične tehnike detektirajo točno določen specifičen del DNA, na katerega nalega sonda. Poznamo veliko fluorescentnih kemij qPCR. Najbolj poznani sta kemija TaqMan<sup>®</sup> in barvilo SYBR<sup>®</sup> Green I (Real-Time PCR, 2012).

SYBR<sup>®</sup> Green I (Slika 6) je najpogosteje uporabljeno barvilo za nespecifično detekcijo produkta. Barvilo se veže na dvoverižno DNA in fluorescira. Barvilo emitira pri 520 nm. Slabost te tehnike je, da se barvilo veže na vsako dvoverižno DNA. Posledično nespecifični produkti in dimeri začetnih oligonukleotidov povzročajo napake pri kvantifikaciji. Specifičnost sistema lahko preverimo s talilno krivuljo po zadnjem ciklu (Detection methods, 2012). Princip temelji na temperaturi taljenja (melting temperature,  $T_m$ ), ki je drugačna za vsak produkt PCR, ker je odvisna od vsebnosti posameznih baz v produktu. Izmerimo fluorescenčni signal v odvisnosti od temperature taljenja. Med dvigovanjem temperature od 60 °C do 95 °C pride do razklepanja dvojnih verig in s tem do sproščanja vezanega barvila in upada fluorescence. Če imamo v PCR mešanici prisotnih več produktov PCR z različnimi  $T_m$ , jih bomo na disociacijski krivulji zaznali kot več vrhov (Kubista, 2006).

TaqMan<sup>®</sup> kemija (Slika 6) uporablja sonde TaqMan<sup>®</sup>, ki so strukturirane tako, da nalegajo na tarčno zaporedje ene od verig med dvema specifičnima začetnima oligonukleotidoma. Sonda je označena z dvema barviloma. Na 5' koncu je označena s poročevalcem, kot je na primer FAM (6-karboksifluorescein), na 3' koncu pa z dušilcem, kot je na primer TAMRA (6-karboksi-tetra-metilrodamin). Do oddajanja fluorescentnega signala poročevalca pride po principu prenosa energije s fluorescentno resonanco (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Kadar je

sonda intaktna, sta si barvili poročevalca in dušilca blizu in je fluorescenca zavirana. Ko pa DNA polimeraza med podaljševanjem verige zaradi 5' eksonukleazne dejavnosti razgradi sondo, se poročevalec loči od dušilca, kar povzroči fluorescenco poročevalca. Fluorescenca poročevalca je sorazmerna količina nastalega produkta (Bustin, 2000). To linearno korelacija med produktom PCR in fluorescenčno intenzivnostjo uporabimo za izračun količine prisotne matrične DNA na začetku reakcije (Bustin, 2005). Metoda qPCR je kvantitativna, ker merimo količino produkta v eksponentni fazi, preden reakcija doseže plato, ko je pomoževanje še učinkovito (Valasek in Repa, 2005).



**Slika 6:** A- Prikaz delovanja principa SYBR Green I, B- delovanje TaqMan kemije desno (Jaai in sod., 2013).

Poleg opisanih principov s kemijo TaqMan in barvilom SYBR Green I obstajajo tudi drugi načini za specifično detekcijo produktov: molekularna svetila (molecular beacons), škorpionski začetni oligonukleotidi (scorpion primers), hibridizacijske sonde in svetleče sonde (light-up probes) (Detection methods, 2012).

qPCR je primerna za analize prisotnosti virusov, ekspresije genov, določitev mutacij ... (Experimental design, 2012). Če kot začetni material uporabimo RNA, je pred qPCR treba izvesti reverzno transkripcijo (RT) RNA v cDNA (Bustin, 2005). RT-qPCR lahko izvedemo v enem ali pa v dveh korakih. Pri metodi v enem koraku izvedemo reverzno transkripcijo in qPCR v isti mikrocentrifugirki, z eno pufersko raztopino in neprekinjenimi temperaturnimi cikli. Metodo v dveh korakih pa izvedemo tako, da reverzno transkripcijo in qPCR izvedemo v dveh ločenih mikrocentrifugirkah. Prednost izvedbe v enem koraku je prihranek časa in manjša možnost kontaminacije, saj vse izvajamo v eni mikrocentrifugirki (Experimental design, 2012), slabost pa večja poraba kemikalij v primeru analize večjega števila ampliconov, saj je potrebno za vsak amplicon izvesti reverzno transkripcijo.

Pri analizi in primerjavi rezultatov se lahko soočamo z več nenadzorovanimi spremenljivkami, kar lahko privede do napačne razlage podatkov. Te nenadzorovane spremenljivke so lahko: količina vhodnega materiala, učinkovitost encimov, razlike med tkivi, eksperimentalni pogoji itd. Za dobro primerjavo rezultatov je treba narediti normalizacijo podatkov. Najpogosteje uporabljeni načini normalizacije so: normalizacija na prvotno število celic, normalizacija na celotno maso RNA, normalizacija na enega ali več referenčnih genov, za kar se najpogosteje uporabljajo vzdrževalni geni (housekeeping gene) ter normalizacija na notranjo ali zunanjo kalibracijo (Bustin, 2000). Pri normalizaciji na referenčne gene lahko upoštevamo večino dejavnikov variabilnosti. Prednost te normalizacije je, da lahko izključimo variacije, ki so posledica različne koncentracije DNA in različne učinkovitosti encimov. Pomembno je, da se referenčni geni skozi celoten eksperiment in med posameznimi vzorci izražajo ves čas konstantno (Normalization and quantification methods, 2012). Kot referenčne gene uporabljamo več vzdrževalnih genov: gen za 18S ribosomska RNA, gen za 25S rRNA (Bo-Ra, 2003), gen za ubikvitin (Brunner in sod., 2004), gen za tubulin (Coker in Davies, 2003), gen za aktin (Bo-Ra, 2003), gen za elongacijski faktor 1- $\alpha$  (Nicot in sod., 2005), gen za GAPDH (Coker in Davies, 2003), gen za citokrom oksidazo (COX) (Li in sod., 2006) in druge.

## 2.4 Cirkadiani ritem

Rastline so zelo odvisne od okolja, v katerem živijo, saj se ne morejo premikati in nekatere rastlinske celice niso zaščitene z notranjim okoljem, kot na primer celice gobastega tkiva mezofila lista, ki so izpostavljene zraku za učinkovito izmenjavo vode in plinov, potrebnih za fotosintezo. Pri tem je cirkadiana ura ključnega pomena za nadzor različnih fizioloških procesov, zlasti tistih povezanih s fotosintezo: odpiranje in zapiranje listnih rež, usmerjenost kloroplastov ter encimska aktivnost. Da rastline to dosežejo, cirkadiani ritmi kontrolirajo veliko procesov, vključno z izražanjem genov (Kondo in Ishiura, 1999).

Cirkadiani (lat. circa-približno in dies-dan) ritmi so notranji ritmi s periodo približno 24 ur in so močno razširjeni v naravi (MaClung R. in sod., 2002). Ti ritmi niso samo odgovor na 24-urne spremembe v fizičnem okolju, ki jih povzroča Zemlja s svojim vrtenjem okoli osi, ampak izhajajo iz sistema merjenja časa v organizmu, iz biološke notranje ure. Biološka ura omogoča organizmu, da predvidi in se pripravi na spremembe v fizičnem okolju, ki so povezane z dnevom in nočjo. S tem zagotovi, da organizem pravilno reagira ob pravem času dneva (Hotz-Vitaterna in sod., 2001). Kadar so rastline postavljene v konstantne pogoje in s tem prikrajšane za zunanja časovna znamenja, cirkadiani ritmi vztrajajo in prosto tečejo z notranjo periodo, ki je blizu 24 ur. To nam pokaže, da so ti ritmi resnično notranji in samozadostni. Premikanje listov je prvi priznan pojav, ki je uravnavan s cirkadiano uro. Leta 1960 je bilo ugotovljeno, da tudi žive celice uporabljajo svojo cirkadiano uro za uravnavanje dnevnih sprememb v njihovem okolju (Kondo in Ishiura, 1999). Navadni repnjak (*Arabidopsis thaliana*) je modelna rastlina za preučevanje cirkadianih ritmov (Robertson McClung in sod., 2002), zato so nadaljnji opisi cirkadianega ritma opisani na primeru navadnega repnjaka.

Glavna struktura cirkadianega sistema je sestavljena iz treh delov: iz vhodne poti, osrednjega oscilatorja in izhodne poti (Slika 7), ki so razporejene v linearni vrsti z enosmernim tokom informacij (Robertson McClung in sod. 2002). Osrednji oscilator je lokaliziran v celici. Oscilator je celično avtonomni merilec časa za ustvarjanje samozadostne ritmičnosti oz. rednega nihanja (osciliranja) procesa. Imenujemo ga tudi

spodbujevalnik (Barak, 2000). Faza oscilatorja je določena z vhodnimi potmi, ki reagirajo na zunanje časovne iztočnice kot sta svetloba in temperatura (Konco in Ishiura, 1999). Osrednji oscilator kontrolira izhodne poti, ki poganjajo različne biokemične, fiziološke in obnašanske ritme rastline kot na primer izražanje genov, premikanje listov ter odpiranje in zapiranje listnih rež (Konco in Ishiura, 1999).

## CIRKADIANI SISTEM



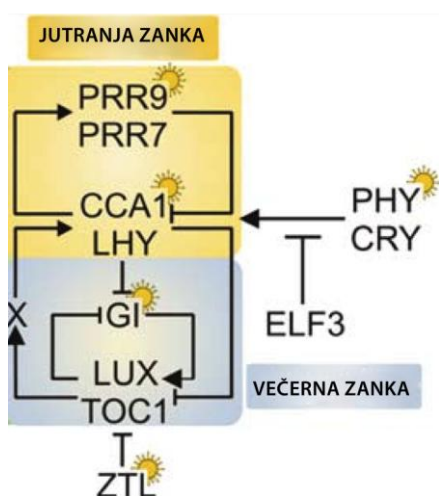
**Slika 7:** Glavna struktura cirkadianega ritma (Robetson McClung in sod., 2002)

Cirkadiani oscilator ima tri značilnosti, ki so bistvenega pomena, da deluje kot »ura«:

- vztrajnost ritmov v odsotnosti zunanjih časovnih iztočnic,
- ponovna nastavitve faz z zunanjimi signali (s svetlobo, temo in/ali temperaturo),
- temperaturna izravnava cirkadiane periode (Kondo in Ishiura, 1999). Perioda cirkadianega ritma ostane relativno konstantna, kljub spremembam temperature v okolju (Robetson McClung in sod., 2002).

Transkripcijska povratna zanka igra ključno vlogo pri cirkadiani uri rastlin na molekularni ravni (Wijnen in Young W., 2006). Povratna zanka je sestavljena iz pozitivne in negativne povratne zanke (Slika 8) (Barak, 2000). Glavni fotoreceptorji odgovorni za vstop svetlobe v uro so fotoreceptorji rdeče svetlobe fitokromi (phytochromes, PHY), to so PHYA, PHYB, PHYC, PHYD in PHYE ter fotoreceptorji modre svetlobe kriptokromi (cryptochromes, CRY), to sta CRY1 in CRY2. Cirkadiana ura ureja njihove komponente, kar omogoča povečanje vnosa vhodnih poti v uro. Na primer, CRY1 in PHYB se najmočneje izrazita sredi dneva, medtem ko se CRY2 in PHYA najbolj izrazita v zadnjem delu dneva (Hotta, 2007). Ob zori svetlobni signali aktivirajo zanko zjutraj izraženih genov, ki je sestavljena iz genov LHY (late elongated hypocotyl, gen za pozno podaljševanje hipokotila), CCA1 (circadian clock associated 1, s cirkadiano uro povezan gen 1), PRR9 (pseudoresponse regulator 9, gen 9 za uravnavanje nepravilnega odgovora) in PRR 7 (pseudoresponse regulator 7, gen 7 za uravnavanje nepravilnega odgovora). Gena LHY in CCA1 sta transkripcijska faktorja MYB, ki ju aktivira svetloba. Proteina, ki ju kodirata ta dva gena spodbujata izražanje genov PRR7 in PRR9, katerih biokemijska funkcija ni poznana. Proteina, ki ju kodirata gena PRR7 in PRR9 pa zavirata izražanje genov LHY in CCA1. Tako ti štirje geni tvorijo negativno povratno zanko, ki je aktivna zjutraj. Proteina, ki ju kodirata gena LHY in CCA1 se čez dan kopičita in zavirata zanko zvečer izraženih genov. V popoldanskih urah se proteina, ki ju kodirata gena LHY in CCA1 razgradita, s čimer se preneha zaviranje izražanja genov GI (gigantea) in TOC1 (timing of CAB expression 1 / PRR1). Protein, ki ga kodira gen GI spodbuja izražanje gena TOC1, protein, ki kodira gen TOC1 pa zavira izražanje gena GI. Protein, ki ga kodira gen GI stabilizira protein, ki ga kodira gen ZTL (zeitlupe), ki je sestavni del ubikvitinske ligaze E3, ki razgrajuje

protein, ki ga kodira gen *TOC1*. Prepisovanje gena *ZTL* ponavadi ni pod nadzorom cirkadianega ritma, vendar kadar je proteina *GI* v izobilju to omogoča ritmične spremembe ravni proteinov *ZTL*. *ZTL* in *GI* se povečata ob prisotnosti modre svetlobe. *ZTL* je fotoreceptor, kar vodi k povečani *ZTL* stabilnosti na koncu dneva, ko se *GI* in *TOC1* začeta kopičiti. Ponoči je interakcija med *GI* in *ZTL* zmanjšana. *ZTL* uravnava koncentracijo *TOC1* ponoči. V prvi polovici noči je izražanje gena *TOC1* največje. Zanka zvečer izraženih genov je povezana nazaj na z zanko zjutraj izraženih genov s posredno aktivacijo izražanja genov *LHY* in *CCA1* s *TOC1* (Robertson, 2009). Ekspresija *LUX* (*LUX* ali phyto-clock 1, *PCL1*), ki ima vezavno domeno DNA *MYB*, je povezana z izražanjem *TOC1* (Robertson, 2009). Rastline, ki čezmerno izražajo *LUX*, postanejo postopoma aritmične, kadar so izpostavljene stalni svetlobi ali konstanstni temi (Hotta, 2007).



Slika 8: Transkripcijske povratne zanke cirkadianega ritma (Robertson, 2009).

#### 2.4.1 Cirkadiano uravnavanje rastlinske imunosti

Rastline so v naravi izpostavljene različnim oblikam stresa. Da se na stres čim bolje odzovejo, zaznavajo notranje in zunanje abiotске dejavnike, kot so svetloba, vlažnost, cirkadiani ritem, temperatura in drugi, ki uravnavajo obrambni odgovor rastline, ki le-tej omogoča čim boljše preživetje in razmnoževanje. Rastlinski imunski odziv je strogo nadzorovan z namenom učinkovite obrambe proti patogenim organizmom, stroga regulacija pa obrambni odgovor zavre, kadar ta ni potreben, da zmanjša negativne učinke obrambnega odgovora na rast in razvoj rastline (Hua, 2013).

Že dolgo je znano, da je svetloba potrebna za popoln odgovor rastlin na okužbo z virusi, bakterijami in glivami. Svetloba je potrebna tudi za aktivacijo različnih obrambnih genov in regulacijo celične smrti (Chandra-Shekara, 2006). Nekateri obrambni mehanizmi, kot na primer nastajanje jasmonske kisline, se pojavijo tudi neodvisno od svetlobe. Svetloba ima pomembno vlogo pri nastanku salicilne kisline, ki je ključna signalna molekula, ki sodeluje v različnih mehanizmih rastlinske naravne imunosti (Roden C. In Ingle A., 2009):

- Mehanizem PTI (PAMP Triggered immunity, PAMP sprožena imunost), ki prepozna molekulo PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern, patogenom

pridruženi molekularni vzorci), ki se je navado v notranjosti mikrobov in se sprosti v okolico šele ob njihovem razpadu.

- Mehanizem ETI (Effector Triggered Immunity, efektorsko sprožena imunost) prepozna specifične mikrobne efektorje. Efektorje prepoznajo gostiteljski proteini, ki jih kodira R gen (Resistance gene, gen za odpornost) in večina od njih jih vsebuje nukleotid-vezavne z levicini bogate ponovitve proteinov (nucleotide binding rich repeat proteins, NB-RR). Aktivacija R proteinov pogosto povzroča lokalno odmiranje celic, tvorbo salicilne kisline (salicylic acid, SA) in vodi do indukcije sistemsko pridobljene odpornosti (systemic acquired resistance, SAR).
- Mehanizem utišanja RNA, ki prepozna neobičajne molekule RNA, ki izhajajo iz virusov in jih razgradi (Hua, 2013).

Študije zaznavanja svetlobe so pokazale, da je salicilna kislina, ki poveča izražanje genov za sintezo s patogenezo povezanih proteinov (pathogen-related protein, PR-protein) odvisna od svetlobe. Ugotovljeno je bilo več komponent s salicilno kislino posredovane poti in mutacije v njih vodijo k večji dovzetnosti za različne patogene. Mutacije genov EDS1 (Enhanced disease susceptibility 1, gen za okrepljeno dovzetnost za bolezen 1), EDS5 (Enhanced disease susceptibility 5, gen za okrepljeno dovzetnost za bolezen 2), PAD4 (Phytoalexin deficient 4, gen za pomanjkljivost fitoaleksina 4) in SID2 (Salicylic acid induction deficient 2, gen za sprožitev pomanjkljivosti salicilne kisline 2) zmanjšajo ali odpravijo patogeno sprožitev povečanja salicilne kisline. Eksogena salicilna kislina ali njen funkcionalni analog BTH (Benzo(1, 2, 3) thiadiazole-7-carbothioic acid, benzo(1, 2, 3) tiadiazol-7-karbotioična kislina) lahko povzročita izražanje gena PR-1 v mutantih eds1, eds5, pad4 in sid2, katerih komponente delujejo v smeri povečanja salicilne kisline. Geni EDS1, EDS5, PAD4 in SID2 imajo pomembno vlogo pri posredovanem odzivu odpornosti R-gena in bazalni odpornosti proti patogenom. Mutacije v teh genih povzročijo večjo dovzetnost za virulentne patogene. Mehanizem preko katerega geni EDS1, EDS5, PAD4 uravnavajo patogeno inducirano akumulacijo salicilne kisline je nejasna (Chandra-Shekara C. A., 2006).

Študije odpornosti navadnega repnjaka proti virusu nagubanosti repe (turnip crinkle virus, TCV) so pokazale, da je odpornost odvisna od genov EDS1, EDS5, PAD4 in SID2. S TCV povzročena preobčutljivostna reakcija (hypersensitive response, HR), to je oblika lokalizirane celične smrti na mestu okužbe, ki se aktivira med ETI, in izražanje gena PR-1 nista odvisna od mutacij, ki vplivajo na salicilno kislino, ker sta neodvisna od salicilne kisline oziroma potrebuje precej nižji nivo salicilne kisline. HR in odpornost na TCV zagotavlja HRT (HR za TCV), ki nosi zapis za R protein. HRT je nezadosten za zagotovitev odpornosti, kadar je odsoten alel rrt. Po inokulaciji rastlin navadnjega repnjaka s TCV so rastline gojili v temi. Zasledili so akumulacijo proste salicilne kisline. V vseh interakcijah rastline s povzročitelji bolezni je potrebna svetloba za sprožitev nadaljnjih s salicilno kislino posredovanih obrambnih odzivov. Svetloba je potrebna za HR odziv (Chandra-Shekara C. A., 2006).

Fotoreceptorji modre svetlobe, proteini CRY1, CRY2, PHOT 1 (Photo-tropin 1) in PHOT2 (Photo-tropin 2), so potrebni za HRT posredovano odpornost na TCV. CRY2 in PHOT2 sta potrebna za stabilnost HRT pod normalno svetlobo. HRT se razgradi v rastlinah izpostavljenim modri svetlobi, kar zmanjša raven proteina CRY2. Fotoreceptorji igrajo ključno vlogo pri stabilnosti proteina R in nadaljnji signalizaciji (Hua, 2013).



Poskusi na navadnem repnjaku divjega tipa ter na kratkodnevni in dolgodnevni cirkadiani mutanti so pokazali, da cirkadiani oscilator z enako periodo, kot jo ima Zemlja pri vrtenju okoli osi, daje rastlinam adaptivno prednost in povečuje fitnes. Dokazani so bili s patogeni inducibilni geni, ki imajo vsakodnevni in cirkadiani ritem izražanja. Do sedaj je bilo ugotovljeno, da se s patogeni inducibilni geni izražajo, ko so inducirani s patogeni, signalnimi molekulami in abiotskim stresom, vendar učinek okužbe v različnih delih dneva na indukcijo izražanja genov ali vzorec ekspresije cirkadianega ritma še ni bil raziskan (Roden in Ingle, 2009). Študije so pokazale pomembno vlogo cirkadianega ritma v obrambi pred patogeni. Ugotovljeno je bilo, da so promotorji genov, potrebni za PTI in ETI, obogateni z večernimi elementi, ki jih regulira ura. Rastline divjega tipa so bolj dovzetne za patogene, ko so okužene ob mraku kot ob zori, kar kaže vlogo ure gena CCA1 za povečano odpornost ob zori. Cirkadiani ritem je bil dokazan v interakciji rastline navadnega repnjaka z bakterijo *Pseudomonas syringae*. Rastline so rastle v prosto tekočih svetlobnih (free-running) pogojih, kar pomeni, da niso bile uravnavane z naravnimi časovnimi iztočnicami. Rastline divjega tipa so pokazale največjo občutljivost okoli polnoči in največjo odpornost zjutraj (Hua, 2013).

RNA vezavni protein 7 bogat z glicinom (Glycine-rich RNA binding protein, GRP7) je moduliran s cirkadiano uro in kot odgovor na okoljski stres. Zanimivo je, da je ta protein močno izražen v celicah zapiralkah, ki uravnavajo odpiranje in zapiranje listnih rež v odgovoru na stres. Protein GRP7 naj bi igral pomembno vlogo pri izvozu mRNA iz jedra, kadar je rastlina pod stresom. Predvideva se, da ima vsaka celica zapiralka svoj cirkadiani oscilator. Obstajajo tudi dokazi, da pride do cirkadianega zapiranja in odpiranja listnih rež kot odgovor na svetobo in temo kot tudi na kemične prenašalce kot so indolocetna kislina, abscizinska kislina in glivni toksin fusicoccin. Cirkadiano odpiranje in zapiranje listnih rež vpliva na aktivnost celic zapiralk v določenih obdobjih dneva. Cirkadiana občutljivost listnih rež na koronatin še ni bila raziskana, vendar predvidevajo, da je prav tako odvisna od cirkadianega ritma. Koronatin je toksin, ki ga sintetizira bakterija *Pseudomonas syringae* in povzroča odpiranje listnih rež po tem, ko se zapre kot odziv na PAMP. Ponoči je vstop mikrobom onemogočen, saj so listne reže zaprte in verjetno tudi manj občutljive na koronatin (Roden in Ingle, 2009).

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1 Rastlinski material

##### 3.1.1 Priprava izhodnega rastlinskega materiala

Za poskus smo uporabili zdrave rastline krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sort Désirée in Igor, ki so jih predhodno vzgajali na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) v tkivni kulturi iz poganjkov stebelnih nodijev. Rastlinske izsečke (stebelne nodije) smo pripravili v sterilnih pogojih v brezprašni komori za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami in jih postavili na modificirano gojišče MS (po 10 ml gojišča v epruveti). Rastline smo gojili v rastni komori za tkivne kulture 4 tedne. Nato smo iz teh rastlin zopet pripravili izsečke (stebelne nodije), ki smo jih postavili v plastične petrijevke s po 40 ml gojišča MS in jih gojili v rastni komori 14 dni, da so se zakoreninili.

Pogoji v rastni komori so bili:

- temperatura v času osvetlitve:  $19 \pm 2$  °C,
- temperatura v času teme:  $17 \pm 2$  °C,
- fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme,
- osvetljenost (gostota pretoka fotonov):  $70\text{--}90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (žarnica Osram L36/W77).

Nato smo iz tkivne kulture rastline presadili v lončke z zemljo in jih 4 tedne vzgajali v rastni komori. Rastline smo zalivali z vodo iz vodovoda.

Pogoji v rastni komori so bili:

- relativna zračna vlaga  $75 \pm 2$  odstotka,
- temperatura v času osvetlitve:  $20 \pm 2$  °C,
- temperatura v času teme:  $18 \pm 2$  °C,
- fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme,
- osvetljenost (gostota pretoka fotonov):  $120\text{--}150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (žarnica Osram L36/W77).

##### 3.1.2 Mehanska inokulacija rastlin krompirja

Za okuževanje rastlin smo uporabili postopek mehanske inokulacije. Najprej smo pripravili pufer za mehansko inokulacijo, ki je bil sestavljen iz:

- 2,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,
- 15,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,
- 0,1 % DIECA,
- pH = 7,6.

Sok za mehansko inokulacijo smo pripravili iz poganjkov s PVY<sup>NTN</sup> okuženih ali zdravih rastlin krompirja sorte Pentland Squire gojenih *in vitro*. Rastline smo homogenizirali v pufru za mehansko inokulacijo v razmerju 1:5 (1 g sveže mase rastlinskega materiala in 5 ml pufra). Homogenat smo inkubirali 5 minut, da se je virus izločil iz materiala.

99 rastlin krompirja sorte Désirée in 144 rastlin krompirja sorte Igor smo razporedili v trikrat (za inokulacijo ob različnih urah) po tri skupine:

- rastline za okuževanje s PVY<sup>NTN</sup>,

- rastline za slepo inokulacijo in
  - neinokulirane rastline,
- pri čemer smo pazili, da so bile rastline v vseh skupinah enako velike.

Vsem rastlinam smo s flomastrom označili peclje treh spodnjih listov, ki smo jih pri s PVY<sup>NTN</sup> okuženih in pri slepo inokuliranih rastlinah posuli s karborundom (Prolabo, VWM International) in premazali s sokom za inokulacijo (2 do 3 kapljice). Rastline okužene s PVY<sup>NTN</sup> smo inokulirali s sokom rastlin, okuženih s PVY<sup>NTN</sup>, slepo inokulirane rastline smo inokulirali s sokom zdravih rastlin. Po 15 minutah smo s puhalko z vodovodno vodo sprali rastlinski sok in karborund z listov. Neinokulirane rastline smo pustili intaktne.

Mehansko inokulacijo smo naredili v različnih delih dneva, ob 8h zjutraj, 14h popoldne in 20h zvečer.

**Preglednica 2:** Prikaz števila rastlin sorte Désirée, ki smo jim popisovali bolezenska znamenja in ki smo jih vzorčili za analizo prisotnosti virusne RNA in virusnih proteinov.

ura okužbe	dnevi po inokulaciji	popisovanje bolezenskih znamenj			popisovanje bolezenskih znamenj in vzorčenje rastlin za analize prisotnosti PVY <sup>NTN</sup>
		intaktne rastline	slepo inokulirane rastline	rastline okužene s PVY <sup>NTN</sup>	rastline okužene s PVY <sup>NTN</sup>
8 h	0 dpi	3	3	3	3
	3 dpi				3
	4 dpi				3
	5 dpi				3
	6 dpi				3
	7 dpi				3
	10 dpi				3
	14 dpi				3
14 h	0 dpi	3	3	3	3
	3 dpi				3
	4 dpi				3
	5 dpi				3
	6 dpi				3
	7 dpi				3
	10 dpi				3
	14 dpi				3
20 h	0 dpi	3	3	3	3
	3 dpi				3
	4 dpi				3
	5 dpi				3
	6 dpi				3
	7 dpi				3
	10 dpi				3
	14 dpi				3

**Preglednica 3:** Prikaz števila rastlin sorte Igor, ki smo jim popisovali bolezenska znamenja in ki smo jih vzorčili za analizo prisotnosti virusne RNA in virusnih proteinov.

ura okužbe	dnevi po inokulaciji	popisovanje bolezenskih znamenj			popisovanje bolezenskih znamenj in vzorčenje rastlin za analize prisotnosti PVY <sup>NTN</sup>
		intaktne rastline	slepo inokulirane rastline	rastline okužene s PVY <sup>NTN</sup>	rastline okužene s PVY <sup>NTN</sup>
8 h	0 dpi	3	3	3	3
	3 dpi				3
	4 dpi				3
	5 dpi				3
	6 dpi				3
	7 dpi				3
	8 dpi				3
	9 dpi				3
	10 dpi				3
	11 dpi				3
	12 dpi				3
	13 dpi				3
	14 dpi				3
	14 h				0 dpi
3 dpi		3			
4 dpi		3			
5 dpi		3			
6 dpi		3			
7 dpi		3			
8 dpi		3			
9 dpi		3			
10 dpi		3			
11 dpi		3			
12 dpi		3			
13 dpi		3			
14 dpi		3			
20 h		0 dpi	3	3	3
	3 dpi	3			
	4 dpi	3			
	5 dpi	3			
	6 dpi	3			
	7 dpi	3			
	8 dpi	3			
	9 dpi	3			
	10 dpi	3			
	11 dpi	3			
	12 dpi	3			
	13 dpi	3			
	14 dpi	3			

### 3.1.3 Spremljanje pojavljanja bolezenskih znamenj

Bolezenska znamenja na rastlinah krompirja sorte Désirée smo opazovali 3, 4, 5, 6, 7, 10 in 14 dni po inokulaciji (dpi), medtem ko smo bolezenska znamenja na rastlinah sorte Igor opazovali vsak dan od 3 do 14 dpi. Bolezenska znamenja smo opazovali ob istem času dneva, kot so bile rastline inokulirane: ob 8h zjutraj, 14h popoldne in 20h zvečer. V vsakem delu dneva smo v vseh treh časovnih točkah bolezenska znamenja natančno popisali in fotografirali na po treh s PVY<sup>NTN</sup> okuženih rastlinah, treh slepo inokuliranih rastlinah in treh neinokuliranih rastlinah, ki so bile med poskusom iste, poleg tega pa še dodatno na treh s PVY<sup>NTN</sup> okuženih rastlinah, ki smo jih v določenem delu dneva v določeni časovni točki vzorčili za analize količine vsebnosti PVY<sup>NTN</sup> (Preglednici 2 in 3).

Na vsaki rastlini smo na 3 spodnjih listih spremljali pojavljanje lokalnih bolezenskih znamenj in na 3 zgornjih listih pojavljanje sistemskih bolezenskih znamenj in jih uvrstili v eno od naslednjih kategorij:

- list brez bolezenskih znamenj,
- list z obročkastimi klorozami,
- list s točkastimi nekrozami,
- list, ki rumeni,
- list, kateremu se suši konica,
- odpadel list.

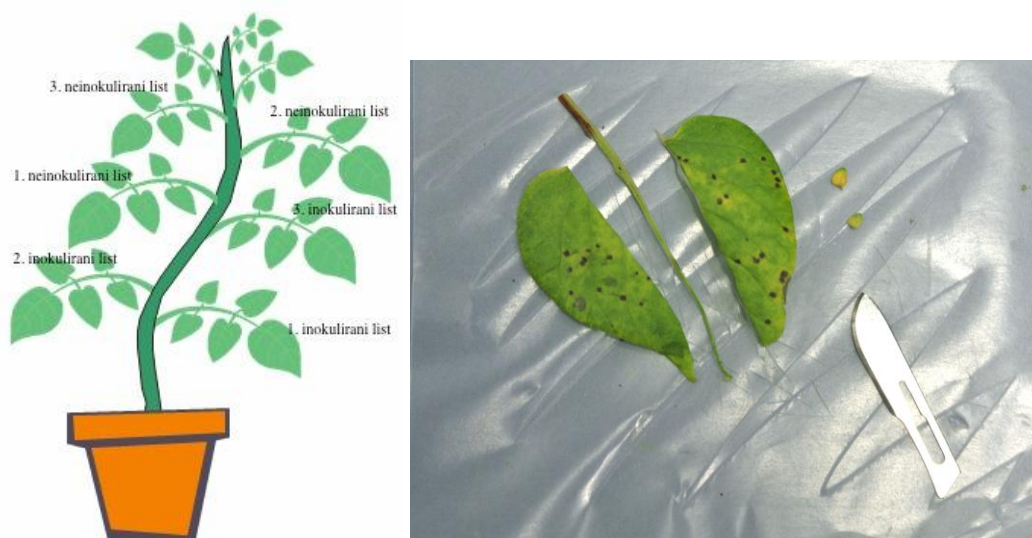
Na vsakem listu smo prešteli število točkastih nekroz in obročkastih kloroz.

Vse rastline in njihove liste smo poslikali s fotoaparatom PENTAX K-7 z nastavitvami: odprtost zaslonke (f/11), čas osvetlitve (2s) in hitrost ISO (ISO-200).

Podatke smo obdelali v programu Microsoft Excel (ZDA). Iz podatkov smo izračunali povprečno vrednost deleža listov s posameznimi bolezenskimi znamenji, standardno deviacijo ter standardno napako. Poleg tega smo izračunali povprečno število točkastih nekroz na list in povprečno število obročkastih kloroz na list. Statistično značilne razlike v pojavljanju bolezenskih znamenj pri rastlinah okuženih ob različnih urah dneva smo poiskali s t-testom.

### 3.1.4 Vzorčenje rastlin

V vsaki časovni točki (v določenem času po inokulaciji) smo vzorčili po 9 s PVY<sup>NTN</sup> okuženih rastlin vsake sorte, to je po 3 rastline vsake sorte za določeno uro dneva (ob 8h zjutraj, 14h popoldne in 20h zvečer). Pobirali smo drugi inokulirani list in drugi neinokulirani list vsake rastline. Vsak list smo s skalpelom razrezali tako, da smo ločili glavno žilo od listne lamine in tako dobili dve polovici lista (Slika 9). Eno polovico lista smo shranili v PVC vrečki v zamrzovalniku (-20 °C) za analizo s testom ELISA, drugo polovico lista in glavno žilo pa smo shranili ločeno v mikrocentrifugiranih (safe lock) ter jih takoj zamrznili v tekočem dušiku. Tako pobran material smo shranili v zamrzovalniku (-80 °C) za analizo qPCR.



**Slika 9:** Levo: Shematski prikaz listov rastlin krompirja. Pobirali smo 2. inokulirani in 2. neinokulirani list. Desno: prikaz razreza listov sorte Igor.

## 3.2 Analiza količine PVY<sup>NTN</sup> s testom ELISA

### 3.2.1 Priprava raztopin za test ELISA

Pred izvedbo testa ELISA smo pripravili pufre, ki smo jih potrebovali za test ELISA:

Karbonatni (coating) pufer:

- 1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- 2,93 g  $\text{NaHCO}_3$
- voda do končnega volumna 1000 ml
- pH= 9.6

10 krat koncentrirani PBS pufer:

- 80 g  $\text{NaCl}$
- 11,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2 g  $\text{KCl}$
- voda do končnega volumna 1000 ml

PBS-Tween pufer (za spiranje):

- 100 ml 10 krat PBS
- 0,5 ml Tween 20
- voda do končnega volumna 1000 ml
- pH= 7.4

PBS-Tween-PVP (za ekstrakcijo):

- 1000 ml PBS-Tween pufer
- 20 g PVP (polivinil pirolidon, K 40.000)
- 2 g BSA (bovine serum albumine)
- pH= 7.4

Konjugatni pufer:

- 0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O
- 1000 ml PBS-Tween-PVP
- pH= 7.4

Substratni pufer:

- 97 ml Dietanolamin
- 0,2 g MgCl<sub>2</sub>
- voda do končnega volumna 1000 ml
- pH=9.8

Pufer za spiranje smo hranili na sobni temperaturi, vse ostale pufre pa v hladilniku na 4 do 6 °C. Substratnega pufra ne smemo izpostavljati svetlobi, zato smo steklenico s pufrom zavili v aluminijasto folijo.

### 3.2.2 Izvedba testa ELISA

Test DAS-ELISA smo naredili po navodilih proizvajalca BIOREBA:

- Po 200 µl primarnih monoklonskih protiteles IgG (Bioreba, 112511) smo nanесли na mikrotiterske ploščice (Greiner) s 96 luknjicami v vsako luknjico razen v vse zunanje luknjice, katerim smo dodali bidestilirano vodo.
- Mikrotiterske ploščice smo inkubirali 4 ure pri 37 °C.
- Mikrotiterske ploščice smo 4 krat po 5 minut spirali s PBS-Tween pufrom .
- Vse vzorce kot tudi pozitivno in negativno kontrolo smo pred nanosom mehansko obdelali v vrečkah z membrano na sredini (Bioreba, Švica) v ekstrakcijskem pufu.
  - Na mikrotiterske ploščice smo vse vzorce nanесли v dveh ponovitvah. Nanесли smo tudi pozitivno, negativno in pufersko kontrolo. Kot pozitivno kontrolo smo nanесли s PVY<sup>NTN</sup> *in vitro* okužene rastline krompirja sorte 'Pentland'. Naredili smo redčine pozitivne kontrole v razmerjih: 1:20, 1:200, 1:2000 in 1:100. Za negativno kontrolo smo uporabili tkiva zdravih rastlin sorte Pentland Squire. Kot pufersko kontrolo smo uporabili ekstrakcijski pufer. V vsako luknjico smo dali po 200 µl vzorca razen v zunanje, v katere smo dodali bidestilirano vodo.
- Mikrotiterske ploščice smo inkubirali čez noč (vsaj 16 ur) v hladilniku pri 7 °C.
- Mikrotiterske ploščice smo 1 krat takoj in 4 krat po 5 minut spirali s PBS-Tween pufrom.
  - Z alkalno fosfatazo konjugirana sekundarna specifična protitelesa (Bioreba 112521) smo redčili v konjugatnem pufu v razmerju 1:2000. Nanесли smo jih po 200 µl v vsako luknjico razen vse zunanje, v katere smo dodali bidestilirano vodo.
- Mikrotiterske ploščice smo inkubirali 4 ure pri 37 °C.
- Mikrotiterske ploščice smo spirali 5 krat po 5 minut s PBS-Tween pufrom.
  - Pripravili smo raztopino substrata, ki je vsebovala 1 mg p-nitrofenil fosfata (Sigma, ZDA) / ml substratnega pufra. Po 200 µl rastopine substrata smo nanесли v vse luknjice. Alkalna fosfataza je hidrolizirala in defosforilizirala substrat p-nitrofenilfosfat, pri čemer je nastal rumen produkt, p-nitrofenol.

- Rezultate smo odčitali pri 450 nm in 490 nm po 15 minutah, 1 uri, 2 urah, 3 urah in 20 urah z ELISA čitalcem Dynatech MR 5000, s programom BioLinX.

Mikrotiterske ploščice smo med inkubacijami pokrivali s folijami in prazno mikrotitersko ploščico.

### 3.2.3 Obdelava podatkov testa ELISA

Podatke, dobljene s testom ELISA, smo obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel (ZDA). Za vsak vzorec smo iz dveh tehničnih ponovitev (nanos vsakega vzorca v dve luknjici na mikrotiterski ploščici) izračunali povprečno vrednost in narisali grafikon, iz katerega smo določili mejo med pozitivnimi (okuženimi) in negativnimi (neokuženimi) vzorci. Za pozitivne vzorce smo šteli tiste, pri katerih je bila absorpcija po dveh urah inkubacije vsaj 2,5-krat večja kot absorpcija negativne kontrole. Iz po treh bioloških ponovitev smo nato izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo, standardno napako. S Studentovim t-testom smo v vsaki časovni točki (dpi) iskali statistično značilne razlike v količini virusa med rastlinami okuženimi ob 8h in ob 14h; med rastlinami okuženimi ob 14h in 20h; ter med rastlinami okuženimi ob 8h in ob 20h.

## 3.3 Analiza količine PVY<sup>NTN</sup> s qPCR

### 3.3.1 Homogenizacija rastlinskega materiala

Polovico lista, ki smo ga shranili v mikrocentrifuhirkah (safe lock) na -80 °C smo ročno strli v terilnicah. Terilnice smo najprej za nekaj časa dali v skrinjo na -80 °C, da smo jih ohladili. V terilnico smo dali tekoči dušik in polovico lista, ga strli v prah in ga dali v novo mikrocentrifugirko. Vzorce smo imeli med trenjem ves čas v tekočem dušiku.

### 3.3.2 Izolacija RNA

Izolacijo RNA smo izvedli s kompletom MagMAX<sup>TM</sup>-96 Total RNA Isolation Kit (Ambion®, ZDA) po navodilih proizvajalca. Metoda je namenjen hitrejši izolaciji celotne RNA na osnovi magnetnih delcev katerih površina veže nukleinske kisline, kar omogoča odstranitev ostankov celic, proteinov in drugih kontaminantov s spiranjem.

Najprej smo pripravili vse potrebne mešanice za izolacijo s kompletom MagMAX<sup>TM</sup>:

- raztopino Lysis / Binding Solution Concentrate tako, da smo zmešali:
  - 270 µl raztopine Lysis / Binding Solution concentrate in
  - 10 µl raztopine Plant RNA Isolation AID;
- raztopino Bead mix tako, da smo zmešali:
  - 10 µl raztopine RNA binding Beads in
  - 10 µl raztopine Lysis / Binding Enhancer;
- raztopino Diluted TURBO<sup>TM</sup> Dnase tako, da smo zmešali:
  - 49 µl raztopine MagMAX<sup>TM</sup> TURBO<sup>TM</sup> Dnase Buffer in
  - 1 µl raztopine TURBO<sup>TM</sup> Dnase.



K homogeniziranemu rastlinskemu materialu smo dodali 300  $\mu$ l raztopine Lysis/Binding solution Concentrate, vorteksirali in centrifugirali 2 minuti pri obratih 14000g in temperaturi 20 °C. Tako dobljeni supernatant in raztopine smo nanесли na KingFischer-96 ploščice po shemi, ki je prikazana v Preglednici 4.

**Preglednica 4:** Shema nanosa vzorcev in reagentov na ploščico KingFischer-96.

Vrstica na ploščici	Reagenti	Volumen
<b>A</b>	Supernatant homogeniziranega tkiva v raztopini Lysis/Binding Solution Concentrate	50 $\mu$ l
	Izopropanol	35 $\mu$ l
	Raztopina Bead mix	20 $\mu$ l
<b>B</b>	Raztopina Wash solution 1	150 $\mu$ l
<b>C</b>	Raztopina Wash solution 2	150 $\mu$ l
<b>D</b>	Raztopina Diluted TURBO™ DNase	50 $\mu$ l
<b>E</b>	Raztopina Wash solution 2	150 $\mu$ l
<b>F</b>	Raztopina Wash solution 2	150 $\mu$ l
<b>G</b>	Raztopina Elution Buffer	50 $\mu$ l

Ploščico z nanesenimi reagenti smo postavili v aparaturo KingFischer (Thermo Scientific) in izbrali program MagMax96\_totRNA. Proces je trajal približno 25 minut po naslednjem postopku:

- V vrstici A se je celokupna RNA vezala na magnetne kroglice (RNA binding beads).
- Magnetne kroglice z vezano celokupno RNA so se prenesle v vrstico B, kjer so se sprale v raztopini Wash Solution1.
- Iz vrstice B so se prenesle v vrstico C, kjer so se sprale v raztopini Wash solution 2.
- Iz vrstice C so se prenesle v vrstico D z raztopino Diluted TURBO™ DNase, kjer je encim Dnaza razgradil genomsko DNA (gDNA), ki smo jo izolirali kot stranski produkt in bi motila nadaljnje analize.
- Naprava se je nato ustavila. Potrebno je bilo dodati 100  $\mu$ l raztopine RNA re-binding Solution, da se je celokupna RNA ponovno vezala na magnetne kroglice.
- RNA vezana na magnetne kroglice so se prenesle v vrstici E in F, kjer so se sprale v raztopini Wash Solution 2.
- RNA vezana na magnetne kroglice se je posušila nad vrstico F in se nato prenesla v vrstico G, kjer se je raztopila v elucijskem pufri (raztopina Elution Buffer).
- Magnetne kroglice so se prenesle v vrstico B, izolirana celotna RNA pa se je nahajala v vrstici G v elucijskem pufri.

Iz vrstice G smo 50  $\mu$ l celokupne RNA v elucijskem pufri prenesli v mikrocentrifugirke in jo shranili v zmrzovalniku na -80 °C.

### 3.3.3 Elektroforeza na agaroznem gelu

Za določitev kvalitete izolirane RNA (da smo preverili, da se RNA ni razgradila) smo uporabili elektroforezo na agaroznem gelu.

Pripravili smo 1,5% agarozni gel s segrevanjem agaroze v 1 X TAE pufu. Dodali smo etidijev bromid 24  $\mu$ l/ 40 ml pufra). Gel smo vlili v nosilec z glavnikom in počakali, da se strdi (~30 minut). Strjeni gel smo prenesli v elektroforetsko banjico s TAE pufrom in bili pozorni, da je bil v celoti potopljen. Odstranili smo glavnik in nanесли vzorce, ki smo jih pripravili tako, da smo 3  $\mu$ l vzorca dodali 2  $\mu$ l nanašalnega pufra, ki povzroči usedanje vzorcev v jamice na gelu. Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 100V v napajalniku POWER/ PAC 1000. Nukleinske kisline smo detektirali s pomočjo UV transiluminatorja pri valovni dolžini 254 nm. Gele smo slikali s sistemom GelDocMega (UVIttec, Velika Britanija). Relativno koncentracijo RNA smo določili glede na primerjavo jakosti intenzitete fluorescence med vzorci, iz velikosti fragmentov pa smo določili integriteto RNA.

### 3.3.4 Merjenje koncentracije RNA

Koncentracijo izolirane RNA v vzorcih smo izmerili spektrofotometrično z aparaturo NanoDrop ND-1000. Delovanje spektrofotometra NanoDrop ND-1000 temelji na tehnologiji optičnih vlaken. Za določitev koncentracije RNA smo uporabili 1  $\mu$ l vzorca, katerega je spektrofotometer oblikoval v stolpec dolžine 1 mm. Meritve smo izvajali pri valovni dolžini 260 nm, pri kateri nukleinske kisline absorbirajo največ UV svetlobe. Spektrofotometer je najprej izmeril intenziteto svetlobe, ki je potovala skozi topilo, v katerem smo imeli raztopljeno RNA (v našem primeru je bil to elucijski pufer). Nato je izmeril intenziteto svetlobe, ki je potovala skozi vzorec RNA. Za izračun absorbance smo izračunali logaritem razmerja med jakostjo svetlobe, ki je potovala skozi vzorec RNA (elucijski pufer) in jakostjo svetlobe, ki je potovala skozi elucijski pufer po enačbi (1):

$$\text{Absorbanca} = - \log \left( \frac{\text{Intenziteta}_{\text{vzorec}}}{\text{Intenziteta}_{\text{pufer}}} \right) \quad (1)$$

Za izračun koncentracije nukleinskih kislin smo uporabili Beer-Lambertovo enačbo (2):

$$c = (A * e) / b \quad (2)$$

pri kateri je c koncentracija nukleinskih kislin (ng /  $\mu$ l), A je absorbanca (a.u, arbitrary units), e koeficient ekstinkcije (ng cm /  $\mu$ l), ki je odvisen od valovne dolžine in b dolžina stolpca (cm). Koefecient ekstinkcije nam pove kako močno neka snov absorbira svetlobo določene valovne dolžine. Koefecient ekstinkcije za RNA pri valovni dolžini 260 nm je 40 ng cm /  $\mu$ l.

### 3.3.5 Rt-qPCR v enem koraku

Metodo qPCR smo uporabili za detekcijo in relativno kvantifikacijo virusa PVY<sup>NTN</sup> v vzorcih. Tarčna molekula, ki smo jo pomnoževali je bil gen za plašni protein virusa PVY<sup>NTN</sup> (PVY-NTN). Kot referenčni gen (za normalizacijo glede na učinkovitost izolacije reverzne transkriptaze) smo pomnoževali gen za citokrom oksidazo (COX), ker smo

predpostavili, da inokulacija rastlin z virusom ne spremeni izražanja gena za COX. Detekcija je temeljila na kemiji TaqMan, z uporabo barvil FAM in TAMRA. Reakcijo RT-qPCR v enem koraku smo izvedli v aparaturi ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA).

Za RT-qPCR v enem koraku smo uporabili komplet AgPath-ID One-step RT-PCR kit (Ambion, ZDA) ter začetne oligonukleotide (smiselne – F in protismiselne – R) in sonde za amplikona PVY-NTN in COX, ki so jih predhodno načrtovali in optimizirali na Nacionalnem inštitutu za biologijo (Preglednica 5).

**Preglednica 5:** Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov (F, R) in sond (S).

PVYuni – S	TGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCA
PVYuni – F	CATAGGAGAAACTGAGATGCCAACT
PVYuni – R	TGGCGAGGTTCCATTTTCA
COX – S	TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT
COX – F	CGTCGCATTCCAGATTATCCA
COX – R	CAACTACGGATATATAAGAGCCAA AACTG

Pripravili smo 10 µL reakcijske mešanice, ki so vsebovale:

- 8 µL mešanice
  - 5 µL 2X pufra AgPath
  - 0,4 µL 25x encima RT-PCR AgPath
  - 1,7 µL Rnase-free voda
  - 0,3 µL 10 µM začetni oligonukleotid F
  - 0,3 µL 10 µM začetni oligonukleotid R
  - 0,3 µL 5 µM sonda
- 2 µL vzorca RNA (z razgrajeno genomsko DNA in ustrezno redčenega)

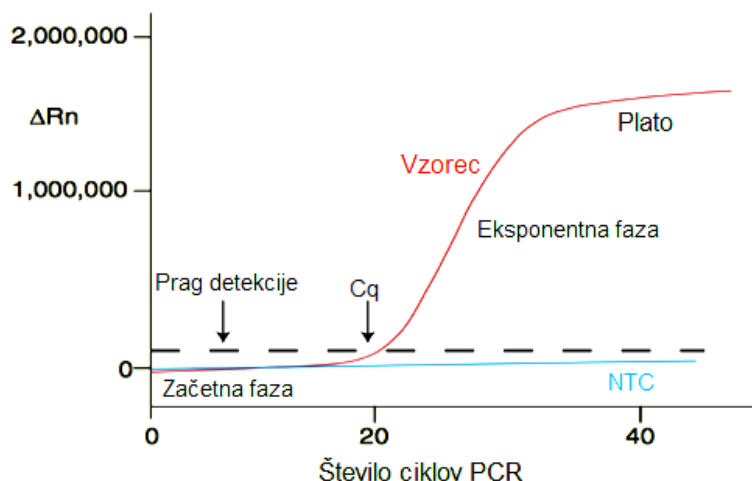
Vsako vzorec izolirane RNA (z razgrajeno DNA) smo dvakrat redčili in razlika med obema redčitvama je bila 10-kratna (10x, 100x). Vzorce smo na mikrotitersko ploščico nanašali v dveh paralelkah za vsako redčino RNA, za oba amplikona (COX in PVY-NTN). Vzorce smo na ploščice nanašali s pomočjo robota za pipetiranje Multiprobe II (Perkin Elmer, ZDA). V luknjice mikrotiterskih ploščic smo najprej nanjali vzorčne RNA in nato reakcijske mešanice. Za vsako ploščico smo pripravili tudi umeritveni krivulji pomnoževanja obeh amplikonov (COX in PVY-NTN). Za pripravo umeritvene krivulje smo izbrali vzorce RNA, ki so vsebovali obe tarčni molekuli. Pripravili smo serijo redčitev RNA vzorca med katerimi so bile 10-kratne razlike (10x, 100x, 1000x, 10000x).

RT-qPCR v enem koraku smo izvedli pri naslednjih pogojih:

- 10 min pri 48 °C za reakcijo reverzne transkripcije
- 10 min pri 95 °C za inaktivacijo reverzne transkriptaze in aktivacijo polimeraze
- 40 ciklov: 15 s pri 95 °C, 1 min pri 60 °C (pomnoževanje cDNA)

### 3.4.3 Analiza podatkov qPCR

Podatke dobljene s qPCR smo analizirali s programom SDS 2.4. Program je izrisal graf pomnoževanja produkta s PCR (Slika 10), pri katerem je bilo število ciklov nanešeno na os x, sprememba v emisiji fluorescence ( $\Delta Rn$ ) pa na os y. Profil pomnoževanja je vseboval tri faze: začetno fazo, eksponentno fazo in fazo platoja.



Slika 10: Graf pomnoževanja produktov s PCR (Arya, 2005).

Iz grafa smo odčitali vrednost  $C_q$ , to je cikel, v katerem je vzorec prešel prazno fluorescenco in kjer je bil fluorescenčni signal produktov PCR višji od fluorescence ozadja. Vrednost  $C_q$  je odvisna od količine tarčnih molekul na samem začetku reakcije, tako pri večjem številu tarčnih molekul fluorescenčni signal prej preseže prag. Vrednosti  $C_q$  padajo sorazmerno z večanjem začetne količine tarčnih zaporedij.

Vrednosti  $C_q$  smo prenesli v program Microsoft Excel (ZDA) v katerem smo analizirali izražanje izbranih genov.

Teoretično se število kopij zelenega odseka v vsakem ciklu podvoji in v tem primeru je učinkovitost pomnoževanja enaka 2. Vendar pa na potek reakcije pomnoževanja vplivajo različni dejavniki in zato se lahko učinkovitost spreminja. Učinkovitost pomnoževanja ( $E$ ) posameznega testa smo izračunali iz naklona ( $s$ ) linearne regresijske krivulje po enačbi (3):

$$E = 10^{1/(-s)} \quad (3)$$

Učinkovitost pomnoževanja v posameznih vzorcih smo primerjali z učinkovitostjo pomnoževanja redčitvene vrste. Če se učinkovitosti nista preveč razlikovali, smo iz učinkovitosti pomnoževanja redčitvene vrste izračunali relativno število kopij v vzorcu.

Količino virusne RNA smo še normalizirali glede na gen za normalizacijo COX.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Bolezenska znamenja rastlin krompirja okuženih s PVY<sup>NTN</sup> v različnem delu dneva

#### 4.1.1 Bolezenska znamenja pri sortah Désirée in Igor

Bolezenska znamenja smo zasledili na inokuliranih listih in neinokuliranih listih sorte Igor, pri sorti Désirée pa smo bolezenska znamenja opazili le na inokuliranih listih (Slika 11). Bolezenska znamenja so se pojavila kot obročkaste kloroze (v obliki zelenih obročkov) in točkaste nekroze (v obliki črnih pik), rumenenje listov, sušenje konic listov in hitrejše odpadanje listov. Bolezenska znamenja so bila pri sorti Igor bolj izrazita kot pri sorti Désirée. Pri sorti Igor se je pojavilo več točkastih nekroz, obročkastih kloroz je bilo malo. Pri sorti Désirée pa se je pojavilo več obročkastih kloroz kot točkastih nekroz.

Hitrost razvoja lokalnih bolezenskih znamenj, kot so pojav točkastih nekroz in obročkastih kloroz, rumenenje in odpadanje listov, je sorazmerno s stopnjo občutljivosti sorte krompirja na PVY (Mehle, 2004). Opazili smo razlike v izražanju bolezenskih znamenj med sortama Désirée in Igor, ki sta različno občutljivi na PVY<sup>NTN</sup>.

Pri sorti Désirée smo prva bolezenska znamenja na s PVY<sup>NTN</sup> okuženih rastlinah opazili 7 dpi. Pojavile so se obročkaste kloroze in točkaste nekroze. Odpadanje listov se je pri okuženih rastlinah začelo 10 dpi. 14 dpi inokuliranih listov niso odvrgele le rastline, ki so bile okužene ob 8h. Podoben odziv sorte Désirée na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> so ugotovili tudi v predhodnih raziskavah. Prve znake okužbe so pri sorti Désirée zaznali med 5 in 8 dpi, vsi inokulirani listi so odpadli med 14 in 20 dpi (Mehle, 2004).

Pri sorti Igor so se prva bolezenska znamenja pojavila 3 dpi. Pojavile so se točkaste nekroze. Odpadanje listov se je začelo 5 dpi. Po 14 dpi je večina okuženih rastlin ostala brez inokuliranih listov. Podoben odziv sorte Igor na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> so ugotovili tudi v predhodnih raziskavah. Prve znake okužbe sort so zaznali med 4 in 5 dpi (Baebler, 2006). Vsi inokulirani listi so odpadli med 7 in 10 dpi (Mehle, 2004).

Rumenenje rastlin je posledica staranja rastline in virusne okužbe in je bilo prisotno tako pri intaktnih, slepo inokuliranih in okuženih rastlinah. Pri intaktnih in slepo inokuliranih rastlinah se je rumenenje pojavilo kot posledica staranja rastline. Pri okuženih rastlinah se je rumenenje pojavilo kot posledica staranja rastline in kot odziv rastline na virus.



**Slika 11:** Levo: rastlina sorte Désirée okužena s PVY<sup>NTN</sup> 10 dpi. Desno: rastlina sorte Igor okužena s PVY<sup>NTN</sup> 9 dpi.

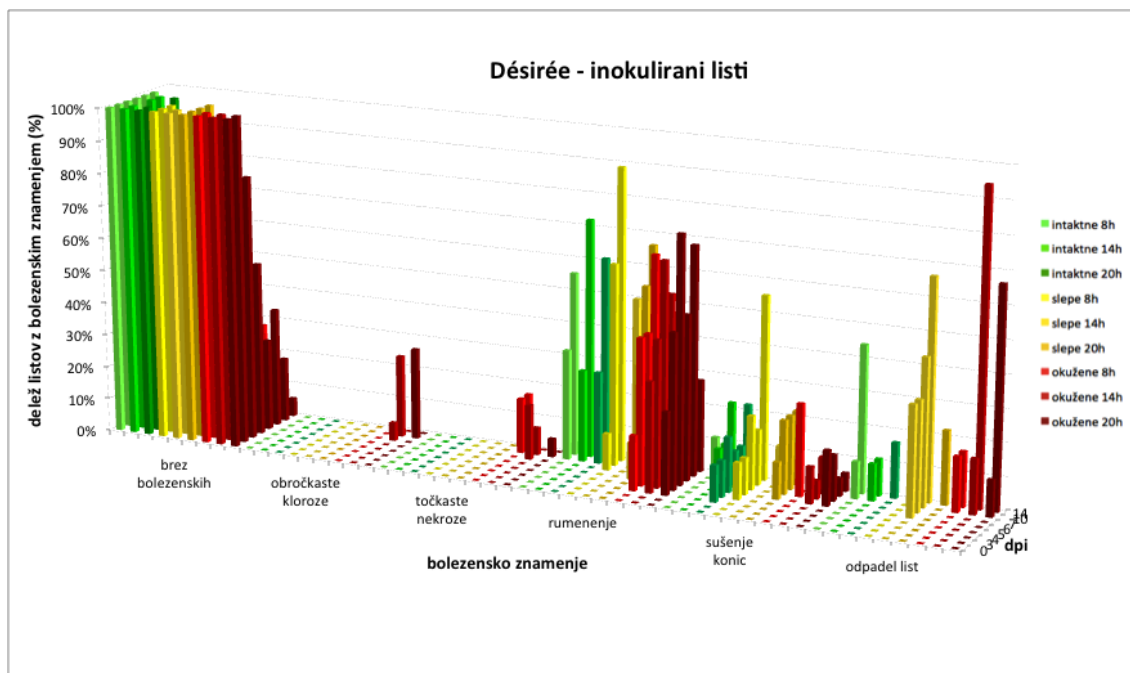
#### 4.1.2 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na inokuliranih listih rastlin sorte Désirée

Na inokuliranih listih rastlin sorte Désirée so se prva bolezenska znamenja okužbe s PVY<sup>NTN</sup> pokazala 4 dpi kot rumenenje listov. 4 dpi je bil delež listov, ki so rumeneli, večji pri rastlinah, ki so bile okužene ob 14h ali ob 20h, kot pri rastlinah, ki so bile okužene ob 8h.

Prve točkaste nekroze in obročkaste kloroze smo na inokuliranih listih sorte Désirée našli 7 dpi, vendar le na rastlinah, ki so bile okužene ob 14h. Na teh rastlinah so se pojavile tako točkaste nekroze kot tudi obročkaste kloroze. V naslednji opazovani časovni točki 10 dpi, so se točkaste nekroze pojavile tudi pri rastlinah, ki so bile okužene ob 8h in ob 20h. 10 dpi je bilo točkastih nekroz več pri rastlinah, okuženih ob 8h in 14h kot pri rastlinah, okuženih ob 20h. 14 dpi so bile točkaste nekroze prisotne v glavnem samo še na rastlinah okuženih ob 8h na račun velikega deleža odpadlih inokuliranih listov (93% oz. 65%) pri rastlinah, okuženih ob 14h in ob 20h. 14 dpi je pri rastlinah, okuženih ob 20h in ob 14h odpadlo statistično značilno več inokuliranih listov, kot pri rastlinah okuženih ob 8h (Priloge A, B in C).

Obročaste kloroze pa smo 10 dpi poleg pri rastlinah okuženih ob 14h opazili le še pri rastlinah, okuženih ob 20h, medtem ko obročkastih kloroz pri rastlinah, okuženih ob 8h nismo opazili v nobeni časovni točki.

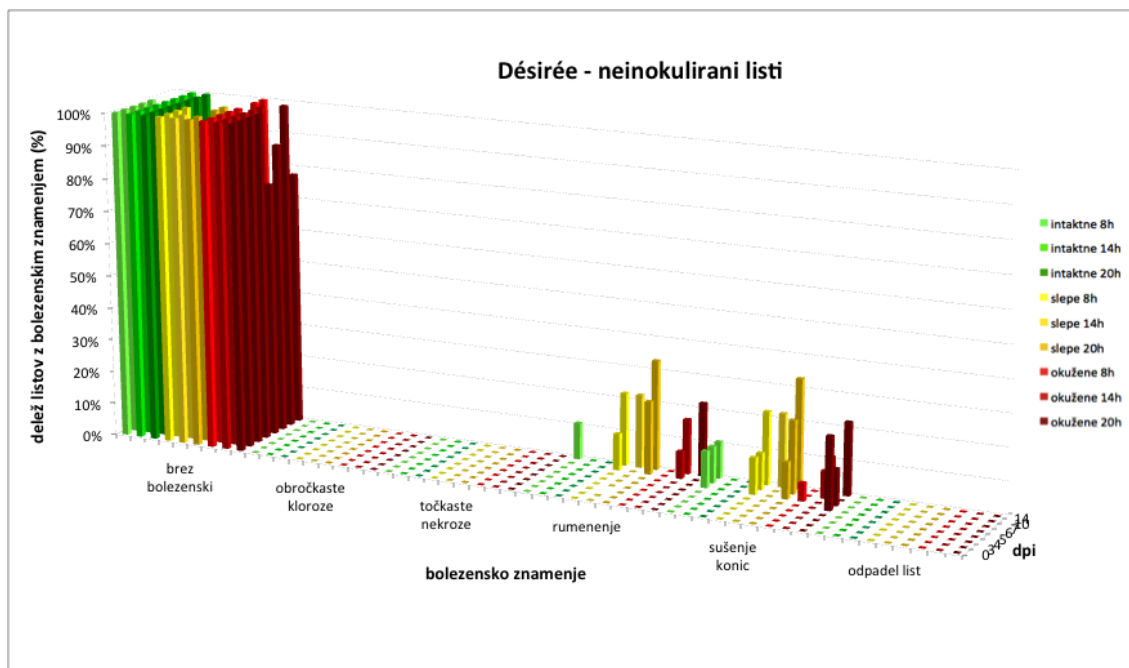
Sušenja konic inokuliranih listov sorte Désirée ne moremo šteti med bolezenska znamenja, ki jih povzroča okužba s PVY<sup>NTN</sup>, saj smo sušenje konic listov opazili tudi pri intaktnih in slepo inokuliranih rastlinah in to celo prej in pri večjem deležu listov kot pri okuženih rastlinah (Slika 12).



Slika 12: Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na inokuliranih listih sorte Désirée.

#### 4.1.3 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na neinokuliranih listih rastlin sorte Désirée

Na neinokuliranih listih rastlin sorte Désirée se bolezenska znamenja okužbe s PVY<sup>NTN</sup> niso pojavila pri rastlinah, okuženih ob nobenem času dneva. Majhnega deleža listov, ki so rumeneli ali so se jim sušile konice, ne moremo šteti kot bolezensko znamenje okužbe s PVY<sup>NTN</sup>, ker se je podoben delež deleža listov, ki so rumeneli ali so se jim sušile konice, pojavil tudi pri slepo inokuliranih in intaktnih rastlinah (Slika 13).



**Slika 13:** Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na neinokuliranih listih sorte Désirée.

#### 4.1.4 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na inokuliranih listih rastlin sorte Igor

Na inokuliranih listih rastlin sorte Igor (Slika 14) so se prva bolezenska znamenja okužbe s PVY<sup>NTN</sup> pokazala 3 dpi kot točkaste nekroze na rastlinah, ki so bile okužene ob 14h. En dan kasneje, 4 dpi, so se točkaste nekroze pojavile tudi na rastlinah, ki so bile okužene ob 20h. 5 dpi so se točkaste nekroze pojavile še na rastlinah, ki so bile okužene ob 8h. Kljub temu, da so se točkaste nekroze na inokuliranih listih pri rastlinah, okuženih ob 8h, pojavile najkasneje, so imele 5 in 6 dpi največji delež listov s točkastimi nekrozami. Točkaste nekroze so pri rastlinah, okuženih ob 8h močno naraščale do 9 dpi, pri rastlinah, okuženih ob 14h do 7 dpi, pri rastlinah, okuženih ob 20h pa do 10 dpi, nato je njihovo število začelo upadati na račun odpadanja listov. Odpadanje listov se je pri rastlinah, okuženih ob 20h začelo 5 dpi. 6 dpi so listi začeli odpadati tudi rastlinam, okuženim ob 8h in 14h. 14dpi so rastline, okužene ob 20h ostale že skoraj brez vseh inokuliranih listov. 14 dpi je rastlinam, okuženim ob 14h in 20h odpadlo statistično značilno več inokuliranih listov kot rastlinam, okuženim ob 8h (Priloge D, E, F).

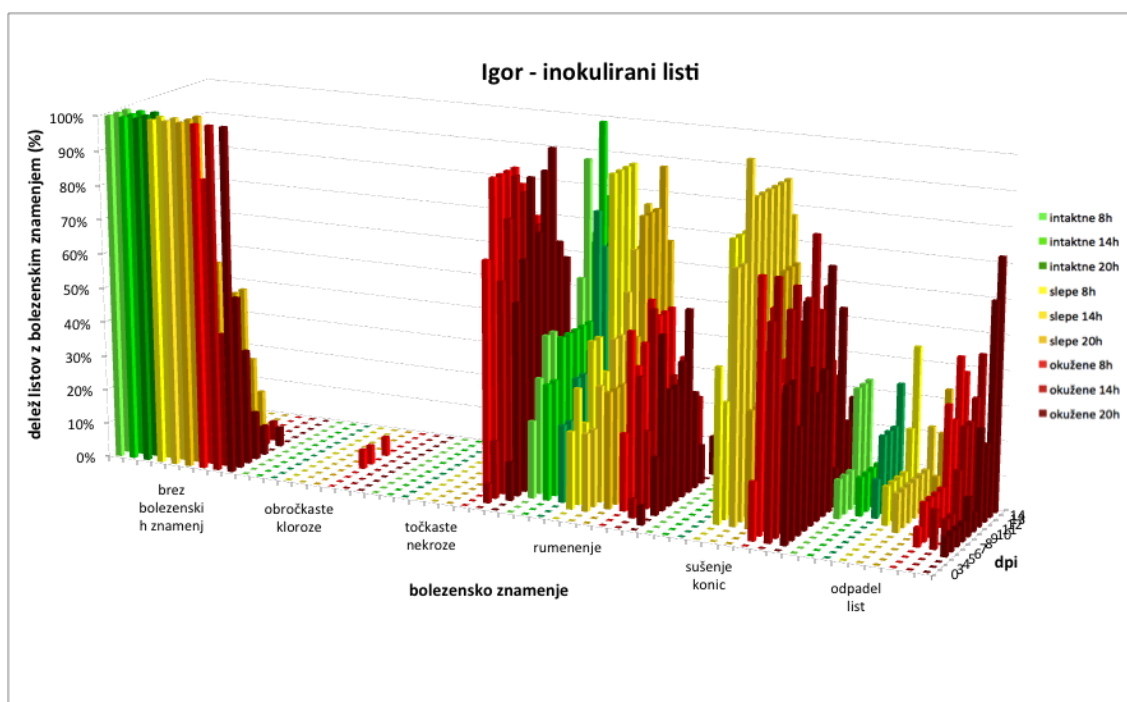
Obročkaste kloroze so se pojavile na zelo majhnem deležu inokuliranih listov sorte Igor in še to samo pri rastlinah okuženih ob 8h med 6 in 9 dpi. Pri rastlinah okuženih ob 14h in ob 20h jih nismo opazili.

Rumenenja listov ne moremo pripisati virusni okužbi, ker je rumenel tudi podoben delež listov intaktnih in slepo inokuliranih rastlin.

Sušenje konic listov okuženih rastlin se je začelo 3 dpi, to je dva dni prej kot pri slepo inokuliranih rastlinah, kjer se je začelo 5 dpi. Pri slepo inokuliranih in s PVY<sup>NTN</sup>



okuženih rastlinah se je sušenje konic nadaljevalo vse do 14 dpi, medtem ko pri intaktnih rastlinah sušenja konic nismo opazili. Prvi dan pojava sušenja konic listov je bil delež listov, ki se jim je sušila konica, največji pri rastlinah, okuženih ob 14h, nekoliko manjši pri rastlinah, okuženih ob 20h in še bistveno manjši pri rastlinah, okuženih ob 8h. 11 dpi je bil delež listov, ki se jim je sušila konica, statistično značilno večji pri rastlinah, okuženih ob 14h kot pri rastlinah, okuženih ob 20h (Priloga F).



Slika 14: Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na inokuliranih listih sorte Igor.

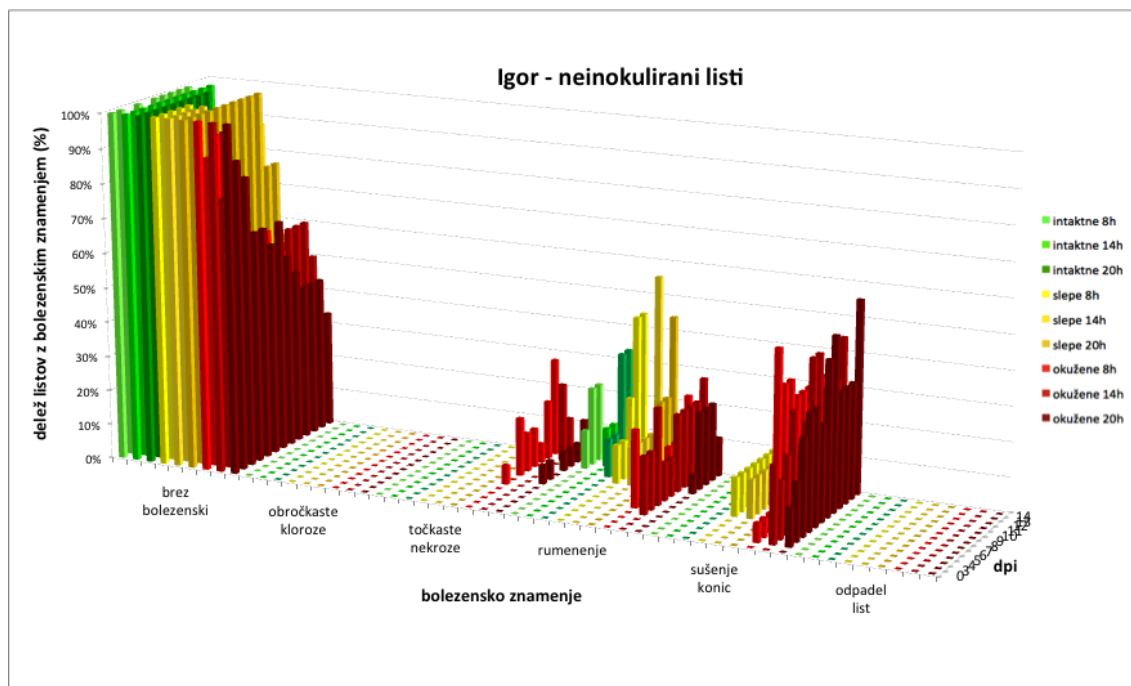
#### 4.1.5 Vpliv časa okužbe na pojavljanje bolezenskih znamenj na neinokuliranih listih rastlin sorte Igor

Na neinokuliranih listih s PVY<sup>NTN</sup> okuženih rastlin sorte Igor smo opazili pojavljanje točkastih nekroz, rumenenje in sušenje listnih konic. Pri rastlinah okuženih ob 8h so se točkaste nekroze pojavile že 7 dpi, pri rastlinah, okuženih ob 20h 8 dpi, pri rastlinah, okuženih ob 14h pa šele 12 dpi.

Rumenenje se je pri rastlinah, okuženih ob 14h pojavilo že 5 dpi, pri rastlinah, okuženih ob 8h 6 dpi in pri rastlinah, okuženih ob 20h pa šele 10 dpi, sočasno kot pri slepo inokuliranih rastlinah (10 dpi) in en dan prej kot pri intaktnih rastlinah (11 dpi).

Sušenje konic se je pri rastlinah, okuženih ob 8h, 14h in 20h pojavilo 3 dpi, s tem, da je bil prvi dan pojava sušenja konic delež listov, ki se jim je sušila konica, največji pri rastlinah, okuženih ob 14h, nekoliko manjši pri rastlinah, okuženih ob 20h in najmanjši pri rastlinah, okuženih ob 8h. S časom so deleži listov, ki se jim je sušila konica, različno naraščali, tako je bil 6 dpi največji delež listov, ki se jim je sušila konica, pri rastlinah, okuženih ob 8h, 14 dpi pa pri rastlinah, okuženih ob 20h. Sušenje konic se je

pri pri slepo inokuliranih rastlinah pojavljajo od 7 dpi dalje, pri intaktnih rastlinah pa sušenja konic nismo zasledili (slika 15).



**Slika 15:** Pojavljanje bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah na neinokuliranih listih sorte Igor

#### 4.1.6 Vpliv časa okužbe na pojavljanje točkastih nekroz in obročkastih kloroz na rastlinah sorte Désirée

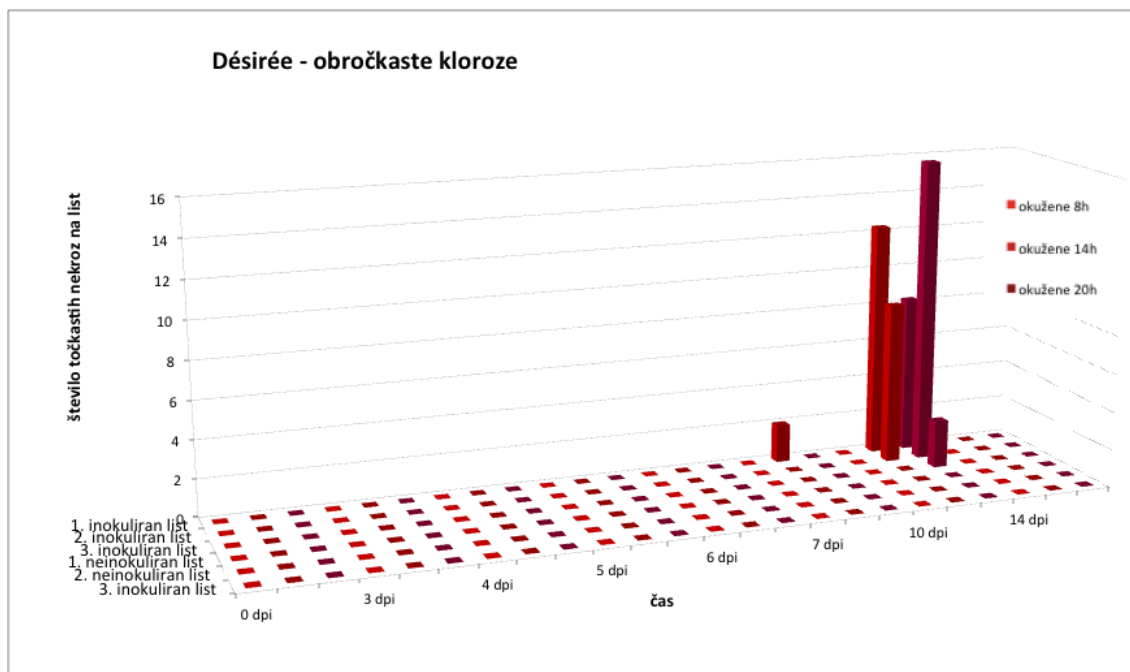
Pri sorti Désirée smo opazili, da se je po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> pojavilo več obročkastih kloroz kot točkastih nekroz (Slika 16).



**Slika 16:** Levo: obročkaste kloroze na inokuliranem listu sorte Désirée. Desno: Točkaste nekroze na inokuliranem listu sorte Désirée.

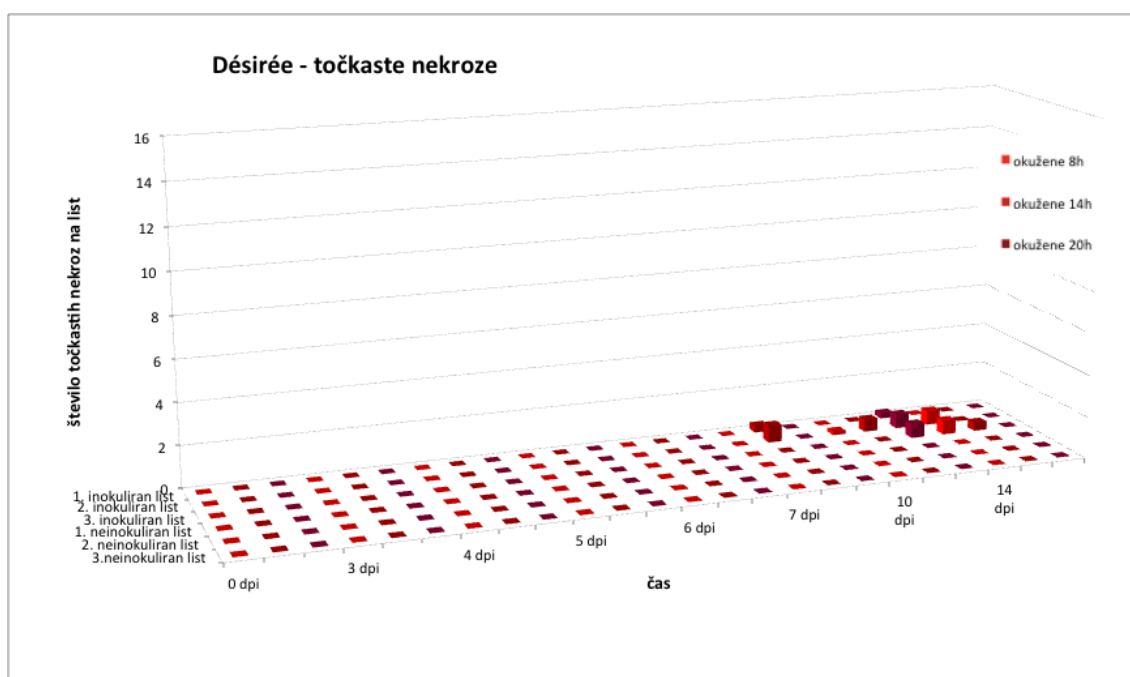
Obročaste kloroze so se prvič pojavile 7 dpi na rastlinah, okuženih ob 14h. Obročastih kloroz je bilo največ 10 dpi na rastlinah, okuženih ob 14h in 20h, nismo pa jih zasledili na rastlinah, okuženih ob 8h. Statistično značilnih razlik ni bilo, verjetno zato, ker smo v posamezni časovni točki med seboj primerjali le po 6 rastlin, vendar se kaže trend, da so imele rastline, okužene ob 14h in 20h večje število obročkastih kloroz

na inokuliranih listih kot rastline okužene ob 8h. Na nenokuliranih listih nismo opazili pojavljanja obročkastih kloroz (Slika 17).



Slika 17: Pojavljanje obročkastih kloroz na listih sorte Désirée.

Točkastih nekroz je bilo številčno manj kot obročkastih kloroz. Točkaste nekroze so se najprej pojavile 7 dpi pri rastlinah, okuženih ob 14h. 10 dpi so se točkaste nekroze pojavile na rastlinah, okuženih ob 20h. 14 dpi pa so se pojavile tudi na rastlinah, okuženih ob 8h. Statistično značilnih razlik ni bilo, se pa kaže trend, da so se točkaste nekroze prej pojavile na rastlinah, okuženih ob 14h in 20h kot na rastlinah, okuženih ob 8h. Na nenokuliranih listih se točkaste nekroze niso pojavile (Slika 18).



Slika 18: Pojavljanje točkastih kloroz na listih sorte Désirée.

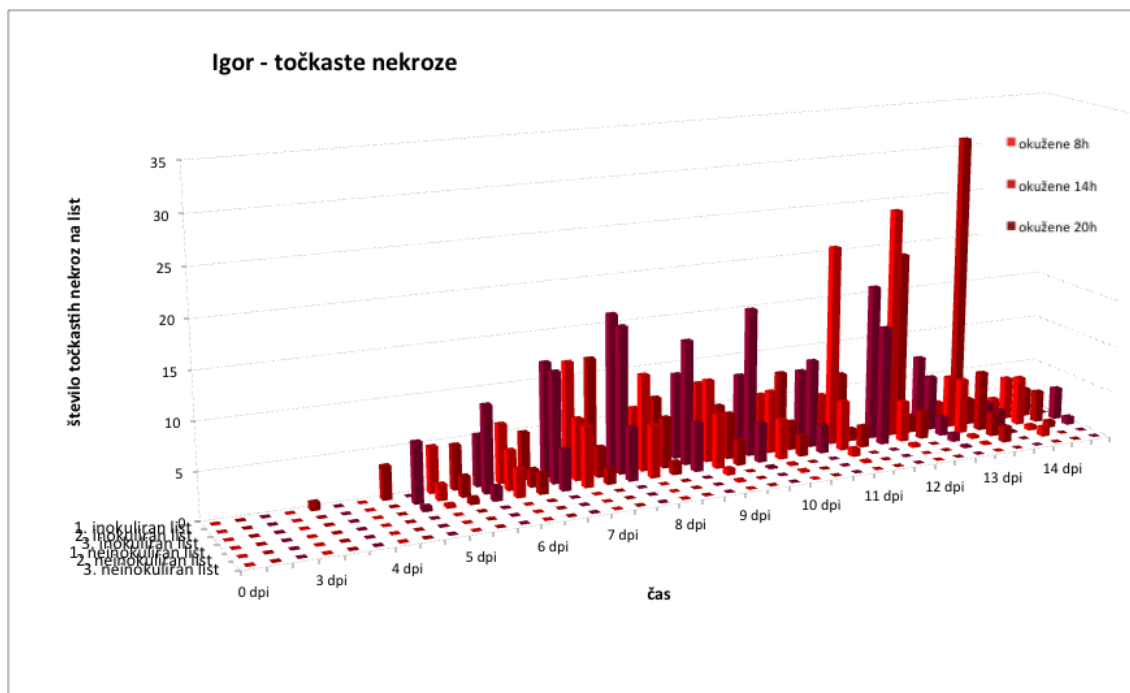
#### 4.1.7 Vpliv časa okužbe na pojavljanje točkastih nekroz in obročkastih kloroz na rastlinah sorte Igor

Pri sorti Igor smo opazili pojavljanje točkastih nekroz tako na inokuliranih kot neinokuliranih rastlinah. Pojavilo se je več točkastih nekroz kot obročkastih kloroz (Slika 19).



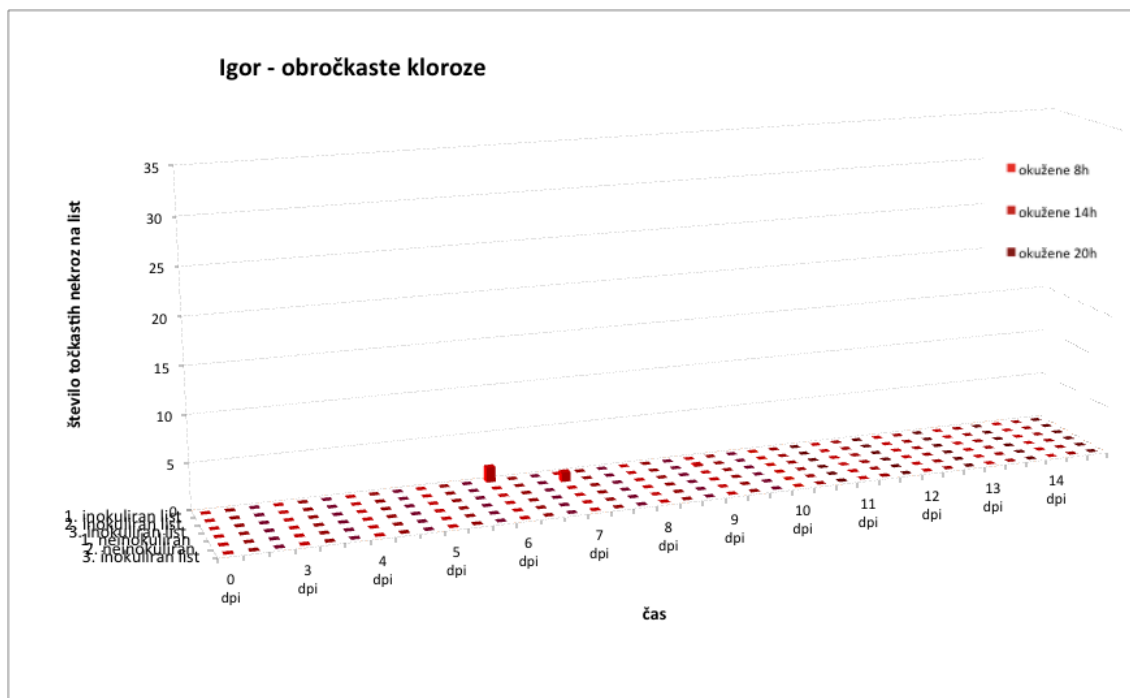
**Slika 19:** Točkaste nekroze in obročkaste kloroze (ob desnem robu na sredini lista) sorte Igor.

Točkaste nekroze so se prvič pojavile 3 dpi na 1. inokuliranem listu rastlin, okuženih ob 14h. Naslednji dan, 4 dpi, so se točkaste nekroze pojavile na rastlinah, okuženih ob 20h. 5 dpi so se pojavile tudi na rastlinah, okuženih ob 8h. Točkaste nekroze so se pojavljale vse do 14 dpi. Od 4 dpi do 9 dpi se kaže trend, da je bilo na listih rastlin, okuženih ob 20h povprečno več točkastih nekroz kot na listih rastlin, okuženih ob 8h in ob 14h. 10 dpi se je pri rastlinah, okuženih ob 14h pojavilo statistično značilno manj točkastih nekroz kot pri rastlinah, okuženih ob 20h. 13 in 14 dpi se je pri rastlinah, okuženih ob 8h pojavilo statistično značilno več točkastih nekroz kot pri rastlinah, okuženih ob 20h (Priloge D, E in F). Na neinokuliranih listih smo prvič opazili pojavljanje točkastih nekroz 9 dpi. Pojavljale so se do 14 dpi (Slika 20).



Slika 20: Pojavljanje točkastih kloroz na listih sorte Igor.

Pri sorti Igor je bilo obročkastih kloroz številčno manj kot točkastih nekroz. Pojavile so se samo na inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 8h od 6 dpi do 9 dpi (Slika 21).

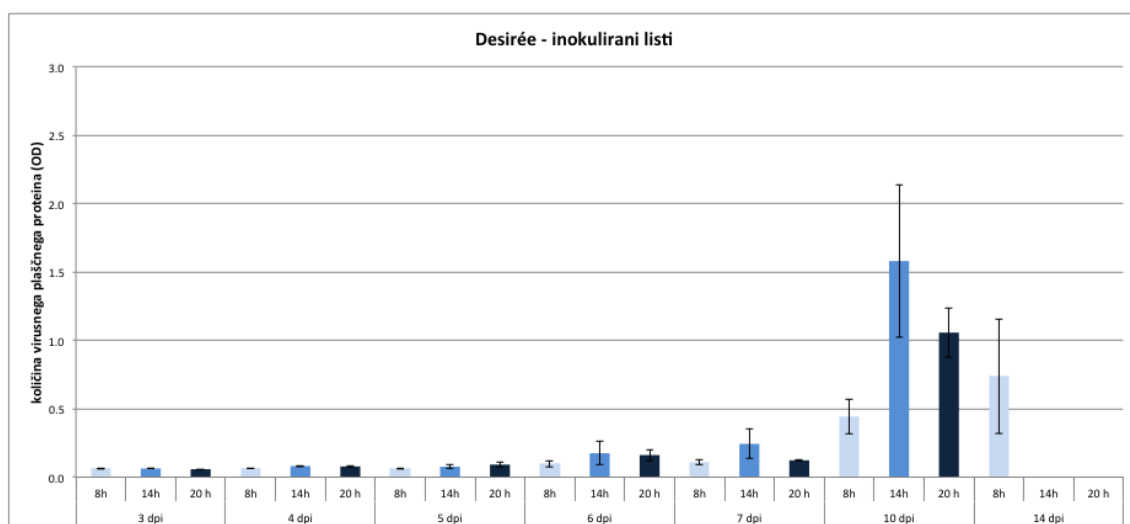


Slika 21: Pojavljanje obročkastih nekroz na listih sorte Igor.

## 4.2 Vpliv časa okužbe na količino virusnih proteinov v rastlini

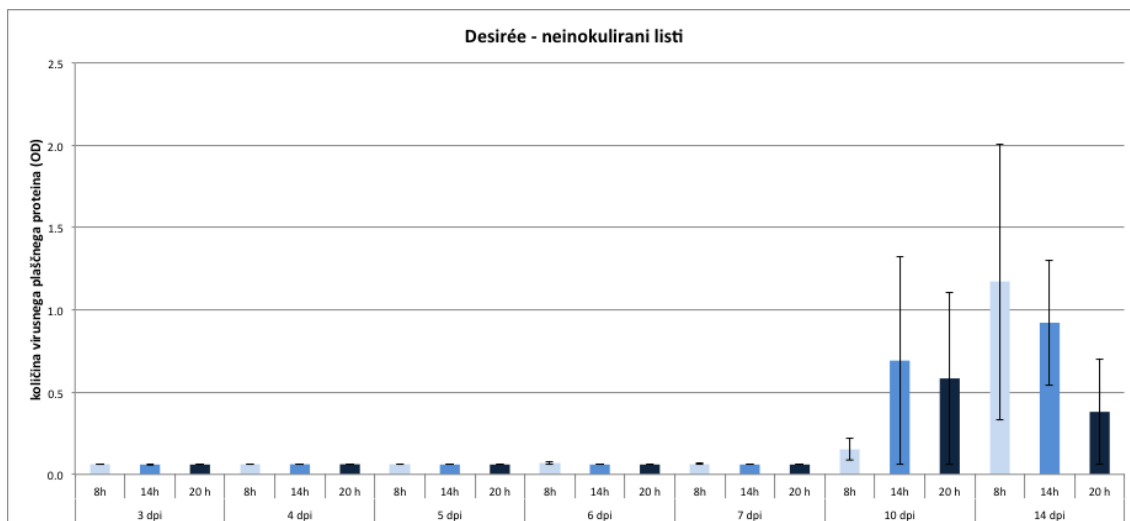
Količino virusnih proteinov v rastlinah sort Désirée in Igor smo analizirali s testom ELISA. Pri sorti Igor s testom ELISA nismo uspeli zaznati virusnih proteinov v nobenem vzorcu, zato so prikazani le rezultati za sorto Désirée.

Pri sorti Désirée smo opazili, da se je v inokuliranih listih virus namnožil nad mejo detekcije 6 dpi v rastlinah, okuženih ob 14h in 20h. Največjo količino virusa v inokuliranih listih smo zasledili 10 dpi. 14 dpi so inokulirani listi iz rastlin, okuženih ob 14h in 20h že odpadli, zato za ta dva tipa listov v tej časovni točki nimamo podatka, v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 8h pa je bilo virusnih proteinov več kot v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 8h 10 dpi. 6 dpi, 7 dpi in 10 dpi smo izmerili največjo količino virusnih proteinov v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 14h, nekoliko manjšo v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 20h in najmanjšo v inokuliranih listih rastlin okuženih ob 8h (Slika 22). Statistično značilnih razlik ni bilo, verjetno zato, ker smo v posamezni časovni točki primerjali le po 3 rastline od vsakega časa okuževanja.



**Slika 22:** Količina virusnega plaščnega proteina v inokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka.

Test ELISA je pokazal, da se je virusni plaščni protein namnožil tudi v zgornjih neinokuliranih listih, na katerih se bolezenska znamenja niso izrazila. V neinokuliranih listih se je virus namnožil nad mejo detekcije 10 dpi. Podobno kot 6 dpi, 7 dpi in 10 dpi v inokuliranih listih, je bila tudi 10 dpi v neinokuliranih listih količina virusnega proteina največja pri rastlinah, okuženih ob 14h, nekoliko manjša pri rastlinah okuženih ob 20h in najmanjša pri rastlinah okuženih ob 8h. Zanimivo, pa je 14 dpi količina virusnih proteinov v rastlinah okuženih ob 8h presegla količino virusnih proteinov v rastlinah okuženih ob 14h in 20h (Slika 23). Statističnih razlik ni bilo, saj smo v posamezni časovni točki primerjali le po 3 rastline od vsakega časa okuževanja.

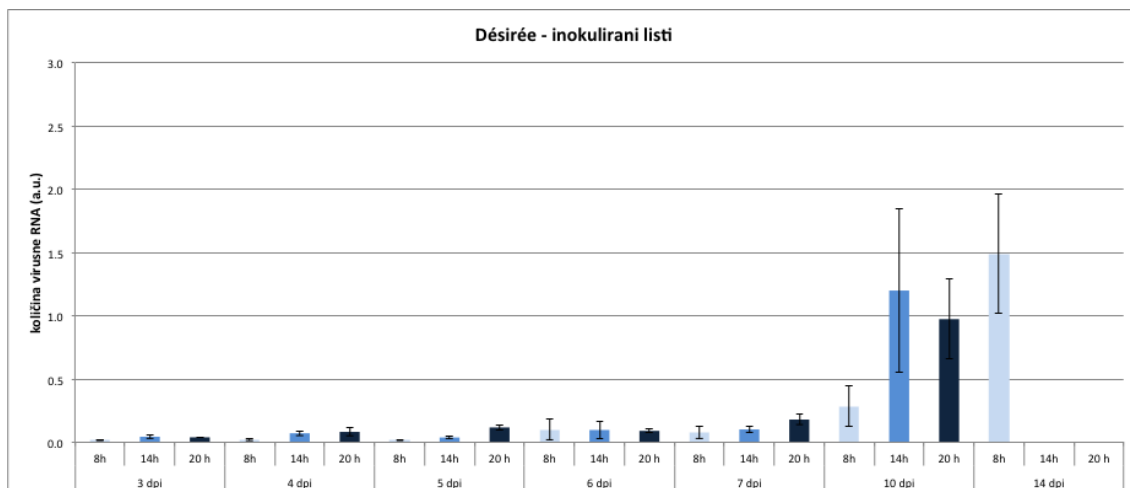


**Slika 23:** Količina virusnega plaščnega proteina v neinokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka.

### 4.3 Vpliv časa okužbe na količino virusne RNA v rastlini

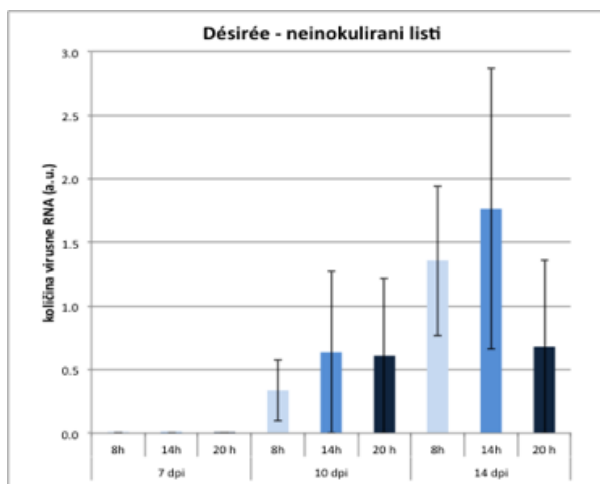
Količino virusne RNA v rastlinah sort Désirée in Igor smo analizirali s qPCR. Pri sorti Désirée smo virusno RNA zaznali v inokuliranih in neinokuliranih listih, pri sorti Igor pa samo v inokuliranih listih.

Pri sorti Désirée smo 3, 5 in 7 dpi največjo količino virusne RNA izmerili v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 20h, nekoliko manjšo v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 14h in najmanjšo v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 8h. 3 dpi in 5 dpi je bila količina virusne RNA v rastlinah, okuženih ob 20h in ob 8h tudi statistično značilno različna (Priloga G). 10 dpi smo največ virusne RNA zaznali v rastlinah, ki so bile okužene ob 14h. 14 dpi pa smo količino virusne RNA lahko izmerili le v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 8h, ker so inokulirani listi rastlin, okuženih ob 14h in 20h že odpadli. Statistično značilnih razlik ni bilo (Slika 24).



**Slika 24:** Količina virusne RNA v inokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka.

Pri sorti Désirée smo virusno RNA v neinokuliranih listih zaznali 10 dpi. 10 dpi je bil v neinokuliranih listih popolnoma enak vzorec količine virusne RNA kot v inokuliranih listih ob istem času - največ virusne RNA je bilo v listih rastlin, okuženih ob 14h, nekoliko manj v listih rastlin, okuženih ob 20h in najmanj v listih rastlin, okuženih ob 8h. 14 dpi je bilo največ virusne RNA v rastlinah, okuženih ob 14h, nekoliko manj v rastlinah, okuženih ob 8h in najmanj v rastlinah, okuženih ob 20h. Od 10 dpi do 14 dpi se je količina virusne RNA v neinokuliranih listih rastlin, okuženih ob 8h in 14h močno povečala medtem ko se je količina virusne RNA v neinokuliranih listih rastlin, okuženih ob 20h povečala minimalno. Trendi kažejo, da je bila največja količina virusne RNA v rastlinah okuženih ob 14h (Slika 25).

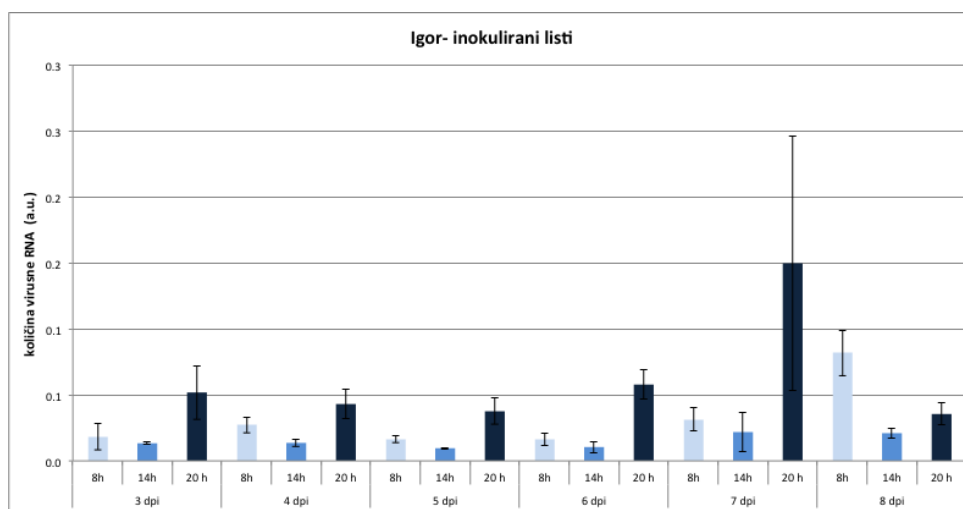


**Slika 25:** Količina virusne RNA v neinokuliranih listih sorte Désirée okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka.

V inokuliranih listih krompirja sorte Igor smo virusno RNA zaznali 3 dpi v rastlinah, okuženih ob 20h in v majhnih količinah tudi v rastlinah, okuženih ob 8h in 14h. Od 3 dpi do 7 dpi smo vsak dan izmerili največjo količino virusne RNA v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 20h, manjšo količino v listih rastlin okuženih ob 8h in najmanjšo v listih rastlin, okuženih ob 14h. 6 dpi je bila razlika v količini virusne RNA v rastlinah, okuženih ob 20h in ob 8h ter v rastlinah okuženih ob 20h in ob 14h statistično značilno različna (Priloga H). Največ virusne RNA smo zaznali 7 dpi v rastlinah, ki so bile



okužene ob 20h. 14 dpi je bila količina virusne RNA največja v rastlinah, okuženih ob 8h (Slika 26).



**Slika 26:** Količina virusne RNA v inokuliranih listih sorte Igor okuženih ob različnih urah (8h, 14h in 20h) po različnih časih po okužbi (dpi). Prikazani sta povprečna vrednost in standardna napaka.

#### 4.4 Vpliv časa okužbe rastlin krompirja s PVY na potek bolezni

Pri sorti Désirée smo opazili podoben vzorec izražanja bolezenskih znamenj, količine virusnega plaščnega proteina in količine virusne RNA v inokuliranih listih rastlin. Virus plaščnega proteina in virusno RNA smo zaznali že 6 dpi na inokuliranih listih rastlin okuženih ob 14h in 20h. ELISA test in qPCR sta občutljivi metodi, ki zaznata že majhne količine virusa, za pojavljanje bolezenskih znakov pa se mora v listu namnožiti večja količina virusa, da opazimo znake okužbe. Pojavljanje bolezenskih znakov na inokuliranih listih je bilo najbolj izrazito 10 dpi na rastlinah, okuženih ob 14h in 20h. Tudi količina virusne RNA in virusnega plaščnega proteina je bila največja 10 dpi ob 14h in 20h.

Na neinokuliranih listih rastlin sorte Désirée nismo opazili znakov okužb, medtem ko sta metodi ELISA in qPCR pokazali prisotnost virusa. Obe metodi sta pokazali, da se je virus razširil v zgornje liste 10 dpi, vendar ga je bilo količinsko več v rastlinah, okuženih ob 14 in 20h. 14 dpi je test ELISA pokazal več virusnega plaščnega proteina v rastlinah, okuženih ob 8h kot v drugih delih dneva. qPCR je 14 dpi pokazal več virusne RNA v rastlinah, okuženih ob 14h. Količina virusne RNA v okuženih rastlinah ob 8h se je 14 dpi močno povečala.

Pri sorti Igor lahko primerjamo le rezultate opazovanj rastlin in qPCR, saj smo pri testu ELISA dobili negativne rezultate. Rastline so po okužbi inokuliranih listov z virusom PVY<sup>NTN</sup> pokazale prve znake okužbe 3dpi na rastlinah, ki so bile okužene ob 14h, medtem ko je metoda qPCR zaznala večjo količino virusne RNA 3dpi v rastlinah, okuženih ob 20h. Količina virusne RNA je bila največja 7 dpi v rastlinah, okuženih ob 20h, prav tako se je takrat pojavilo največ bolezenskih znamenj. Količina virusne RNA je bolj izrazita pri rastlinah, okuženih ob 20h zvečer kot pri rastlinah, okuženih ob 8h zjutraj in 14h popoldne.

Transkripcijske povratne zanke igrajo ključno vlogo ure rastlin na molekularni ravni (Wijnen in Young W., 2006). Povratna zanka je sestavljena iz pozitivne in negativne povratne zanke (Barak, 2000). Študije so pokazale pomembno vlogo cirkadianega ritma v obrambi pred patogeni. Ugotovljeno je bilo, da so promotorji genov, potrebni za PTI in ETI obogateni z večernimi elementi, ki jih regulira ura. Rastline so bolj dovzetne za patogene, ko so okužene ob mraku kot ob zori, kar kaže vlogo ure gena CCA1 za povečano odpornost ob zori (Hua, 2013). Tudi študije navadnega repnjaka z oomicetami *Hyaloperonospora arabidopsidis* so pokazale, da je obrambni odziv rastline močno odvisen od cirkadianega ritma. Obrambni geni, ki jih kontrolira cirkadiani gen CCA1, omogočajo rastlinam, da »predvidijo« okužbo ob zori, ko povzročitelj ponavadi razprši spore in merijo imunski odziv glede na zaznavo različnih patogenih signalov po okužbi (Wang, 2011). CCA1 je bil dokazan, da deluje kot pozitivni povezovalac med uro in obrambnim odzivom zoper oomicetami (Bhardwaj, 2011).

Te ugotovitve se pri sorti Désirée deloma ujema. Rastline so po okužbi inokuliranih listov z virusom PVY<sup>NTN</sup> pokazale prve znake okužbe na rastlinah, ki so bile okužene ob 14h popoldne. Kasneje so se pojavile obročkaste kloroze na rastlinah, okuženih ob 20h zvečer. Pojavljanja obročkastih nekroz nismo zasledili na rastlinah, okuženih ob 8h zjutraj, kar kaže na to, da so rastline bolj dovzetne ob večernih urah. Točkaste nekroze pa so se pojavile ob 8h zjutraj po 14 dpi, kar je 6 dni kasneje, kot so se pojavili prvi znaki okužbe.

Pri sorti Igor so se prav tako prvi znaki okužbe (točkaste nekroze) pojavili na rastlinah, okuženih ob 14h, dan kasneje so se pojavili na rastlinah, okuženih ob 20h zvečer. Bolezenski znaki na rastlinah, okuženih ob 8h zjutraj so se pojavile po 5 dpi, kar je 2 dni kasneje kot so se pojavili prvi znaki okužbe. Ponovno vidimo, da so rastline bolj odporne ob zori kot kasneje čez dan.

## 5 ZAKLJUČKI

Opazovanje odgovora rastlin v različnih dnevih je pokazalo, da se sorti Désirée in Igor različno odzivata na okužbo s PVY<sup>NTN</sup>. Sorta Igor je pokazala bolezenska znamenjavoliko prej in znaki so bili bolj izraziti kot pri sorti Désirée. Pri sorti Igor so se močnejše pojavljale točkaste nekroze, obročkastih kloroz je bilo malo. Pri sorti Désirée so se bolj pogosto pojavljale obročkaste kloroze, točkastih nekroz pa je bilo malo.

Opazili smo različen odziv rastlin sorte Désirée in Igor na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> ob različnih časih čez dan. Pri okužbi v različnih delih dneva so bila v nekaterih časih po okužbi bolezenska znamenja različno izražena oziroma so se začela izražati v različnem času po okužbi.

Opazovanje odgovora rastlin v različnih delih dneva je pokazalo, da se v splošnem tako pri sorti Désirée kot tudi pri sorti Igor po okužbi s PVY<sup>NTN</sup> bolezenska znamenja na inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 14h v prvem dnevu pojava določenega bolezenskega znamenja pojavijo močnejše kot pri rastlinah, okuženih ob 20h. Izjema je bilo povprečno število točkastih nekroz na list pri sorti Igor, ki je bilo pri rastlinah okuženih ob 20h večje kot pri rastlinah, okuženih ob 14h. V prvih dneh pojava določenega bolezenskega znamenja so bila bolezenska znamenja najmanj pogosta na listih rastlin, okuženih ob 8h.

Opazili smo tudi vpliv dela dneva okuževanja na količino virusnih proteinov in virusne RNA v listih rastlin. V rastlinah sorte Désirée smo s testom ELISA zaznali virusni plaščni protein v inokuliranih listih prej, kot smo opazili bolezenska znamenja. Količina virusnega plaščnega proteina in virusne RNA je bila največja v rastlinah, ki so bile okužene ob 14h in nekoliko nižja pri rastlinah, okuženih ob 20h. Pri rastlinah, okuženih ob 8h je bila količina virusne RNA in virusnih proteinov bistveno nižja, razen 14 dpi, ko je bila celo višja kot pri rastlinah, okuženih ob 14h in ob 20h. Na neinokuliranih listih sorte Désirée bolezenskih znamenj nismo opazili, vendar smo zaznali virusni plaščni protein in virusno RNA od 10 dpi dalje.

V rastlinah sorte Igor smo virusno RNA zaznali samo v inokuliranih listih, v neinokuliranih listih virusne RNA nismo zaznali. Največjo količino virusne RNA smo zaznali v inokuliranih listih rastlin, okuženih ob 20h, manjšo količino v listih rastlin, okuženih ob 8h in najmanjšo v listih rastlin, okuženih ob 14h.

V splošnem lahko zaključimo, da okužba s PVY<sup>NTN</sup> rastlin krompirja sort Igor in Désirée ob 14h in ob 20h v začetnih dnevih po okužbi povzroči pojavljanje bolezenskih znamenj na večjem deležu listov kot okužba ob 8h. V kasnejšem poteku bolezni se deleži listov z bolezenskimi znamenji pri rastlinah, okuženih ob 8h, 14h in 20h izenačijo, 14 dpi pa so lahko celo večji pri rastlinah, okuženih ob 8h. Zelo podobno velja tudi za količino virusne RNA in virusnih proteinov v listih rastlin.

## 6 VIRI

ADGEN Protocol 2. TAS-ELISA protocol

Dostopno na: <http://www.agrifoodtest.nl/files/media/TAS%20elisa%20protocol.pdf> 20. 6. 2013

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

Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. R.H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2, 5: 209–219

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

Barak S., Tobin E. M., Andronis C., Sugano S., Green R. M. 2000. All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends in plant science*, 12, 5: 517–522

Barret S. C. H. 1995. Cvetnice, kritosemenke sveta. Ljubljana, DZS

Bhardwaj V., Meier S., Petersen L. N., Ingle R. A., Roden L. C. 2011. Defence Responses of *Arabidopsis thaliana* to Infection by *Pseudomonas syringae* Are Regulated by the Circadian Clock. *PLoS ONE*, 10, 6: 1–8

Bo-Ra K., Hee-Young N., Soo-Un K., Su-Il K., Yung-Jin C. 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, 25, 21: 1869–1872

Bustin S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 2: 169–193

Bustin S. A. 2005. Real-Time PCR. V: Encyclopedia of Diagnostic, Genomics and Proteomics. Fuchs J. (ur.), Poddam M. (ur.). New York/US, Taylor & Francis Inc, 1117–1125

Chandra-Shekara A. C., Gupte M., Navarre D., Raina S., Raina R., Klessig D., Kachroo P. 2006. Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against Turnip Crinkle Virus in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 3, 45: 320–334

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

De Bokx J. A., Huttinga, H. 1981. Potato virus Y Descriptions of Plant Viruses, 242 Dostopno na: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242> 1.7.2013

Detection methods. 2012. V: Real.time PCR handbook. Life technologies™

Dijkstra J., De Jager C. P. 1998. Practical Plant Virology-Protocols and Exercises. Germany, Springer -Verlag Berlin Heidelberg: 348–359

Dougherty W. G., Carrington, J. C. 1988. Expression and Function of Potyviral Gene Products. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 123–143

Experimental Design. 2012. V: Real.time PCR handbook. Life technologies™

Garibyan L., Avashia N. 2013. Polymerse Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 1–3

Hinrichs-Berger J., Harfold M., Berger S., Buchenauer H. 1999. Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55:143–150

Hoffmann F. 2007. PCR: an outstanding method. V: *Genes and Health*, Roche, 3: 65–81

Hotta T. C., Gardner M. J., Hubbard E.K., Jin Baek S., Dalchau N., Suhita S., Dodd N. A., Webb A. A. R. 2007. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant, Cell and Environment*. 3, 30:333–349

Hotz-Vitaterna M., Takahashi J. S., Turek F. W. 2001. Overview of Circadian Rhythms. *Alcohol Research and Health*, 2, 25: 85–93

Hu X., Meacham T., Ewing L., Gray S. M., Karasev A. V. 2009. A novel recombinant strain of Potato virus Y suggests a new viral genetic determination of vein necrosis in tobacco, 143: 68–76

Hua J. 2013. Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 16: 406–413

Jaai K., Jutæk L., Changsoo L. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Elsevier*, In Press

Jones R. A. C., Charkowski A., Fribourg C. E., Stevenson W. R., Slack, S. A. 2009. Potato Virus and Virus-like Diseases. V: *Virus Diseases of Plants: Grape, Potato, and Wheat Image Collection and Teaching Resource CD-Rom*. APS Press, St. Paul, 55121: 19–22

Karasev A. V., Gray S. M. 2013. Continuous and Emerging challenges of Potato virus Y in Potato. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 571–586

Kerlan C. 2006. Potato virus Y- Descriptions of Plant viruses. *Association of Applied Biologists*, 414. Dostopno na: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>. 18.8.2013

Kerlan C., 2008. Potato Viruses. V: *Encyclopedia of Virology*, Mahy B.W.J.(ur.), Van Regenmortel M.H.V. (ur.), 3, 5: 296–309

Kerlan C., Moury B. 2008. Potato Virus Y. *Encyclopedia of Virology*, Mahy B.W.J (ur.), Van Regenmortel M.H.V. (ur.), 3, 5: 287–296

Kocjan Ačko. D., Goljat A., 2005. Krompir. Ljubljana, Kmečki glas

Kondo T., Ishiura M. 1999. The circadian clock of plants and cyanobacteria. *Trends in plant science reviews*, 5, 4: 171–176

Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 2-3: 95–125

Kus M. 1966. Virusi v krompirjevih nasadih: Raziskave o možnosti pridelovanja osnovnega semenskega krompirja (elite) v Sloveniji in v Gorskem kotarju. Ljubljana. Tiskarna "Slovenija" – Ljubljana

Li W., Hartung J. S., Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 1, 66: 104–115

Loebenstein G., 2008. Plant Virus Diseases: Economic Aspects. V: *Encyclopedia of Virology*, Mahy B.W.J.(ur.), Van Regenmortel M.H.V.(ur.), 3, 5: 197–201

Loebenstein G., Gaba V. 2012. Viruses of Potato. V: *Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin*, Lecoq H. (ur.), 1, 84: 210–235

Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 6, 30: 1292–1305

Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Novak Pompe M., Baebler Š., Stres Krečič H., Gruden K., Ravnkar M. 2004. Spread of potato virus Y<sup>NTN</sup> in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 6: 293–300

Nicot N., Hausman J. F., Hoffmann L., Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 421, 56: 2907–2914

Normalization and quantification methods, 2012. V: *Real-time PCR handbook*. Life technologies™

Oana D., Ziegler A., Torrance L., Ghasemi S., Danci M. 2009. Potyviridae Family – short review. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 13: 410–420

Real-time PCR fluorescence detection systems. 2012. V: *Real-time PCR handbook*. Life technologies™

Robertson F. C., Skeffington A. W., Gardner M. J., Webb A. A. 2009. Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Molecular Biology*, 4, 96: 419–427

Robertson McClung C., Salomé P. A., Michael T. P. 2002. The Arabidopsis Circadian System. *American Society of Plant Biologists*,

Roden L. C., Ingle R. A. 2009. Lights, Rhythms, Infection: The Role of Light and the Circadian Clock in Determining the Outcome of Plant-Pathogen Interactions. *The Plant Cell*, 9, 21: 2546–2552

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

Šutić D. D., Ford R. E., Tošić M. T. 1999. Handbook of plant virus diseases. ZDA, CRC Press LLC

Talbot, N. J. 2004. Plant-Pathogen Interaction. *Annual Plant Review*, 11: 68–85

Valasek M. A., Repa J. J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151–159

Wang W., Barnaby Yang J., Tada Y., Li H., Tör M., Calderali D., Lee D., Dong Fu X., Dong X. 2011. Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*, 470: 110–115

Wijnen H., Young M. W. 2006. Interplay of Circadian Clocks and Metabolic Rhythms. *Annual Review of Genetics*, 40: 409

Živković M. 2007. Osnovni principi PCR metode i njena primena u kliničkoj praksi. *Medicinski Časopis*, 2, 42: 32–37

## Priloga A

Statistično značilna razlika v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami, okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> ob 8h in rastlinami, okuženimi ob 14h pri sorti Désirée

	Listi brez bolezenskih znamenj	Listi z obročkastimi klorozami	Listi s točkastimi nekrozami	Rumenenje listov	Sušenje listnih konic	Odpadli listi
0 dpi						
3 dpi						
4 dpi						
5 dpi						
6 dpi	*			*		
7 dpi						
10 dpi						
14 dpi	*			**		***

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001



## Priloga B

Statistično značilna razlika v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami, okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> ob 8h in rastlinami, okuženimi ob 20h pri sorti Désirée

	Listi brez bolezenskih znamenj	Listi z obročkastimi klorozami	Listi s točkastimi nekrozami	Rumenenje listov	Sušenje listnih konic	Odpadli listi
0 dpi						
3 dpi						
4 dpi						
5 dpi						
6 dpi						
7 dpi						
10 dpi						
14 dpi						*

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

### Priloga C

Statistično značilna razlika v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami, okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> ob 14h in rastlinami, okuženimi ob 20h pri sorti Désirée

	Listi brez bolezenskih znamenj	Listi z obročkastimi klorozami	Listi s točkastimi nekrozami	Rumenenje listov	Sušenje listnih konic	Odpadli listi
0 dpi						
3 dpi						
4 dpi						
5 dpi						
6 dpi						
7 dpi						
10 dpi						
14 dpi						

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

## Priloga D

Statistično značilna razlika v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami, okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> ob 8h in rastlinami, okuženimi ob 14h pri sorti Igor

	Listi brez bolezenskih znamenj	Listi z obročkastimi klorozami	Listi s točkastimi nekrozami	Rumenenje listov	Sušenje listnih konic	Odpadli listi
0 dpi						
3 dpi						
4 dpi						
5 dpi						
6 dpi						
7 dpi						
8 dpi						
9 dpi						
10 dpi					*	
11 dpi						
12 dpi					*	
13 dpi						
14 dpi						

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

## Priloga E

Statistično značilna razlika v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami, okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> ob 8h in rastlinami, okuženimi ob 20h pri sorti Igor

	Listi brez bolezenskih znamenj	Listi z obročkastimi klorozami	Listi s točkastimi nekrozami	Rumenenje listov	Sušenje listnih konic	Odpadli listi
0 dpi						
3 dpi						
4 dpi						
5 dpi						
6 dpi						
7 dpi						
8 dpi						
9 dpi						
10 dpi					*	
11 dpi						
12 dpi						
13 dpi			*			
14 dpi			*			*

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

## Priloga F

Statistično značilna razlika v deležu listov s posameznim bolezenskim znamenjem med rastlinami, okuženimi s PVY<sup>NTN</sup> ob 14h in rastlinami, okuženimi ob 20h pri sorti Igor

	Listi brez bolezenskih znamenj	Listi z obročkastimi klorozami	Listi s točkastimi nekrozami	Rumenenje listov	Sušenje listnih konic	Odpadli listi
0 dpi						
3 dpi						
4 dpi						
5 dpi						
6 dpi						
7 dpi						
8 dpi						
9 dpi						
10 dpi			*			
11 dpi					*	
12 dpi						
13 dpi						
14 dpi						*

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

## Priloga G

Statistično značilna razlika količine RNA med rastlinami okuženimi ob 8h in 14h, 14h in 20h ter 8h in 20h pri sorti Désirée

	8h - 14h	14h - 20h	8h - 20h
3 dpi			*
4 dpi			
5 dpi			*
6 dpi			
7 dpi			
10 dpi			
14 dpi			

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## Priloga H

Statistično značilna razlika količine RNA med rastlinami okuženimi ob 8h in 14h, 14h in 20h ter 8h in 20h pri sorti Igor

t-test	8h - 14h	14h - 20h	8h - 20h
3 dpi			
4 dpi			
5 dpi			
6 dpi		*	*
7 dpi			
8 dpi			

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$