

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
MEDODDELČNI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jasmina KENDA

**VPLIV SALICILATOV NA OKUŽBO KROMPIRJA S
KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
MEDODDELČNI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jasmina KENDA (MIHELČIČ)

**VPLIV SALICILATOV NA OKUŽBO KROMPIRJA S
KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF SALICYLATE ON THE INFECTION OF POTATO
WITH POTATO VIRUS Y**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana.

Študijska komisija za študij biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Ravnikar.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Maja Ravnikar
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in
sistemsko biologijo

Članica: doc. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
biologijo

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jasmina Kenda

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	581.2:582.951(043.2)=163.6
KG	krompirjev virus Y ^{NTN} /širjenje virusa/salicilna kislina/INA
AV	KENDA, Jasmina
SA	RAVNIKAR, Maja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana,
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI	2009
IN	Vpliv salicilatov na okužbo krompirja s krompirjevim virusom Y
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 54 str., 10 pregl., 18 sl., 3 pril., 63 vir.
IJ	Sl
JJ	sl / en
AI	Z virusom PVY ^{NTN} smo okužili rastline krompirja sorte Igor ter transformante krompirja sorte Dèsirèe, ki niso sposobne akumulirati salicilne kisline. Dan pred okuževanjem smo rastline tretirali z 0,3 mM in 1 mM izonikotinsko kislino (INA), ki je analog salicilne kisline. Kot kontrolo smo uporabili neokužene in netretirane rastline. Spremljali smo pojavljanje bolezenskih znamenj ter količino virusa v rastlini z molekularno metodo PCR v realnem času (Q-PCR). Pri sorti Igor so se bolezenska znamenja prej in v bolj intenzivni obliki pojavili pri rastlinah tretiranih z INA. Medtem ko so se pri transformantah sorte Dèsirèe pojavila prej pri netretiranih rastlinah. Z metodo Q-PCR smo ugotovili, da je količina virusa v zgornjih neinokuliranih listih NahG-D2 transformant sorte Dèsirèe pobranih 14 dan po okuževanju (dpo) večja pri netretiranih kot pa pri rastlinah tretiranih z INA. To je lahko posledica vpliva INA na širjenje ali pa na razmnoževanje virusa v zgornjih neinokuliranih listih. Tudi v zgornjih neinokuliranih listih rastlin sorte Igor pobranih 14 dpo smo zaznali malo več virusa v netretiranih rastlinah. Med dobljenimi rezultati z metodo Q-PCR je bila velika heterogenost med rastlinami. Okužba krompirja z PVY ^{NTN} je v večini primerov vplivala na zmanjšanje števila in mase gomoljev ter koreninskega sistema pri obeh sortah rastlin. Pri neokuženih rastlinah je INA vplivala na zmanjšanje mase koreninskega sistema. Okužene transformante sorte Dèsirèe, ki smo jih tretirali z INA so imele večjo število gomoljev kot netretirane okužene rastline. Okužene tretirane rastline sorte Igor pa so imele večjo povprečno in skupno maso gomoljev kot netretirane.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 581.2:582.951(043.2)=163.6
CX Potato virus Y^{NTN}/ spread of viruses/salicylic acid/INA
AU KENDA, Jasmina
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana,
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty
PY 2009
TI The effect of salicylate on the infection of potato with potato virus Y
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 54 p., 10 tab., 18 fig., 3 ann., 63 ref.
LA Sl
AL sl / en
AB In our experiment we use two potato cultivars: cv. Igor and genetic transformed cv. Désirée, which is not able to accumulate the salicylic acid. Cultivars were inoculated with *Potato virus Y^{NTN}* (PVY^{NTN}). The day before inoculation we spread the plants with 0,3 mM and 1 mM isonicotinic acid (INA), which is the analog of salicylic acid. We use untreated and uninfected plants for controls. We were observing spreading of the symptoms and with a molecular method real – time PCR (Q-PCR) we measured the quantity of the virus PVY^{NTN}. Local symptoms appeared earlier and in more intensive form on inoculated leaves of cv. Igor treated with INA. While on genetic transformed cv. Désirée, local symptoms developed earlier on untreated leaves. In the genetic transformed cv. Désirée, the amount of the virus was higher in upper leaves of treated than in untreated plants 14 days after the inoculation. This could mean that INA reduced spreading of the virus in upper noninoculated leaves, or maybe INA reduced replication of the virus. In upper noninoculated leaves of cv. Igor we also detected more virus in untreated than in treated plants. The results of Q-PCR were very different between the plants. The infection in most cases reduced the number and weight of the tuber. It also had an effect on the rootstock of both cultivars. Inoculated genetic transformed cv. Désirée which were treated with INA did have more tubers in comparison to untreated inoculated plants. However inoculated and with INA treated cv. Igor did have higher weight of the tuber.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO TABEL.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XIII
1. UVOD.....	1
2. PREGLED OBJAV	2
2.1. KROMPIRJEV VIRUS Y	2
2.2. ŠIRJENJE VIRUSA PO RASTLINI	3
2.3. OBRAMBA RASTLIN PRED PATOGENIMI MIKROORGANIZMI	4
2.3.1. Odpornost rastlin na viruse.....	8
2.4. SALICILNA KISLINA	10
2.4.1. Biosinteza in metabolizem salicilne kisline	10
2.4.2. Vpletenost salicilne kisline v obrambo rastlin pred patogenimi mikroorganizmi	12
2.4.3. Salicilna kislina in odpornost na viruse.....	15
2.4.4. Vloga salicilne kisline v obrambi pred patogenimi mikroorganizmi v krompirju	15
2.5. MERJENJE KOLIČINE VIRUSA V RASTLINAH.....	16
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1. RASTLINSKI MATERIAL	19
3.1.1. Uporabljeni rastlinski material	19
3.1.2. Priprava rastlinskega materiala.....	19
3.1.3. Tretiranje rastlina z 2,6 – dikloro izo nikotinsko kislino (INA).....	19
3.1.4. Mehanska inokulacija rastlin.....	19
3.1.5. Pobiranje rastlinskega materiala.....	20
3.2. PRIPRAVA RNK	20
3.2.1. Izolacija RNK.....	20
3.2.2. Razgradnja genomske DNK	21
3.3. Q - PCR V DVEH KORAKIH	21
3.3.1. Reverzna transkripcija	21
3.3.2. Detekcija in relativna kvantifikacija virusa PVY ^{NTN}	22
3.3.2.1. qPCR	22
3.3.3. Analiza podatkov	23
4. REZULTATI	24
4.1. FENOTIPSE LASTNOSTI.....	24
4.1.1. Pojav bolezenskih znamenj	24
4.1.2. Gomolji in koreninskim sistem	31
4.2. RAZMNOŽEVANJE IN ŠIRJENJE VIRUSA PO RASTLINI.....	32
5. RAZPRAVA.....	36
5.1. POJAVLJANJE BOLEZENSKIH ZNAMENJ	36
5.2. GOMOLJI IN KORENINSKI SISTEM	38

5.3. KOLIČINA VIRUSA V RASTLINI	39
6. SKLEPI.....	42
7. LITERATURA	43
ZAHVALA	48
PRILOGE	49

KAZALO TABEL

Tabela 1: Funkcije različnih proteinov Potyvirusov (povzeto po Urcuqui-Inchima in sod., 2001).....	2
Tabela 2: Priprava reakcijske mešanice za razgradnjo DNA z uporabo encima DNaza I. .	21
Tabela 3: Priprava reakcijske mešanice za sintezo cDNA z uporabo kita High Capacity cDNA Reverse Transcription Kita.	22
Tabela 4: Priprava reakcijskih mešanic za pomnoževanje CP-NTN in COX cDNA pri qPCR.....	22
Tabela 5: Pojavljanje bolezenskih znamenj pri okuženih rastlinah krompirja sorte Igor. INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, INA ⁻ - netretirana rastlina, r1-r5 – rastlina krompirja, 1s-3s - spodnji z virusom inokulirani listi, dpo - dan po okuževanju z virusom, L – lokalno bolezensko znamenje, S1 – šibko sistemsko bolezensko znamenje, S – močnejše sistemsko bolezensko znamenje, P – inokulirani pobrani list.	28
Tabela 6: Pojavljanje bolezenskih znamenj pri okuženih NahG-D2 transformantah krompirja sorte Désirée. INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, INA ⁻ - netretirana rastlina, r1-r5 – rastlina krompirja, 1s-3s - spodnji z virusom inokulirani listi, dpo - dan po okuževanju z virusom, L – lokalno bolezensko znamenje, S1 – šibko sistemsko bolezensko znamenje, S – močnejše sistemsko bolezensko znamenje, P – inokulirani pobrani list.....	29
Tabela 7: Pojavljanje bolezenskih znamenj pri okuženih NahG-A transformantah krompirja sorte Désirée. INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, INA ⁻ - netretirana rastlina, r1-r5 – rastlina krompirja, 1s-3s - spodnji z virusom inokulirani listi, dpo - dan po okuževanju z virusom, L – lokalno bolezensko znamenje, S1 – šibko sistemsko bolezensko znamenje, S – močnejše sistemsko bolezensko znamenje, P – inokulirani pobrani list.....	30
Tabela 8: Število gomoljev in masa korenin rastlin sorte Igor 60 dpo. Prikazani so rezultati slepo okuženih rastlin (kontrola) in rastlin okuženih s PVY ^{NTN} . Rezultati predstavljajo povprečje (\pm SD) analiz 5 rastlin. Signifikantnost ($p < 0,05$) med pari rastlin je označena z črkami: a – neokužena vs. okužena, b – neokužena netretirana vs. neokužena tretirana. ...	31
Tabela 9: Število gomoljev in masa korenin rastlin sorte Désirée, transformanta NahG-D2 60 dpo. Prikazani so rezultati slepo okuženih rastlin (kontrola) in rastlin okuženih s PVY ^{NTN} . Rezultati predstavljajo povprečje (\pm SD) analiz 5 rastlin. Signifikantnost ($p < 0,05$) med pari rastlin je označena z črkami: a – neokužena vs. okužena, b – neokužena netretirana vs. neokužena tretirana, c – okužena netretirana vs okužena tretirana, d - okužena tretirana z 0,3 mM INA vs okužena tretirana s 1 mM INA.	31
Tabela 10: Število gomoljev in masa korenin rastlin sorte Désirée, transformanta NahG-A 60 dpo. Prikazani so rezultati slepo okuženih rastlin (kontrola) in rastlin okuženih s PVY ^{NTN} . Rezultati predstavljajo povprečje (\pm SD) analiz 5 rastlin. Signifikantnost ($p < 0,05$) med pari rastlin je označena z črkami: a – neokužena netretirana vs. neokužena tretirana, b – okužena netretirana vs okužena tretirana.....	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema molekularnih dogodkov med patogenezo v rastlini. SA – salicilna kislina, JA – jasmonska kislina, H ₂ O ₂ – vodikov peroksid, PR – s patogenezo povezani geni, SAR – sistemsko pridobljena imunost, ISR – inducirana sistemska rezistenca, PCD – programirana celična smrt, PTGS – posttranslacijsko utišanje genov, AVR – avirulentna determinanta, Pto – R gen (<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato), Ct9 – R gen, etr – etilen vezavni protein (ethylene response), ein – gen signalne poti etilena (ethylen insensitive), EREBP in WRKY – transkripcijski faktor, NOS – dušik oksidna sintetaza, PAL - fenilalanin - amonliaza, Tdc – triptofan dekarboksilaza, Str – striktozidin sintetaza, Gln – glutamin sintetaza, Oip – ozmotin podoben protein, Cpr – konstitutivno izražanje PR genov. Tanke puščice povezujejo neposredno povezane produkte genov v reakciji. Prazne puščice označujejo dogodke, za katere so potrebni dodatni elementi za signalno transdukcijo.	5
Slika 2: Biosintezna pot salicilne kisline. Sivo označen del poti je bil prvotno opisan pri bakterijah, danes pa vemo, da poteka tudi v rastlinskih kloroplastih. ICS – izohorizmat sintetaza. (povzeto po Métrauxy, 2002)	11
Slika 3: Faze PCR amplifikacijske krivulje.....	17
Slika 4: Shematični prikaz pobranih listov. Z S so označeni spodnji inokulirani, z Z pa za zgornji neinokulirani listi.	20
Slika 5: Bolezenska znamenja pri rastlinah krompirja sorte Igor okuženih s PVY ^{NTN} , 8 dpo.	25
Slika 6: Inokulirani listi krompirja sorte Igor okuženega s PVY ^{NTN} . Od leve proti desni: netretirana rastlina 12 dpo, tretirana rastlina z 0,3 mM INA 8 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 6 dpo.	25
Slika 7: Sistemska bolezenska znamenja krompirja sorte Igor okuženega s PVY ^{NTN} , 14 dpo. Od leve proti desni: netretirana rastlina, tretirana rastlina z 0,3 mM INA, tretirana rastlina z 1 mM INA.	25
Slika 8: Bolezenska znamenja pri NahG-D2 transformantah krompirja sorte Désirée okuženih s PVY ^{NTN} , 8 dpo. Od leve proti desni: tretirana z 1 mM INA, tretirana z 0,3 mM INA, netretirana rastlina.	26
Slika 9: Inokulirani listi NahG-D2 transformant krompirja sorte Désirée okuženega s PVY ^{NTN}	26
Slika 10: Sistemska bolezenska znamenja NahG-D2 transformant krompirja sorte Désirée okuženega s PVY ^{NTN} . Od leve proti desni: netretirana rastlina 12 dpo, tretirana rastlina z 0,3 mM INA 14 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 14 dpo.....	26
Slika 11: Bolezenska znamenja pri NahG-A transformantah krompirja sorte Désirée okuženih s PVY ^{NTN} , 8 dpo. Od leve proti desni: tretirana z 1 mM INA, tretirana z 0,3 mM INA, netretirana rastlina.	27
Slika 12: Inokulirani listi NahG-A transformant krompirja sorte Désirée okuženih s PVY ^{NTN} . Od leve proti desni: netretirana rastlina 6 dpo, tretirana rastlina z 0,3 INA 6 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 8 dpo.	27
Slika 13: Sistemska bolezenska znamenja NahG-A transformant krompirja sorte Désirée okuženih s PVY ^{NTN} . Od leve proti desni: netretirana rastlina 12 dpo, tretirana rastlina z 0,3 mM INA 14 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 14 dpo.....	27
Slika 14: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v inokuliranem listu krompirja sorte Igor okuženem s PVY ^{NTN} , 6 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s	

številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo teretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če je bila dobljena vrednost izven meje kvantifikacije.	32
Slika 15: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v inokuliranem listu krompirja sorte Igor okuženem s PVY ^{NTN} , 14 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo teretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če so listi odpadli pred 14 dpo.	33
Slika 16: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v neinokuliranem listu krompirja sorte Igor okuženem s PVY ^{NTN} , 14 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo teretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če je bila dobljena vrednost izven meje kvantifikacije ali pa če virusa sploh nismo zaznali.	34
Slika 17: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v inokuliranem listu NahG-D2 transformante krompirja sorte Désirée okužen s PVY ^{NTN} , 6 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo teretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA.	34
Slika 18: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v neinokuliranem listu NahG-D2 transformante krompirja sorte Désirée okužen s PVY ^{NTN} , 14 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo teretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če je bila dobljena vrednost izven meje kvantifikacije.	35

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Seznam pobranih listov pri z virusom PVY ^{NTN} okuženih rastlinah krompirja sorte Igor ter NahG-D2 in NahG-A transformantah sorte Désirée 6 dan po okuževanju, ko so se pojavili prvi lokalni simptomi. r1-r4 – rastline krompirja, INA ⁻ - netretirane rastline, INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, 1s – prvi spodnji z virusom inokuliran list.	49
Priloga 2: Seznam pobranih listov pri z virusom PVY ^{NTN} okuženih rastlinah krompirja sorte Igor ter NahG-D2 in NahG-A transformantah sorte Désirée 14 dan po okuževanju, ko so se pojavili sistemski simptomi. r1-r4 – rastline krompirja, INA ⁻ - netretirane rastline, INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, 1s - 3s–spodnji z virusom inokuliran list, 1z - 4z – zgornji z virusom neinokulirani listi.....	49
Priloga 3: Grobi podatki Q-PCR. S – spodnji inokuliran list, Z – zgornji neinokuliran list, dpo – dan po okuževanju, 1 - 4 rastlina, 100X – 100 krat redčeno, 1000X – 1000 krat redčeno, Undetermined – nismo zaznali pomnožene tarčne molekule, INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, z modro so označene vrednosti, ki so izven meje kvantifikacije.	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
Avr	avirulentna determinanta
AOX	alternativna oksidaza
BA	benzojska kislina
BA2H	benzojska kislina-2-hidroksilaza
BTH	benzotidiazoli
CA	cimetna kislina
cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
COX	citokrom oksidaza
CP	plaščni protein
CP - NTN	plaščni protein virusa PVY ^{NTN}
Ct	cikel PCR v realnem času, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag (<i>threshold</i>).
DIECA	dietilditiokarbamat
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DNaza	deoksiribonukleaza
dpo	dan po okuževanju
ds	dvoverižna
E	učinkovitost pomnoževanja
ELISA	encimski imunoserološki test (ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FAM	6-karboksifluorescein
HR	hipersenzitivni odgovor
Hsp90	protein toplotnega šoka (ang. Heat shock protein 90)
IL	interlevkin
INA	2,6 – dikloro izonikotinska kislina
ISR	inducirana sistemska rezistenca
JA	jasmonska kislina
LRR	levcin bogate ponovitve
MAP	z mitogenom aktiviran protein
MP	gibalni protein
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina
MS	Murashige in Skoog gojišče
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBS	nukleotid vezavna domena (ang. nucleotide binding site)
NPR1	protein, vključen v obrambno signalizacijo (ang. non-expressor of P1)
ORF	odprt čitalni okvir (ang. open reading frame)
PAL	fenilalanin-amonliaza
PCD	programirana celična smrt (ang. Programmed cell death)
Pep - 13	peptidni elicitor <i>Phytophthora sojae</i> z 13 amino kislinami
PK	proteinska kinaza
PR	s patogenezo povezani proteini
PTGS	posttranskripcijsko utišanje genov
PTNRD	prstanasta (obročkasta) nekroza gomoljev (ang. potato tuber necrotic ring disease)
PVY	krompirjev virus Y

PVX	krompirjev virus X
PCR	verižna reakcija s polimeraza
Q-PCR	verižna reakcija s polimeraza v realnem času (kvantitativni PCR)
PVY ^{NTN}	nekrotični različek NTN krompirjevega virusa Y, ki povzroča nekroze gomoljev
RdRP	od RNA odvisna RNA polimeraza
R -	rezistenten
RLK	receptorjem podobne kinaze (ang. receptor like kinase)
Rn	emisija fluorescence
RNK	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RISC	ribonukleotidni kompleks (ang. RNA-induced silencing complex)
RT	reverzna transkripcija
SA	salicilna kislina
SABP	salicilna kislina vezavni protein (ang. Salicylic acid binding protein)
SAG	salicilna kislina 2-O- β -D-glukozid
SAR	sistemsko pridobljena rezistenca
SD	standardni odklon
SHAM	salicil hidroksaminska kislina
siRNK	mala interferenčna (small interfering) RNK
SIPK	s salicilno kislino inducirana proteinska kinaza (ang. Salicylic acid induced protein kinase)
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin
TF	transkripcijski faktor
TIR	toll/IL-1R domena
TMV	virus mozaika tobaka
WIPK	z ranitvijo inducirana proteinska kinaza (ang. Wounding induce protein kinase)

SLOVARČEK

Lokalno bolezensko znamenje	Poškodba na mestu vstopa virusa v rastlino.
Sistemske bolezenske znamenje	Boleznska znamenja, ki se pojavijo, ko se virus razširi po rastlini.
Analog	Sintetična kemikalija, ki posnema biološko aktivnost neke naravne snovi.
Q - PCR	Molekularna metoda, ki temelji na klasični PCR metodi in omogoča spremljanje nastale pomnožene DNK med samim potekom reakcije ter njeno kvantifikacijo.

1. UVOD

Že več stoletij človek goji kulturne rastline, ki jih napadajo številni patogeni organizmi ter tako manjšajo kvaliteto in kvantiteto pridelka. Rastline so tekom evolucije same razvile različne obrambne mehanizme pred neželenimi napadalci. Človek pa skoraj tako dolgo kot rastline goji tudi bolj ali manj podrobno raziskuje interakcije med rastlinami in patogenimi organizmi ter obenem išče poti kako bi sam zaščitil rastlino pred povzročiteljem bolezni.

Ena izmed najpomembnejših poljščin je še od časa Marije Terezije prav gotovo krompir. Do pojava epidemije bolezni imenovane prstanasta (obročkasta) nekroza gomoljev, je bila sorta Igor v Sloveniji zelo razširjena. Bolezen povzroča nekrotični različek krompirjevega virusa Y (PVY^{NTN}).

Odkritje, da ima rastlinski hormon salicilna kislina v rastlinah zaščitno funkcijo pred patogenimi organizmi, je bilo objavljeno že leta 1979 na tobaku (Raskin, 1992). Že od takrat se raziskuje njen način delovanja. Do danes smo spoznali, da ima salicilna kislina pomembno vlogo pri aktivaciji številnih obrambnih genov, katerih produkti jo branijo pred glivno oz. mikrobno okužbo. Njena vloga pri razvoju rezistence pred virusi pa še ni popolnoma jasna (Murphy in sod., 1999).

Namen diplomskega dela je bil opazovanje pojavljanja in oblik simptomov pri z virusom PVY^{NTN} okuženih rastlinah krompirja sorte Igor in transformant sorte Dèsirèe, ki ne morejo akumulirati salicilne kisline, tretiranih oziroma netretiranih z INA (2,6 – dikloro izonikotinska kislina), analog salicilne kisline. Zanimalo nas je tudi kako se virus razmnožuje in širi po izbranih rastlinah krompirja, kar smo preverili z metodo Q-PCR.

Pričakovali smo, da bodo transformente krompirjeva, ki niso sposobne akumulirati salicilne kisline, manj dovzetne za okužbo z virusom PVY^{NTN}, če jih bomo pred okuževanjem tretirali z INA kot pa netretirane rastline. Manjša občutljivost in dovzetnost na okužbo se lahko pokaže v obliki počasnejšega pojavljanja bolezenskih znamenj in počasnejšega pomnoževanja ter širjenja virusa po rastlinah krompirja.

2. PREGLED OBJAV

2.1. KROMPIRJEV VIRUS Y

Krompirjev virus Y (PVY) spada v rod *Potyvirusov*. *Potyvirusi* predstavljajo največji rod znotraj družine *Potyviridae*. Ti lahko okužijo širok spekter gostiteljev tako enokaličnic kot dvokaličnic v večini klimatskih razmer. *Potyvirusi* so filamentozni, paličaste oblike, 680 – 900 nm dolgi in 11 -15 nm široki. Sestavlja jih enoverižna pozitivno orientirana RNK, 9'7 kb, obdana z približno 200 kopijami plaščnega proteina. Genom vsebuje le eden odprt čitalni okvir (ORF). Ta se prevede v 340 - 370 kDa velik poliprotein, ki se lahko kotranslacijsko in potranslacijsko cepi na intermediate ali na naslednje končne proteinske produkte: P1, HC – Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, N1b, plaščni protein (CP). Vsi naštetih proteini so vpleteni v pomnoževanje genoma ter vsi razen P3, 6K1 in 6K2 se vežejo na RNK. HC-Pro protein se cepi na tri dele: N-terminalni, sredinski in C-terminalni. Funkcije vseh proteinov so predstavljene v tabeli 1 (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

Tabela 1: Funkcije različnih proteinov Potyvirusov (povzeto po Urcuqui-Inchima in sod., 2001)

PROTEIN	FUNKCIJA
P1	proteinaza (cepi poliprotein na C-terminalnem delu), razvoj simptomov
HC-Pro	sodeluje pri prenosu z listnimi ušmi, sistemsko gibanje, supresija utišanja genov, sinergizem in razvoj simptomov, proteinaza (cepi poliprotein na C-terminalnem delu)
P3	pomnoževanje virusa
6K1	?
CI	ATPazna/RNK helikaza, gibanje med celicami
6K2	vezava virusnega replikacijskega kompleksa na membrano
NIa	največja proteinaza (deluje cis in trans), protien-protein interakcije, vpletena v replikacijo genoma, lokalizacija v celici
N1b	RdRP, vpletena v replikacijo genoma
CP	prenos z listnimi ušmi, gibanje virusa med celicami in sistemsko gibanje, regulacija pomnoževanja virusne RNK, enkapsulacija

PVY se predvsem prenašajo z listnimi ušmi, prenašajo pa se tudi preko gomoljev in z dotikom (Kus, 1994).

PVY ima več različkov PVY^N (tobacco veinal necrosis), PVY^O (common) in PVY^C (potato stipple streak). PVY^{NTN} predstavlja skupino znotraj PVY^N. Predvideva se, da je njegov genom rekombinanta (PVY^N in PVY^O). PVY^{NTN} povzroča bolezen krompirja imenovana prstanasta (obročkasta) nekroza gomoljev (PTNRD-potato tuber necrotic ring disease) (Singh in sod., 2008), ki se smatra kot najbolj škodljiva bolezen krompirja v Sloveniji in v Evropi. Prvič je bila ta bolezen omenjena na Madžarskem leta 1979. V Sloveniji je izbruhnila leta 1988 Virus je razširjen po vsej Evropi in na drugih kontinentih. Virus je razširjen med krompirjem in je odgovoren za zmanjšane pridelke (vse do 80%) in zmanjšanje kvalitete gomoljev. Poleg krompirja okuži tudi paradižnik, tobak, por in veliko drugih rastlin (Kus, 1994).

Različne sorte krompirja so različno dovzetne in občutljive na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Sorta Igor spada med bolj občutljive. Okužene rastline že nekaj dni po okužbi dobijo primarna bolezenska znamenja in kasneje tudi sistemska. Sorta Désirée je nekoliko manj občutljiva. Pri njej se pojavijo bolezenska znamenja na nadzemnem delu rastline in na manjšem številu gomoljev (Kus, 1994).

Sorta Pentland Squire spada k tolerantnim rastlinam krompirja. V teh rastlinah se virus lahko razmnožuje, vendar se na rastlini ne pojavijo vidna bolezenska znamenja (Krečič-Stres in sod., 2005). Sorta Sante, ki nosi Ry_{sto} gen iz *Solanum stoloniferum* pa je odporna na PVY^{NTN} in ne kaže nobenih bolezenskih znamenj. Tudi virus se v njej ne razmnožuje (Hinrichs in sod., 1998).

Primarna bolezenska znamenja na okuženih listih krompirja se običajno pojavijo v obliki kloroz in pikam podobnih nekroz. Kasneje se pojavijo sistemska bolezenska znamenja v obliki mozaika, zvijanja listov in obžilnih nekroz na mlajših listih nad okuženimi, medtem ko starejši listi odpadejo. Okužene rastline rastejo počasneje, hitreje rumenijo in lahko prej odmrejo, na gomoljih se pojavijo prstanasti obročki. Rastline, ki zrastejo iz okužnih gomoljev – sekundarno okužene, kažejo mozaično nekaj nekroz na poganjkih in okrog žil in so velikokrat deformirane (Kus, 1994). Bolezenska znamenja so odvisni od genotipa rastline, virusnega izolanta in temperature (LeRomancer in Nedellec, 1997).

2.2. ŠIRJENJE VIRUSA PO RASTLINI

Virusi so obligatni intercelularni patogeni mikrobi. Njihovo razmnoževanje je popolnoma odvisni od faktorjev, ki jih sintetizira gostiteljska rastlinska celica, od njih sta odvisna tudi lokalno in sistemsko širjenje virusa po gostiteljski rastlini (Murphy in sod., 1999).

Rastlinski virusi vstopijo v celico preko poškodbe (mehansko, prenašalci) ali z okuženim pelodom pri opravljanju (Agrios, 2005). Po infekciji, ki se zgodi po mehanski poškodbi celične stene in plazmatske membrane, virus ostane v simplastu. Če je rastlina gostiteljska poteče v celicah celoten infekcijski cikel virusa. Taka celica ne odmre, ampak obdrži veliko količino virusa, medtem ko se okužba razširi na sosednje tkivo. Končno povzroči prvotna okužba in širjenje virusa v občutljivo tkivo, pojavljanje bolezenskih znamenj (Maule in sod., 2002).

Večina poznanih rastlinskih virusov ima genom iz pozitivno orientirane enoverižne RNK (npr. virus PVY^{NTN}) (Murphy in sod., 1999). Replikacija pozitivno orientirane verige poteka v citoplazmi okužene celice. RNK polimeraza je verjetno vezana na membrano tako kot nekateri proteini, ki so vpleteni v pomnoževanje. Po vstopu virusa v celico se najprej loči virusni plašč od nukleinske kisline, ki se nato podvaja. Naslednja stopnje pomnoževanja je translacija, med katero služi virusna RNK kot sporočevalna RNK. Nastanejo strukturni in nestrukturni proteini. Sledi podvajanje genoma. To reakcijo katalizira od RNK odvisni RNK polimerazni (RdRp) kompleks. Najprej se sintetizira komplementarna negativno orientirana RNK, ki nato služi kot matrica za sintezo pozitivno orientirane RNK. Po končani sintezi podvojene genomske RNK sledi še enkapsulacija (Bustamante in Hull, 1998).

Ko virus vstopi v gostiteljsko celico, se razširi iz inokulirane celice po celotni rastlini. Poznamo dve fazi virusnega gibanja na daljavo. Počasno gibanje od celice do celice preko plazmodezem v inokuliranih listih in hitrejše gibanje na daljše razdalje iz lista v list preko vaskularnega sistema običajno prek floema. Oba procesa gibanja izkoriščata obstoječi rastlinski transport in komunikacijske poti ter domnevno uporabita tudi faktorje gostitelja (Murphy in sod., 1999).

Kot kaže so faktorji, ki so povezani z pomnoževanjem virusa, bolj odvisni od gostiteljskih (house-keeping) funkcij rastlinskih celic kot tisti, ki so povezani z gibanjem. Da se lahko infekcija razširi na sosednje celice, mora virus spremeniti normalen transport preko plazmodezm. To naredi s pomočjo virusnih gibalnih proteinov (MP-movement protein). Različni virusi imajo raznolike načine, s katerimi deregulirajo komunikacije med celicami. Za pričakovati je, da ima ta deregulacija velik efekt na metabolno kontrolo v rastlini zaradi porušenega ravnotežja transporta majhnih metabolnih molekul ali zaradi sprememb v ekspresiji genov, na katere vpliva gibanje informacijskih molekul kot so mRNK (Maule in sod., 2002).

Najpreprostejša metoda za spremljanje gibanja virusa po rastlini je beleženje bolezenskih znamenj, ki se pojavijo na inokuliranih listih in kasneje na celotni rastlini. Če se pojavijo sistemska bolezenska znamenja, je običajno, da se je virus razširil iz inokuliranih listov v druge predele rastline. Se pa te metode ne da uporabiti na tolerantnih rastlinah, kjer je nujna uporaba bolj specifičnih metod, s katerimi iščemo virusne proteine in/ali nukleinske kisline, lahko pa tudi vizualno opazujemo virusne delce pod elektronskim mikroskopom. Za lokalizacijo virusa v rastlini se lahko poslužujemo seroloških metod (direktna in indirektna ELISA, odtiskovanje tkiva, imunosorbentska elektronska mikroskopija) in molekularnih testov (hibridizacija, PCR, RT-PCR, RT-PCR-ELISA, PCR v realnem času, mikromreže). Reporterski gen kot je β -galaktozidaza ali zeleni fluorescenčni protein lahko vstavimo v genom virusa in potem sledimo infekciji tako, da sledimo produktom reporterskih genov. To strategijo lahko uporabimo le če prisotnost reporterskega gena ne vpliva na infekcijo virusa. (Mehlein sod., 2004).

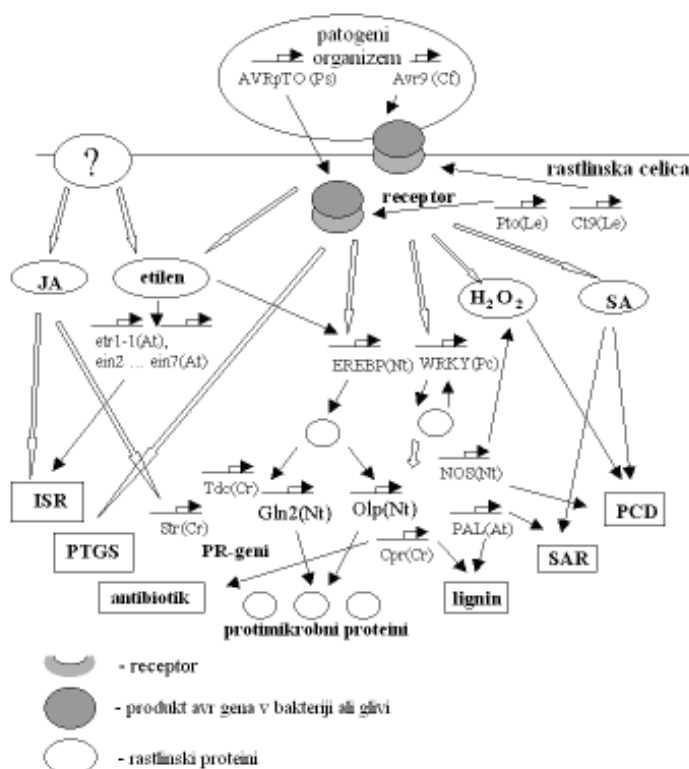
2.3. OBRAMBA RASTLIN PRED PATOGENIMI MIKROORGANIZMI

Rastline napadajo številni patogeni organizmi, vendar ni nujno da rastline zato zbolijo. Interakcije med mikroorganizmom in rastlino so zelo kompleksne. Če mikroorganizem rastlinske vrste ne more okužiti je ta rastlinska vrsta **negostiteljska**. Če pa mikroorganizem rastlinsko vrsto lahko okuži in se v njej uspešno razmnožuje, je ta vrsta **gostiteljska**, mikroorganizem pa **virulenten**. Rastlina je v tem primeru **občutljiva**, interakcija med njima pa **kompatibilna**. Razvije se bolezen. Gostiteljska rastlina je na določen mikroorganizem **rezistentna**, v primeru če ima mehanizme, s katerimi se pred njim brani. Tak mikroorganizem im. **avirulenten**, interakcija med njima pa je **nekompatibilna**. Vzrok za nezmožnost okužbe negostiteljske rastline je ponavadi osnovna obramba (basal defense), ki vključuje fizične bariere kot so celične stena, povečana kutikula, trnje, skorja ter tudi že prisotne antimikrobne substance (Soosaar in sod., 2005).

Obrambni odgovor rastline kontrolira genski zapis rastline. Odpornost pred patogenim mikroorganizmom je lahko na nivoju vrste ali kultivarja. Odpornost na nivoju kultivarja

pomeni, da je specifičen posameznik znotraj rastlinske vrste odporen na določen patogeni mikroorganizem. Tak način obrambe je pogosto povezan z preobčutljivostnim odgovorom. Odpornost na nivoju vrste (non-host resistance) pa pomeni, da je na določen patogeni mikroorganizem odporna celotna rastlinska vrsta. Slednja odpornost je lahko posledica uspešne pasivne (npr. fizična bariera) ali aktivne (specifično prepoznavanje patogenega mikroorganizma) obrambe (Cunha in sod, 2006).

Okužba z patogenim mikroorganizmom povzroči raznovrstne spremembe v fizioloških, biokemijskih in metabolnih procesih znotraj rastline (slika 1). Posledica teh sprememb so pogosto bolezenska znamenja, ki se lahko pojavijo na različnih delih rastline in na njeni rasti (Jameson in Clarke, 2002). Bolezenska znamenja predstavljajo vsoto fizioloških in strukturnih sprememb na nivoju celic ter sprememb v fiziologiji, ki so povezane z zmanjšanjem rasti in degradacijo v razvoju celotne rastline (Maule in sod., 2002).



Slika 1: Shema molekularnih dogodkov med patogenozo v rastlini. SA – salicilna kislina, JA – jasmonska kislina, H₂O₂ – vodikov peroksid, PR – s patogenozo povezani geni, SAR – sistemsko pridobljena imunost, ISR – inducirana sistemska rezistenca, PCD – programirana celična smrt, PTGS – posttranslacijsko utiňanje genov, AVR – avirulentna determinanta, Pto – R gen (*Pseudomonas syringae* pv tomato), Ct9 – R gen, etr – etilen vezavni protein (ethylene response), ein – gen signalne poti etilena (ethylen insensitive), EREBP in WRKY – transkripcijski faktor, NOS – dušik oksidna sintetaza, PAL – fenilalanin – amonliaza, Tdc – triptofan dekarboksilaza, Str – striktozidin sintetaza, Gln – glutamin sintetaza, Olp – ozmotin podoben protein, Cpr – konstitutivno izražanje PR genov. Tanke puščice povezujejo neposredno povezane produkte genov v reakciji. Prazne puščice označujejo dogodke, za katere so potrebni dodatni elementi za signalno transdukcijo. (povzeto po Gene network on plant interaction with pathogen organisms, 2006).

Ko rastlina (nekompatibilna interakcija) prepozna patogeni organizem, se najprej aktivira **zgodnji odgovor**, ki vključuje spremembe v pretoku ionov, aktivaciji signalne poti (posebej kaskade kinaz), velike spremembe v transkripcijskem profilu, generiranje reaktivnih kisikovih radikalov (ROS) in produktov dušikovega oksida (NO). Tem hitrim spremembam sledijo spremembe v celičnih aktivnosti z okrepitevijo sinteze nekaterih hormonov, ki potem sodelujejo pri obrambi. Tipični rezultat teh procesov je **programirana celična smrt** (PCD) okuženih celic. Ta način začetnega odziva im. **hipersenzitivni odgovor** (HR). PCD se zgodi v tistih celicah, ki so bile izpostavljene okužbi in se kaže z diskretnimi lokalnimi nekrozami. Na tak način rastlina poskuša omejiti virusno okužbo znotraj nekroze in ji preprečiti širjenje v sosednje zdravo tkivo. PCD naj bi potem inducirala nadaljnje obrambne odgovore. PCD mora biti natančno regulirana. Če se PCD napačno regulira, nekontrolirana smrt postane patološka. Signal, ki je potreben za zmanjšanje PCD pri normalnem HR še ni znan. Domnevajo, da bi lahko bil to avtofagni mehanizem, s katerim je PCD omejena le na mestu infekcije (Soosaar in sod., 2005). Celica umre skupaj z virom signalnih molekul, zato je ta genska mreža uravnavana z negativno povratno zanko (Gene Network on plant interaction with pathogen organisms, 2006).

Elicitorji patogenih organizmov povzročijo tok H^+ , K^+ , Cl^- in Ca^{2+} preko plazemske membrane (Yang in sod., 1997). Spremembe v pretoku ionov aktivirajo nekatere kaskade proteinskih kinaz. Te kaskade so pomembne za signalno transdukcijo med obrambo. Poznani sta dve proteinskih kinazi, ki ju aktivira mitogen WIPK (angl. Wounding induce protein kinase) in SIPK (angl. salicylic acid induced protein kinase). Ko se WIPK in SIPK aktivirajo, sprožijo ekspresijo obrambnih genov, vključno z transkripcijskimi faktorji (TF), ki so člani WRKY družine specifičnih rastlinskih TF (Soosaar in sod., 2005).

Na mestu penetracije patogenega mikroorganizma se sintetizirajo kisikovi radikali kot so H_2O_2 , O_2^- , OH^- . Ti povzročijo oksidativni stres, ki mu sledi smrt okuženih celic (Gene Network on plant interaction with pathogen organisms, 2006). Generiranje reaktivnih kisikovih radikalov (ROS) v rastlinah je podobno oksidativnemu stresu v neutrofilcih pri sesalcih. Produkcija ROS povzroča celične poškodbe tako gostitelju kot patogenemu mikroorganizmu (Cohn in sod., 2001). Znanstveniki menijo, da je oksidativni stres, ki ga povzroči napad patogenega mikroorganizma, povezan z številnimi signalnimi verigami in naj bi bil povezan tudi z aktivacijo G proteinov, pritokom Ca^{+2} , izmenjavo H^+ in K^+ , aktivacijo fosfolipaz in s fosforilacijo proteinov. Produkcija ROS je verjetno odvisna od aktivacije plazemske NADPH oksidaze. Opazili so, da se med napadom patogenega mikroorganizma zgodita dve ločeni fazi produkcije ROS. Prvi oksidativni stres se zgodi ob okužbi (v prvih minutah) tako pri rezistentnih kot pri dovzetnih rastlinah. Medtem ko se drugi dolgotrajnejši oksidativni stres zgodi nekaj ur po infekciji le pri rezistentnih rastlinah. (Yang in sod., 1997)

Superoksidni anion in vodikov peroksid, ki se tvorita med oksidativnim stresom, imata številne vplive v obrambi rastline. Pokazali so, da ima H_2O_2 lahko direktne antimikrobne učinke (Yang in sod., 1997). Zvišanje koncentracije vodikovega peroksida inducira navzkrižno povezovanje proteinov v celični steni in ojača delovanje peroksidnih katalaz za sintezo lignina ter tako ustvari fizično bariero, ki onemogoča vstop patogenemu mikroorganizmu. ROS lahko služijo tudi kot sekundarni sporočevalci za aktivacijo genov

obrambnega odgovora (Durner in sod., 1997). H_2O_2 poveča sintezo salicine kisline (SA) v tobaku tako, da spodbudi aktivnost benzojska kislina-2-hidroksilaze. Znanstveniki predvidevajo, da ROS aktivirajo izražanje obrambnih genov tako, da spreminjajo redoks status v rastlinski celici ter s tem vplivajo na delovanje TF, ki so občutljivi na redoks stanje. Vplivali naj bi tudi na koncentracijo citosolnega Ca^{2+} in produkcijo lipidnih peroksidaz (Yang in sod., 1997).

Pri tvorbi ROS med obrambo so pomembne tudi respiratorne oksidaze. Mitohondrijska alternativna oksidaza (AOX) deluje tako, da omejuje produkcijo ROS. Vpletena je tudi v s hormoni inducirano rezistenco. Popolna vloga AOX v obrambi še ni bila določena (Soosaar in sod., 2005). Dodajanje eksogene SA inducira transkripcijo AOX genov. Predvidevajo, da AOX deluje kot element signalne transdukcije, ki uravnava ekspresijo gostiteljskih genov ter s tem vpliva tudi na replikacijo in gibanje virusa. Potencialni način delovanja AOX je uravnavanje mitohondrijskega in/ali celičnega oksidoredukcijskega potenciala. Salicilhidroksaminska kislina (SHAM) je relativni selektivni kompetitivni inhibitor AOX. (Murphy in sod., 1999).

Tudi majhna molekula NO je potrebna za PCD in HR. NO inducira izražanje obrambnih genov (Soosaar in sod., 2005) ter deluje sinergistično z ROS in salicilno kislino (Cohn in sod., 2001).

Po tvorbi nekroz, ki so lahko del HR, se aktivira tako im. **sistemska pridobljena rezistenca** (SAR). SAR je signalna transdukcijska pot, ki igra pomembno vlogo pri obrambi rastline pred patogenim mikroorganizmom. (Ryals in sod., 1996). SAR omogoča pridobitev lokalne (na mestu prvotne infekcije) in sistematske (v tkivu oddaljenem od mesta prvotne okužbe) odpornosti proti sekundarnemu napadu patogenih mikroorganizmov. Pojavi se nekaj dni po infekciji ter lahko traja nekaj tednov. Deluje proti širokemu spektru patogenih mikroorganizmov, ki so lahko nesorodni (Raskin, 1992). Za SAR je značilna ekspresija SAR genov (Cohn in sod., 2001).

SAR geni kodirajo s **patogenezo povezane proteine** (PR - pathogenesis-related) (Shirasu in sod., 1996). Klasificirali in okarakterizirali so že veliko različnih PR proteinov. Čeprav funkcija številnih PR proteinov še ni znana, so nekateri pokazali, da imajo škodljiv vpliv na patogene mikroorganizme *in vitro*. Eksperimenti, v katerih so uporabili transgene rastline, ki so izražale več PR proteinov, kažejo na to, da verjetno delujejo PR proteini sinergistično. Antimikrobno delovanje PR proteinov lahko tudi indirektno prispeva k imunosti rastline (Cohn in sod., 2001). PR proteini imajo različne funkcije npr. PR-1 (proti glivni), PR-2 (kislinski in bazični β -1,3-glukanaze), PR-3 (hitinaze), PR-4 (proti glivni), PR-5 (taumatin-podobni proteini), in PR-8 (kislinske in bazične razred III hitinaze). Transgene rastline s prekomerno ekspresijo SAR genov v veliko (vendar ne v vseh) primerih kažejo večjo zaščito proti nekaj patogenimi mikroorganizmi, kar kaže na to, da naj bi ti geni igrali potencialno vlogo pri indukciji rezistence (Shirasu in sod., 1996). Še vedno ni bilo pokazano, da PR proteini inhibirajo virusno aktivnost. Dokazali pa so, da se PR proteini kompleksno izražajo kot odgovor na SA, jasmonsko kislino (JA) in etilen. Kaže se, da etilen inducira ekspresijo osnovnih PR proteinov, medtem ko je SA močno vpletena v indukcijo PR genov povezanih s SAR (Jameson in Clarke, 2002).

Drugi sistemski odziv oz. odziv celotne rastline je **induciran sistemska rezistenca – ISR**. Od SAR se razlikuje v tem, da aktivira drugo skupino s patogenezo povezanih genov in aktivira druge transdukcijske signalne poti (brez udeležbe SA) (Pieterse in sod., 1996).

Tudi hormoni so pomembni efektorji obrambe pred patogenimi mikroorganizmi. Njihova vloga je dobro dokumentirana. JA, etilen in SA se kažejo kot najbolj pomembni hormoni vpleteni v obrambo. Povezava med temi potmi je velika. To dejstvo nas ne preseneča, če smatramo da obstaja več poti, ki lahko ena drugo ojačajo ali zavirajo in tako zagotavljajo uspešen obrambni odgovor. Povezave med potmi tudi izboljšajo regulacijo obrambnega odgovora in onemogočajo delovanje patogenega mikroorganizma (Soosaar in sod., 2005).

2.3.1. Odpornost rastlin na viruse

Mehanizem odpornosti rastlin na viruse še ni v celoti pojasnjen. Poznana sta dva tipa odpornosti:

a. Odpornost odvisna od rezistentnih (R) genov

Rastlinski R geni dajo rastlini rezistenco na številne patogene mikroorganizme vključno z virusi. Vsak R gen nosi rezistenco za specifičen patogeni mikroorganizem. Molekulo patogenega mikroorganizma, ki povzroči točno določen odgovor odvisen od R genov, imenujemo avirulentna determinanta (Avr). Avr proteini so običajno nujni za uspešno infekcijo. Katerakoli proteinska komponenta virusa lahko deluje kot specifična Avr determinanta (elicitor), ki sproži rezistenco kodirano z R geni (Soosaar in sod., 2005). Specifičnost prepoznavne med Avr determinanto in R geni opisuje »gen za gen« hipoteza. Slednja hipoteza govori tudi o tem, da se v primeru, ko gostitelj ne vsebuje ustreznega R gena, razvije bolezen (Cohn in sod., 2001).

Produkti Avr genov se transportirajo v intercelularni prostor ali pa direktno v rastlinsko celico, kjer reagirajo s produkti R genov. R proteini so lahko transmembranski ali pa intracelularni. Zanje se domneva, da sprožijo signalno transdukcijsko kaskado po vezavi liganda. Številni produkti R genov si delijo strukturne motive, kar kaže na to, da lahko podobne poti kontrolirajo odpornost na različne patogene mikroorganizme. Identificirali so že več kot 20 R genov, ki jih so razdelili v pet razredov:

- intrecelularni proteini z nukleotidno vezavno domeno (NBS), levcin-ziper motivi in levcin bogatimi ponovitvami (LRR domene)
- intracelularni NBS-LRR proteini z regijami, ki so podobne citoplazemskim domenam sesalčjih interlevkin-1 receptorjem (IL-1R) in Toll proteinom *Drosophila* (TIR = Toll/IL-1R domena)
- intracelularne proteinske kinaze (PK)
- proteini z LRR domeno, ki kodira membransko vezane ekstracelularne proteine
- receptorjem podobne kinaze (RLK) z ekstracelularno LRR domeno

Številni okarakterizirani R geni kodirajo citoplazemske proteine z regijami, za katere se domneva, da so vpleteni v signalno transdukcijsko (Cohn in sod., 2001). Vsi R-proteini, ki omogočajo odpornost proti virusom, vsebujejo nukleotid-vezavno domeno ter na N- koncu z levcini bogate ponovitve (Goldbach in sod., 2003). V celici se R proteini nahajajo v obliki R proteinskega kompleksa, ki ga tvorijo skupaj z šaperoni Hsp90 (heat shock protein

90). Funkcija tega kompleksa je še neznana, vendar se domneva, da so Hsp90 vpleteni v regulacijo konformacije R proteinov v celici (Soosaar in sod., 2005).

Virusni Avr proteini se ne prepoznajo na način receptor ligand. »Varovalna« teorija predstavi eno možnost kako naj bi potekala prepoznavna Avr proteinov virusa: R (varovalni) proteini so konstitutivno povezani s celičnimi (varovanimi) proteini, ki jih patogeni mikroorganizem potrebuje za infekcijo. Ob infekciji patogeni mikroorganizem povzroči modifikacijo varovanega, kar zazna varovalni protein. Kakršnakoli modifikacija v kvartarni strukturi varovanega proteina, aktivira varovalni protein, da sproži kaskado signalov, ki vodi do obrambnega odgovora (Biezen in sod., 1998).

Prvi fenotip obrambe je v večini primerov HR na mestu vdora patogenega mikroorganizma. Sekundarni fenotip pa je sistemska odpornost (SAR), ki se zgodi v tkivu, ki je oddaljeno od mesta okužbe in povzroči imunosti na ta ali podobni patogeni mikroorganizem. SAR je okarakterizirana s povečano ekspresijo s patogenezno povezanih (PR) genov, ki kodirajo antimikrobne substance (Soosaar in sod., 2005).

b. Posttranskripcijsko utišanje genov (PTGS)

PTGS je celični mehanizem obrambe pred tujimi nukleinskimi kislinami, ki deluje tudi v regulaciji genske ekspresije. RNK utišanje povzroči dvoverižna molekula RNK (dsRNK). RNK sekvenca, ki je homologna dsRNK, se razgradi in gen, ki kodira to homologno RNK molekulo se uspešno utiša. dsRNK so lahko produkt rastlinske ali virusne RdRP (od RNA odvisne RNA- polimeraze) ali pa so produkt transgena, ki je protismiselno RNK-zaporedje. PTGS se lahko aktivira tudi z direktnim vnosom specifičnih dsRNK (Maule in sod., 2002).

Mehanizem PTGS poteka v treh korakih: V prvem se dolg prekursor dsRNK cepi v ATP odvisnem koraku z endonukleazo DICER tipa ribonukleazo III v 21 - 24 nukleotidov dolgo dsRNK. Ta se ob prisotnosti ATP odvije verjetno z DEAD-box RNK helikazo in postane enoverižna. V drugem koraku se tvori ribonukleotidni kompleks (RISC - RNA-induced silencing complex), ki ga sestavljajo enoverižna kratka molekula RNK (siRNK), DICER in argonavtni protein. V zadnjem koraku se ribonukleotidni kompleks RISC veže na sredino komplementarne RNK molekule in jo cepi. Nastale siRNK se nato širijo iz celice v celico po organizmu, v rastlinah verjetno preko plazmodezem (Soosaar in sod., 2005). Domneva se, da bi lahko te kratke RNK molekule sodelovale pri prenašanju specifičnega signala, ki aktivira PTGS na oddaljeni lokaciji (Maule in sod., 2002).

Rastlinski virusi so razvili mehanizme, s katerimi se branijo pred PTGS, in sicer sposobni so producirati proteinske supresorje. Supresorji lahko delujejo tako, da inhibirajo osrednji mehanizma PTGS ali pa ovirajo nek lokalni oz. distalni signal (Maule in sod., 2002). Eden izmed znanih supresorjev je Hc-Pro (helper-competent proteinase), ki je značilen za Potyvirus (Soosaar in sod., 2005).

2.4. SALICILNA KISLINA

Salicilna kislina (SA) ali orto –hidroksibenzojska kislina spada v skupino rastlinskih fenolov in se v različnih koncentracijah nahaja v vseh rastlinah. Johannu Buchnerju je leta 1828 v Münchenu uspelo izolirati majhno količino glukozid salicil alkohola. Ime aktivne substance, salicilna kislina, izvira iz latinske besede Salix (vrba). Prva komercialna produkcija sintetične SA se je začela leta 1874 v Nemčiji. Aspirin, blagovno ime za acetilsalicilno kislino, je na trg dalo podjetje Bayer leta 1898 (Raskin, 1992).

Salicilno kislino uvrščamo v skupino rastlinskih regulatorjev (hormonov) (Raskin, 1992). Za rastlinske hormone je značilno, da so endogene substance, ki sprožijo številne fiziološke procese pri nizkih koncentracijah. Imajo majhno molsko maso. Lahko delujejo v celici, kjer se tvorijo. Sposobni so premikanja in lahko delujejo na več vrst celic (Staswick in Davies, 1995).

Salicilna kislina tako kot druge fenolne substance vpliva na fiziološke in biokemijske procese v rastlini. Znano je, da vpliva na rast, cvetenje, fotosintezo, transpiracijo, produkcijo etilena, transport ionov prek membrane in termogenezo. SA deluje tudi kot endogen signal, ki sodeluje pri obrambi rastline proti patogenim organizmom (Hayat in sod., 1997a).

2.4.1. Biosinteza in metabolizem salicilne kisline

SA se lahko sintetizira po dveh poteh: fenilpropanoidni in horizmat/izohorizmatni. Slednja je bolj značilna za mikroorganizme (Shah in sod., 2003). Večina SA se v rastlinah sintetizira iz fenilalanina, ki se z encimom fenilalanin-amonliaza (PAL) pretvori v trans-cimetno kislino (CA). Od tu naj bi sinteza do SA potekala po dveh poteh (slika 1):

- β - oksidativna poti, na kateri se dekarboksilira cimetna kislina do benzojske kisline (BA)
- neoksidativno pot, na kateri se cimetna kislina hidroksilira v kumarat. Slednji pa v BA.

Zadnji korak sintezne poti katalizira benzojska kislina-2-hidroksilaza (BA2H), katere aktivnost aktivira infekcija s patogenim organizmom ali aplikacija eksogene BA (Ryals in sod., 1996).

2.4.2. Vpletenost salicilne kisline v obrambo rastlin pred patogenimi mikroorganizmi

Več dokazov govori o tem, da je SA ključna signalna komponenta vključena v aktivacijo nekaterih rastlinskih obrambnih odgovorov. Po okužbi tobaka z TMV (virus mozaika tobaka) se SA v visokih količinah akumulira na mestu okužbe, z zakasnitvijo in v manjši meri se akumulira tudi v neokuženem tkivu. V tobaku ta dvig poteka istočasno kot transkripcija PR genov v okuženih in neokuženih listih. Vpletenost SA v obrambo rastline pred patogenim mikroorganizmom so pokazale tudi analize transgenih rastlin tobaka in *Arabidopsis*, ki so izražale NahG gen, ki kodira encim salicilat hidroksilazo iz *Pseudomonas putida*. Te rastline akumulirajo zelo malo ali skoraj nič SA. Izražajo nič oziroma zelo malo PR genov ter so tako nesposobne osnovati SAR in se slabše branijo pred razmnoževanjem in širjenjem patogenega mikroorganizma. Še en dokaz pomembnost SA pri aktivaciji rezistence so znanstveniki dobili na rastlinah *Arabidopsis*, ki je postal občutljiv na avirulenten glivni patogeni orgnizem, ko je bila inhibirana aktivnost fenilalanin amon - liaze (PAL). PAL katalizira prvi korak biosinteze SA. Rezistenca se je tem rastlinam lahko povrnila z dodajanjem eksogene SA (Durner in sod., 1997).

Signalna pot SA v rastlinski obrambi ni linearna ampak je kompleksna mreža. Številni stimulatorji lahko aktivirajo sintezo in signalizacijo SA. SA se lahko specifično veže na različne rastlinske proteine in vpliva na njihovo aktivnost . Lahko aktivira tudi izražanje oz. aktivnost genov z različnimi mehanizmi in različnimi koraki v signalizaciji pri rastlinski obrambi. SA vpliva tudi na druge signalne mehanizme v rastlinski obrambi. Razvoj in okoljski vplivi tudi vplivajo na sintezo in signalizacijo SA (Shah, 2003).

Signalizacija z SA poteka preko NPR1 proteina (non-expressor of P1), ki vsebuje ponovitve anikrina (omogočajo protein-protein interakcije). NPR1 se nahaja v citoplazmi v obliki oligomera in odgovori na spremembe celičnega redoks potenciala, ki jih povzroči okužba s patogenim mikroorganizmom, tako da se njegova monomerna oblika transportira v jedro (Halim in sod., 2006). V jedru je potreben za aktivacijo signalizacije. Aplikacija SA in okužba s patogenim mikroorganizmom ojačata izražanje NPR1 proteina. SA lahko vpliva na aktivnost NPR1 proteina na dva načina: aktivira ekspresijo NPR1 gena ali pa stimulira translokacijo NPR1 proteina v jedro. Na *Arabidopsis* so dokazali, da NPR1 protein v jedru reagira z TGA faktorji, za katere je znano da so DNK vezavni proteini. Znanstveniki so odkrili tudi od SA-odvisne obrambne mehanizme, ki pa so NPR1 neodvisni. Ti še niso natančno pojasnjeni (Shah, 2003).

Že nekaj časa znanstveniki iščejo sistemski signal, ki aktivira PR proteine in/ali obrambne mehanizme. Raziskave so pokazale, da se ta signal lahko prenaša preko floema. Predlagano je bilo, da je lahko ta sistematski signal ravno SA, saj izpolnjuje kriterije signalne molekule: a) aktivira rezistenco pred patogenim mikroorganizmom; b) aktivira izražanje PR proteinov; c) nivo SA naraste lokalno in sistemsko po napadu patogenega mikroorganizma in ; d) SA potuje po rastlini preko floema (Raskin, 1992). Vendar pa obstajajo dokazi, ki temu nasprotujejo. Na rastlinah tobaka so pokazali, da SA verjetno ni mobilni signal za SAR, je pa potrebna za sistemsko signalno transdukcijo (Vernooij in sod., 1994). Nedavno je bilo pokazano, da metil salicilati, ki se sintetizirajo iz SA pri okužbi z TMV pri tobaku, lahko funkcionirajo kot signali, ki potujejo po rastlini. Našli so

jih v vaskularnem sistemu. Po pretvorbi metil salicilatov nazaj v SA, ta aktivira obrambni odgovor v neokuženem tkivu in možno tudi v sosednji rastlini (Durner in sod., 1997).

SA je potrebna za osnovanje in vzdrževanje SAR. Mehanizem, s katerim SA inducira SAR, je še vedno nejasen (Durner in sod., 1997).

Prehodne študije so pokazale, da se SA veže in inhibira aktivnost katalaz v tobaku tako *in vitro* kot *in vivo*. Možna funkcija SA je inhibiranje katalazne aktivnosti, ki odstranjujejo vodikov peroksid (H_2O_2) in tako vpliva na povečanje endogenih količin peroksida, ki se proizvajajo pri fotorespiraciji, fotosintezi, oksidativni fosforilaciji in HR oksidativnem izbruhu. SA ne more vplivati na te encime, če se nahaja v subcelularnih organelih. Peroksid in druge reaktivne kisikove spojine lahko potem služijo kot sekundarni sporočevalci, ki aktivirajo ekspresijo genov povezanih z obrambo, kot so PR geni. Ko je bila ekspresija katalaz inhibirana v listih transgenih rastlin, večina rastlin ni konstitutivno izražala PR genov. Nadalje H_2O_2 in od H_2O_2 odvisne kemikalije so bile nesposobne inducirati izražanje PR genov v NahG rastlinah, kljub temu da so lahko aktivirale PR -1 gene divjega tipa tobaka. Na osnovi teh rezultatov se kaže, da SA deluje skupaj z H_2O_2 prej kot v nasprotju z njim. Nedavno je bilo pokazano, da tretiranje rastlin z visokimi koncentracijami H_2O_2 stimulira biosintezo SA. Tako H_2O_2 lahko igra vlogo pri aktivaciji PR genov z večanjem nivoja SA (Durner in sod., 1997).

Leta 1993 so iz tobaka izolirali SA vezavni protein (SABP), za katerega so ugotovili, da je katalaza. SA specifično inhibira SABP katalazo *in vitro* in inducira 40% povišanje nivoja H_2O_2 *in vivo*. Bilo je predlagano, da SA z inhibicijo SABP povzroči akumulacijo H_2O_2 kot signal za SAR. SABP in z SA inhibirane katalaze so našli tudi v *Arabidopsisu*, kumari in paradižniku. Nekaj nedavnih opazovanj izpodbija katalazni inhibicijski model za SA indukcijo SAR pri tobaku (Shirasu in sod., 1996).

Na drugi strani pa se za protivnetna zdravila, ki temeljijo na fenolu (vključno s SA in aspirinom), verjame, da delujejo kot antioksidativne substance in direktni čistilci reaktivnih kisikovih radikalov. Tako je mogoče, da SA funkcionira kot antioksidant. S to zmožnostjo bi lahko pomagala obvladati oksidativne poškodbe povezane z tvorbami nekroz in/ali njihovo razširitev med HR. Znano je, da so poškodbe, ki se formirajo po infekciji z TMV pri NahG rastlinah večje kot pri divjem tipu (Durner in sod., 1997).

Če glavni mehanizem, s katerimi SA inducira obrambni odgovor, ni dvig H_2O_2 , ki ga povzroči preko inhibicije katalaz ali askorbat peroksidaz, kako je potem SA signal, ki se ga zazna in se odpošilja? Možno je, da se to zgodi preko tvorbe radikalov SA, ki so verjetni produkti interakcij med SA in katalazo ali peroksidazo. Prosti radikali, ki nastanejo iz fenolnih substanc, lahko inducirajo lipidne peroksidaze in produkti teh reakcij kot je lipidni peroksid so lahko signalne molekule pri živalih in možno tudi pri rastlinah. Znano je, da SA inducira lipidno peroksidazo v suspenziji celic tobaka in da lipidna peroksidaza aktivira PR-1 gene v teh celicah (Durner in sod., 1997).

SA v rastlinah inducira ekspresijo številnih z obrambo povezanih genov. Nekateri produkti teh genov so že identificirani in imajo direkten vpliv na glive in bakterije (Murphy in sod., 1999). Gene, ki jih inducira SA lahko delimo v dva obsežna razreda. Prvi razred sestavlja

geni, katerih izražanje je neobčutljivo na sintezo inhibitorjskih proteinov kot je glutation-S-transferazni gen, 35S promotor cvetačnega mozaičnega virusa in pa nopalinski in oktopinski sintezni geni bakterij iz rodu *Agrobacterium*. Promotorji tega razreda genov vsebujejo kopije as-1-podobnim cis elementom in se aktivirajo kot odgovor na SA. Drugi razred genov, ki jih inducira SA, vključuje kisle (razred II) PR gene, katerih aktivacija s SA je občutljiva na inhibitorje proteinske sinteze. Nobenih cis elementov niso do sedaj v teh genih identificirali (Durner in sod., 1997).

SA aktivira z mitogenom aktivirano protein (MAP) kinazo. Z SA inducirane MAP-kinaze verjetno regulirajo ekspresijo PR proteinov in nivo ekspresije nekaterih genov (R genov) vključenih v obrambo pred bakterijami, glivami, nematodami in virusi (Jameson in Clarke., 2002).

V od SA odvisno inducirano imunost je vpletena tudi alternativna oksidaza (AOX). Nahaja se v notranji mitohondrijski membrani. AOX je terminalna oksidaza cianid - rezistentne alternativne dihalne poti v mitohondriju. SA inducira transkripcijo AOX genov. Nivo transkriptov AOX genov je najvišji ob tvorbi HR nekroz. Predvidevajo, da AOX vpliva na podvajanje in gibanje virusa po rastlini tako, da uravnava mitohondrijski in/ali celični redoks potencial ter nadzira tvorbo ROS ali pa je vpletena v regulacijo celične smrti (Murphy in sod., 1999).

Znanstveniki so pokazali, da salicilhidroksaminska kislina (SHAM), ki je inhibitor AOX, ne deluje le kot antagonist aktivacije od SA odvisne pridobljene rezistence pri HR v tobaku, ampak tudi kot antagonist zmanjšanja virusne replikacije pri ne-HR rastlinah. Zanimivo je to, da SHAM ne inhibira produkcije PR-1 proteinov oz. rezistence proti glivam in bakterijam (Jameson in Clarke, 2002). Predlagali so, da se od SA odvisna obrambna signalna pot loči na dve poti: na SHAM občutljivo, ki za delovanje verjetno zahteva aktivnost AOX poti; in na SHAM neobčutljivo, ki vodi do aktivacije antiglivnih in antibakterijskih mehanizmov (Murphy in sod., 1999).

Z uporabo dobro definiranega biološkega modela za SAR so na kumarah odkrili dva razreda sintetičnih kemikalij, ki posnemajo biološko aktivacijo SAR: 2,6-dikloro izonikotinska kislina (INA) in njeni derivati ter benzotidiazolni derivati (BTH). Te kemikalije ne kažejo nobene antimikrobne aktivnosti *in vitro*, aktivirajo pa odpornost proti enakemu spektru patogenih mikroorganizmov kot biološki aktivatorji SAR. Na molekularni ravni te kemikalije sprožijo izražanje karakteristično enakega seta SAR genov kot SA. To dokazuje, da so te kemikalije funkcionalni analogi SA v SAR signalni poti (Oostendrop in sod., 2001). Dokaz za slednjo trditev je tudi eksperiment, v katerem so NahG rastlin tretirali z INA. Ta je aktivirala izražanje SAR genov in povrnila odpornost pred patogenim mikroorganizmom ter tako nasprotovala učinku NahG gena. (Delaney in sod. 1994).

Vedno večje vrednotenje delovanja SA v rastlinah, lahko prinese praktično uporabo v biotehnologiji. Eden možen način je vplivanje na koncentracijo SA v rastlinah z namenom zaščite pridelka. Zvišanje endogene nivoja SA lahko dosežemo z ojačanjem transkripcije ali pa translacije genov povezanih z SA biosintezo ali pa z inhibicijo blokatorjev vpletenih v metabolizem SA (Raskin, 1992). Odpornost rastlin pa bi lahko ojačali tudi tako, da bi

rastline tretirali s kemikalijami, ki aktivirajo del ali celoten sklop obrambe. Kot taki kemikaliji sta znana SA in aspirin, poleg njiju pa še sintetična SA analoga INA in benzotiadizoli. Slednja dva bi lahko uporabljali kot komercialna zaščitna agensa za rastline (Durner, in sod., 1997).

2.4.3. Salicilna kislina in odpornost na viruse

Potencialno bi lahko bili tarče SA naslednji procesi v ciklusu virusne okužbe: podvajanje, gibanje preko plazmodezem in transport preko vaskularnega sistema. Vplivala pa bi lahko tudi na zmanjšanje izražanja rastlinskih genov, ki kodirajo gostiteljske lastnosti, ki omogočajo razmnoževanje in širjenje virusa. Znano je, da se lahko aktivira izražanje številnih PR proteinov, vendar pa do sedaj ni uspelo še nikomur dokazati, da ima katerikoli od njih vlogo pri obrambi pred virusno okužbo (Murphy in sod., 1999).

Dokazali so, da SA lahko inducira motenje podvajanja in systemskega gibanja virusa. Odkrili so, da SA inducira odpornost proti TMV in proti krompirjevemu virusu X (PVX) v inokuliranem tkivu občutljivih rastlin tobaka, z motenjem pomnoževanja virusa. V tobaku SA ne le zmanjša celokupno akumulacijo TMV in PVX RNK, ampak tudi vpliva na razmerje med genomsko RNK virusa in akumulacij mRNK. Eksogena SA lahko inducira rezistenco proti virusom tudi v rastlinah, ki ne vsebujejo rezistentnih genov. Ta rezistenca je okarakterizirana z znižanjem razmnoževanja virusa in zakasnitvijo v razvoju simptomov bolezni ter poteče v odsotnosti makroskopskih celičnih smrti. Različni virusi so lahko različno občutljivi na učinke SA. Isti virus je lahko tarča različnih obrambnih sistemov v različnih rastlinah (Murphy in sod., 1999). Predvidevajo, da SA inducira rezistenco pred virusi z delovanjem mitohondrijske AOX (Murphy in sod., 2001).

2.4.4. Vloga salicilne kisline v obrambi pred patogenimi mikroorganizmi v krompirju

Vlogo SA v obrambi pred patogenimi mikroorganizmi v krompirju je težko določiti. Številne sorte krompirja vsebujejo visok bazalni nivo SA (Halim in sod., 2006), ki ni omejen le na liste, ampak je visok nivo SA prisoten v vsem tkivu krompirja. Večina SA je v obliki glukozida SAG. Steblo vsebuje največjo količino proste SA. Tudi gomolji in korenine krompirja vsebujejo precejšnjo količino SA, ki je pa nižja kot v listih. Povečanje starosti rastline ter povečanje svetlobne intenzitete povzroči povečanje nivoja SA (Navarra in Mayo, 2004). Z ekstrakcijo SA in njenih konjugatov iz listov krompirja sorte Igor, sorte Pentland Squire in sorte Sante so ugotovili, da je bazalni nivo SA višji v mladih kot pa v starejših listih, razen pri sorti Sante. Statistično najnižji nivo SA konjugatov so našli tako v mladih kot starejših listih sorte Sante. V sorti Igor in Pentland Squire so našli podoben delež proste SA (17%). V sorti Sante, pa je bila delež proste SA najvišji (32%) (Krečič-Stres in sod., 2005).

Z opazovanjem okuženega krompirja z *P. infestans* so ugotovili, da so mladi listi krompirjeve rastline z povečano količino SA manj občutljivi na *P. infestans* kot starejši listi. Odporne sorte krompirja vsebujejo večji nivo SA kot pa občutljive. Visok nivo konjugatov neaktivne SA v bolj odpornih sortah krompirja bi lahko predstavljal skupino molekul, ki se lahko hitro pretvorijo v prosto aktivno SA po infekciji s patogenim mikroorganizmom (Coquoz in sod., 1995).

Objavljeni so bili rezultati, ki se ne skladajo s tem, da SA sodeluje pri aktivaciji obrambnega odgovora pred patogenimi mikroorganizmi v krompirju. Namreč eksogena aplikacija SA v občutljivi sorti krompirja ni aktivirala SAR proti *P. infestans*, aktivirala pa je izražanje PR1-podobnih proteinov (Coquoz in sod., 1995). NahG rastline krompirja so okužili z *P. infestans* in ugotovili, da lezije na teh rastlinah niso bile signifikantno večje kot pri kontroli, kar verjetno kaže na to, da visok bazalni nivo SA v kontrolnih rastlinah ne aktivira obrambnega mehanizma pred *P. infestans*. Tudi tretma NahG rastlin z SA je zagotovil le manjšo zaščito proti istemu patogenemu mikroorganizmu. Torej z razliko od tobaka in *Arabidopsis* se zdrave rastline krompirja ne odzovejo na visok osnovni nivo SA, niti na eksogeno aplikacijo SA. Indukcija SAR v krompirju ni povezana z sistemskim povečanjem nivoja SA (Yu in sod., 1997).

Slednji rezultati so bili pridobljeni le z merjenjem velikosti lezij na okuženi rastlini. Ko pa so z uporabo metode PCR v realnem času merili biomaso patogenega mikroorganizma, so ugotovili, da se ta značilno poveča v okuženih NahG rastlinah krompirja v primerjavi z divjim tipom. Tudi količina SA in SAG se je po infekciji z *P. infestans* približno dvakrat povečala v divjem tipu rastlin krompirja. Ti podatki kažejo na to, da je SA v krompirju pomembna za obrambo pred *P. infestans* (Halim in sod., 2007).

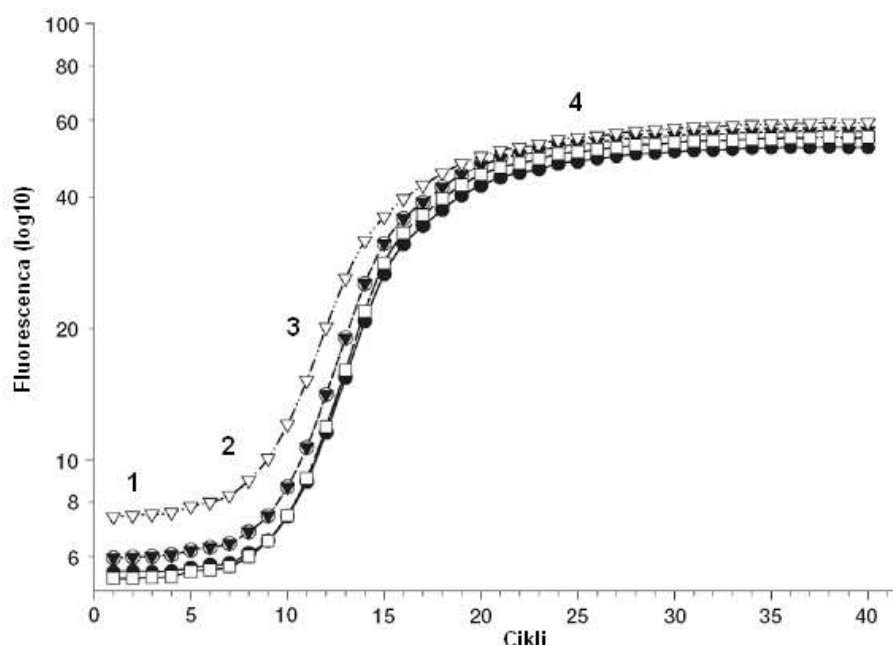
Vpletenost SA v obrambo pri rastlinah krompirja potrjujejo tudi poskusi na sorti krompirja Désirée, ki ne vsebuje znanih R genov, a je odpornost proti *P. infestans*. To sorto so transformirali z NahG genom. Transgene rastline niso bile sposobne akumulirati SA kot odgovor na patogeni mikroorganizem. SAR v krompirju lahko inducirajo ne le okužba s patogenim mikroorganizmom, ampak tudi elicitorji kot so arahidonska kislina in druge poli nenasičene maščobne kisline ter elicitor Pep-13. V obeh primerih so detektirali lokalno in ne sistemsko akumulacijo SA (Halim in sod., 2006).

2.5. MERJENJE KOLIČINE VIRUSA V RASTLINAH

Količino virusa v rastlinah lahko merimo z različnimi metodami, ki se med seboj razlikujejo po občutljivosti in specifičnosti. Ene izmed njih so ELISA, RT-PCR, Q-PCR, mikromreže. Ugotovili so, da je meja zaznave virusa z uporabo mikromrež enako uspešna kot ELISA. Metoda RT-PCR pa je zelo občutljiva, saj z njo detektiramo virus prej kot z ostalimi metodami (Mehle in sod., 2004).

PCR v realnem času (Q-PCR) je metoda, ki omogoča spremljanje nastale pomnožene DNK med samim potekom reakcije ter njeno kvantifikacijo (Valasek in Repa, 2005). Njene prednosti so, da je občutljiva, specifična, ponovljiva, ima široko dinamično območje, omogoča zaznavo že majhne količine transkripta (Pfaffl, 2004). Temelj metode je konvencionalna PCR, ki jo je v 80ih letih prejšnjega stoletja razvil Karl B. Mullis. PCR je proces pomnoževanja željene nukleinske sekvence z termostabilnim DNK polimeraznim encimom. Taq polimeraze. V cikličnem procesu najprej poteče denaturacija dvoverižne DNK pri 95 °C. Reakcija se nato ohladi, kar omogoči vezavo komplementarnim začetnim oligonukleotidom na enoverižno matrično DNK. Potem pa se jo ponovno segreje na 72°C, ki je optimalna temperatura za delovanja polimeraze, da izgradi novo komplementarno DNK (Valasek in Repa, 2005).

PCR lahko razdelimo v štiri faze (slika 3): začetna linearna, zgodnja eksponentna, eksponentna in faza platoja. Med linearno fazo (ponavadi prvih 10 – 15 ciklov) je fluorescenca produkta nižja od fluorescence ozadja. V tej fazi določimo bazno linijo. V zgodnji eksponentni fazi fluorescenca produkta preseže fluorescenco ozadja. V tej fazi določimo linijo prazne vrednosti (threshold). Cikel, v katerem fluorescenca vzorca preseže linijo prazne vrednosti pa imenujemo vrednost Ct (Wong in Medrano, 2005). Vrednost Ct je inverzno proporcionalna količini nukleinske sekvence v vzorcu (Valasek in Repa, 2005). V eksponentni fazi je pomnoževanje produkta optimalno. V vsakem ciklu se v idealnih pogojih reakcije količina produkta podvoji. V tej fazi določimo kakšna je količina produkta v našem vzorcu. Računalniški programa nam po končani reakciji na podlagi izmerjenih vrednosti izriše amplifikacijsko krivuljo, ki prikazuje odvisnost jakosti fluorescence vzorca od števila ciklov. V zadnji plato fazi pa se zaradi porabe reagentov in upada aktivnosti encima pomnoževanje prekine. Podatki o fluorescenci iz te faze niso več uporabni za kvantitativno analizo (Wong in Medrano, 2005).



Slika 3: Faze PCR amplifikacijske krivulje.

1 - začetna linearna faza, 2 - zgodnja eksponentna faza, 3 - eksponentna faza, 4 - faza platoja (povzeto po Pfaffl, 2004).

Ključna lastnost qPCR metode je zbiranje podatkov med samim procesom pomnoževanja DNK. To lahko dosežemo z uporabo specifičnih kemikalij in instrumentov (Valasek in Repa, 2005). Detekcija produkta temelji na merjenju fluorescentnega signala, ki je proporcionalen količini pomnožene tarčne sekvence (Nolan in sod., 2006). V uporabi so različna DNK – vezavna barvila npr. etidijev bromid, SYBR green, hidrolizirajoče sonde, hibridizacijske sonde itd. Najpogosteje je v uporabi barvilo SYBR green, ki se veže na vsako dvojno verigo DNK (dsDNK). Ob vezavi sprošča 1000 krat večjo fluorescenco kot pa, če je prost v raztopini. Ker se veže nespecifično, lahko zaznamo katerokoli podvojeno DNK sekvenco. Bolj specifična barvila so hidrolizne sonde, ki jih poznamo pod imenom TaqMan sonde. Te se specifično vežejo na določeno nukleinsko sekvenco, zato zaznamo le zelene produkte. Sestavljene so iz dveh delov: na 5' – koncu imajo vezano reportersko

barvilo (npr. FAM, VIC, NED), na 3' – koncu pa dušilno barvilo (npr. TAMRA, DABCLY, BHQ). Ko sta reportersko in dušilno barvilo blizu skupaj (torej ko sta oba vezana na kratek oligonukleotid), dušilno barvilo absorbira signal reporterskega. To je primer energijskega prenosa fluorescentne resonance iz donorja na akceptorja (FRET). Ko med pomnoževanjem DNK-polimeraza razgradi sondo, se reportersko in dušilno barvilo ločita. Posledica je naraščanje reporterskega signala (Valasek in Repa, 2005).

Pridobljene podatke lahko analiziramo po dve metodah: absolutni in relativni kvantifikaciji. Obe metodi uporabita Ct vrednost za kvantifikacijo oz. določanje genske ekspresije (Valasek in Repa, 2005). Z absolutno kvantifikacijo izmerimo točno število kopij gena v vzorcu. Ta metoda zahteva standardno krivuljo znanega števila kopij gena. V ta namen lahko uporabimo amplikon, ki ga pomožujemo v vzorcu ali sintetični oligonukleotid. Standardna krivulja predstavlja razmerje med Ct vrednostmi in logaritmskimi vrednostmi količine standarda in nam omogoča, da določimo koncentracijo DNK v vzorcu na podlagi njene Ct vrednosti (Wong in Medrano, 2005). Z relativno kvantifikacijo določimo razmerje med številom kopij gena, ki ga analiziramo in endogeno kontrolo. Za endogeno kontrolo uporabimo hišni gen ali katerikoli drug gen, za katerega pričakujemo, da se bo enako izražal ne glede na pogoje v eksperimentu. S to metodo lahko določimo le relativne spremembe pri izražanju gena, ki nas zanima (Valasek in Repa, 2005). Poznanih je več metod relativne kvantifikacije:

- metoda $\Delta\Delta C_t$,
- Pfafflov model relativne kvantifikacije,
- Q-Gene
- DART-PCR,
- in druge

(povzeto po Wong in Medrano, 2005).

Učinkovitost pomnoževanja (E) reakcije je pomembna, ko uporabljamo relativno kvantifikacijo. Idealna učinkovitost pomnoževanja je 100% kar pomeni, da se koncentracija PCR produkta podvoji med vsakim ciklom med eksponentno fazo. Velikokrat pa je učinkovitost pomnoževanja ni idealna, kar lahko vpliva na kakovost obdelave podatkov, če tega ne upoštevamo (Wong in Medrano, 2005). Učinkovitost pomnoževanja se lahko tudi spreminja med vzorci ter med tarčnim in referenčnim genom. Že majhna sprememba v učinkovitosti pomnoževanja, lahko močno vpliva na končni rezultat, zato je to potrebno upoštevati pri izračunih (Pfaffl, 2004).

Omejitev encima DNK polimeraze je v tem, da lahko uporablja le DNK kot šablono. Če torej želimo kvantificirati sorazmerno količino izraženega gena, moramo najprej izolirano RNK prepisati v DNK z uporabo encima reverzna transkriptaza. To metodo poznamo pod imenom RT-qPCR (kombinacija reverzne transkripcije in PCR-a v realnem času). RT-qPCR se najpogosteje uporablja za določanje izražanja genov ali pa za validacijo rezultatov pridobljenih na DNK mikromrežah (Valasek in Repa, 2005). Analiza lahko poteka v dveh ločenih korakih, kjer najprej reverzna transkriptaza RNA prepíše v cDNA v eni in nato v drugi, prostorsko ločeni reakciji, poteče še qPCR. Lahko pa analiza poteče le v enem koraku, ko na istem mestu izvedemo obe reakciji (Nolan in sod., 2006).

3. MATERIALI IN METODE

3.1. RASTLINSKI MATERIAL

3.1.1. Uporabljeni rastlinski material

V poskusa smo uporabili rastline krompirja sorte **Igor** iz zbirke tkivnih kultur na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) ter **NahG-D2** in **NahG-A** transformante krompirja sorte Dèsirèe, ki so jo transformirali na Leibniz inštitutu za rastlinsko biokemijo v Nemčiji. NahG transformate imajo v genom vnesen gen za encim salicilat hidroksilazo, ki razgrajuje SA v katehol. Za te transformante so dokazali zmanjšano akumulacijo SA po okužbi s patogenim mikroorganizmom (Leibniz inštitut).

3.1.2. Priprava rastlinskega materiala

Rastline smo najprej razmnožili z nodijsko kulturo in jih gojili na MS (Murashige & Skoog) gojišču (10 ml gojišča v epruvetah) v rastni komori za tkivne kulture. Ko so rastline dovolj zrasle, smo njihove izsečke prestavili na gojišče za koreninjenje (40 ml enakega gojišč v plastičnih petrijevkah) ter jih gojili v rastni komori. Pogoji v rastni komori so bili: temperatura 19 ± 2 °C v času osvetljevanja in 17 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov $70 - 90 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 h svetlobe in 8 h teme.

Po 14 dneh smo presadili vsako rastlinico v svoj lončke z zemljo in jih 4 tedne gojili v rastni komori z vlago ter jih zalivali z vodovodno vodo. Pogoji v komori z vlago so bili: relativna zračna vlaga 75 ± 2 %, temperatura 20 ± 2 °C v času osvetljevanja in 18 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov $120 - 150 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 h svetlobe in 8 h teme.

3.1.3. Tretiranje rastlina z 2,6 – dikloro izo nikotinsko kislino (INA)

Rastline smo dan (24 h) pred okuževanjem (12. marec 2008) tretirali z 98% 2,6 – dikloroizotikotinsko kislino (Aldrich), ki je analog salicilne kisline. Tretiranje smo izvedli tako, da smo celo rastlino poškopili (po listih in stebelu) z raztopino te substance. Krompirjeve rastline smo tretirali z dvema različnima koncentracijama 0,3 mM in 1 mM INA. V rastni komori smo tretirane rastline z INA fizično ločili od netretiranih.

3.1.4. Mehanska inokulacija rastlin

Rastlinam smo najprej označili tri spodnje liste, ki smo jih želeli inokulirati, ter jih posuli s karborandom. Nato smo na liste nanесли z rastlinski sok. Po 10 minutah smo liste sprali z vodovodno vodo. Rastlinski sok za slepo okužene rastline smo pripravili iz zdravih, za okužene rastline pa iz z virusom PVY^{NTN} okuženih rastlin krompirja sorte Pentland Squire vzgojenih v tkivni kulturi. Rastlinski material (brez korenin) smo razrezali, mu dodali pufer v razmerju 1:5 (na 1 g sveže mase rastlinskega materiala 5 ml pufera) in homogenizirali v terilnici.

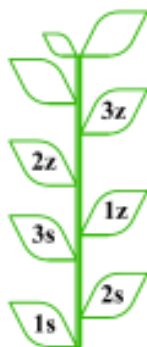
Fosfatni pufer za mehansko inokulacijo

- 2,6 mM NaH₂PO₄
- 15,2 mM Na₂HPO₄
- 0,1 % DIECA
- pH = 7,6

Okužene rastline smo v rastni komori fizično ločili od neokuženih.

3.1.5. Pobiranje rastlinskega materiala

Rastlinski material smo pobirali 6 (ob pojavi lokalnih bolezenskih znamenj) in 14 (ob pojavu sistemskih bolezenskih znamenj) dan po okuževanju (dpo). 6 dpo smo rastlinam pobrali prvi spodnji inokuliran list, 14 dpo pa smo pobrali spodnje liste, ki so bili še na rastlinah ter zgornji neinokuliran list (priloga 2), ki je bil še v dobrem stanju (ni bil rumen ali posušen). Vsak list posebej smo shranili v 2 ml epico (safe lock) ter takoj zamrznili v tekočem dušiku. Tako pobrani material smo hranili v zamrzovalniku (- 80 °C). Liste smo pobirali skupaj z polovico listnega peclja.



Slika 4: Shematični prikaz pobranih listov. Z S so označeni spodnji inokulirani, z Z pa za zgornji neinokulirani listi.

Na koncu poskusa (13. maj 2008) 60 dpo smo rastlinam pobrali gomolje, jih prešteli ter stehtali. Stehtali smo tudi koreninski sistem. Z Studentovim testom smo preverili signifikantno različnost ($p < 0,05$) izmerjenih količin.

3.2. PRIPRAVA RNK

3.2.1. Izolacija RNK

Najprej smo zamrznjen material homogenizirali z aparatom Tissue Lyser (Qiagen, Retsch). Nato pa smo za izolacijo celokupne RNK uporabili RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Izolacijo smo izvedli po postopku, ki je priložen kitu, vendar smo se v nekaterih korakih držali modifikacij, ki so jih za boljši izplen uvedli na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Postopek izolacije:

1. Homogeniziranemu rastlinskemu materialu smo dodali 450 μ L liznega RTL pufra (brez dodanega p-merkpto-etanola) ter vzorec premešali na vorteksu (pri sobni

- temperaturi). Nato smo lizat inkubirali 3 minute na 56 °C z vmesnim premešanjem vzorca na vorteksu.
2. Ves lizat smo prenesli v QIA shredder kolono in centrifugirali 2 minuti pri 1000 g.
 3. Nato smo 400 µL lizata prenesli v novo mikrocentrifugirko in mu dodali 200 µL absolutnega etanola ter premešali s pipeto.
 4. Celoten volumen vzorca smo v naslednjem koraku prenesli v RNeasy spin kolono in centrifugirali 30 sekund pri 8000 g.
 5. Potem pa smo kolono spirali, najprej tako da smo dodali 660 µL RW1 pufra in centrifugirali 30 sekund pri 8000 g in nato smo še dvakrat spirali z 500 µL RPE pufra s tem, da smo pri prvem spiranju z RPE pufrom centrifugirali 30 sekund pri 8000 g, drugič pa 2 minuti pri istih obratih. Tako sprano kolono smo prenesli v prazno mikrocentrifugirko in ponovno centrifugirali 1 minuto pri 8000 g.
 6. Nato smo kolono prenesli v prazno centrifugirko in na membrano nanесли 50 µL destilirane vode (RNase free), ki smo jo prehodno segreli na 56 °C in inkubirali 15 minut ter centrifugirali 1 minuta na 8000 g. Eluat z izolirano RNK smo shranili na – 80 °C.

3.2.2. Razgradnja genomske DNK

Morebitno prisotno DNK v vzorcu smo razgradili z encimom DNaza I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen, ZDA). V reakcijsko mešanico za 1 vzorec smo dali:

Tabela 2: Priprava reakcijske mešanice za razgradnjo DNA z uporabo encima DNaza I.

DNaze I	0,66 µL
RNase Free destilirane vode	5,32 µL
pufra	2 µL
vzorca	12 µL

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 15 minut na sobni temperaturi in ji nato dodali 2 µL EDTA ter inkubirali 10 minut na 65 °C. Vzorec smo nato shranili na – 80 °C.

3.3. Q - PCR V DVEH KORAKIH

Z metode Q - PCR smo izvedli detekcijo in relativno kvantifikacijo virusa PVY^{NTN}.

3.3.1. Reverzna transkripcija

Izolirano RNK smo prepisali v cDNK z uporabo kita High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Reakcijo reverzne transkripcije (RT) pa smo izvedli v aparaturi GeneAmp® PCR System 9700 HT (Applied Biosystems, ZDA). Za reakcijo sinteze cDNA smo uporabili 12,5 µL vzorčne RNA, ki smo ji dodali 12,5 µL reakcijske mešanice, katere sestava je opisani v spodnji tabeli:

Tabela 3: Priprava reakcijske mešanice za sintezo cDNA z uporabo kita High Capacity cDNA Reverse Transcription Kita.

RT pufer	2,5 μ L
začetni oligonukleotid	2,5 μ L
dNTP-ji	1 μ L
RNase Free destilirana voda	3,25 μ L
inhibitor RNaz	1 μ L
RT polimeraza	1,25 μ L uL

Za sintezo cDNA smo uporabili naključne (random) začetne oligonukleotide. Pred dodatkom reakcijske mešanice smo vzorec najprej denaturirali z inkubacijo na 80 °C za 5 minut in hitrim ohlajanjem na ledu. RT reakcija je potekala najprej 10 minut na 25 °C in nato 2 uri na 37 °C.

3.3.2. Detekcija in relativna kvantifikacija virusa PVY^{NTN}

Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času smo izvedli na aparaturi ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA). Za detekcijo in relativno kvantifikacijo virusa PVY^{NTN} smo pomnoževali gen za plaščni protein virusa PVY^{NTN} (CP-NTN). Kot kontrolo smo istočasno pomnoževali cDNK citokromoksidaze (COX), ki se izraža tako v okuženi kot neokuženi rastlini. Detekcijo smo izvedli z uporabo TaqMan kemije (Applied Biosystems), pri kateri se uporablja barvili FAM in TAMRA.

3.3.2.1. qPCR

Za qPCR smo uporabili reagente TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in začetne oligonukleotide (F in R) ter sonde specifične za COX in CP-NTN. Pripravili smo

5 μ L reakcijske mešanice, ki so vsebovale 2 μ L vzorčne cDNA in 3 μ L reakcijske mešanice, katere sestava je opisana v spodnji tabeli:

Tabela 4: Priprava reakcijskih mešanic za pomnoževanje CP-NTN in COX cDNA pri qPCR.

	CP-NTN	COX
začetni oligonukleotid - F	0,125 μ L (10 μ M)	0,15 μ L (30 μ M)
začetni oligonukleotid – R	0,125 μ L (10 μ M)	0,15 μ L (30 μ M)
sonda	0,15 μ L (5 μ M)	0,125 μ L (10 μ M)
destilirana voda	0,1 μ L	0,075 μ L
UMM (2x)	2,5 μ L	2,5 μ L

Vzorci smo dvakrat redčili (100X in 1000X) in jih nanašali v dveh paralelkah za vsako redčino. V luknjice PCR ploščice smo najprej nanjali reakcijske mešanice in nato vzorčno cDNA. Redčine in PCR ploščice za qPCR reakcijo smo pripravili s pomočjo robota Robotic Liquid Handling System MultiPROBE II PLUS EX (Perkin Elmer).

Reakcija qPCR je potekala:

- 2 min na 50 °C
- 10 min na 95 °C
- 40 ciklov: 15 s na 95 °C, 1 min na 60 °C

3.3.3. Analiza podatkov

Analizo podatkov smo izvedli z programom SDS 2.2.2 (Applied Biosystems, ZDA). Računalniški program je izračunal fluorescenčni signal kot razliko med emisijo fluorescence produkta v določenem času in emisijo pasivnega referenčnega barvila ROX (ΔRn). Nato je program izrisal graf, na katerem je bilo na x osi naneseno število PCR ciklov na y pa ΔRn (graf pomnoženega PCR produkta). Za vse aplikone smo nastavili avtomatično bazno linijo (t.j. število ciklov reakcije, pri katerih jakost fluorescence še ne doseže praga detekcije) in prag 0,159 (v eksponentnem območju pomnoževanja). Program je za vsako reakcijo izračunal vrednost Ct (threshold cycle). Ct je cikel, pri katerem ΔRn preseže prag. Nato smo vrednosti Ct prenesli v program Microsoft Excel in analizirali rezultate.

Najprej smo pregledali razlike med paralelkama iste redčine. Te morajo biti čim manjše (razlikujejo se lahko za pol cikla), večja odstopanja lahko pripišemo napaki pri pipetiranju. Potem smo izračunali povprečne vrednosti Ct za vsak vzorec (dve ponovitvi na ploščici in dve redčini). Če je bila razlika v Ct med redčinama manjša od 3 ali večja od 3'9, smo tak vzorec izločili zaradi slabe učinkovitosti pomnoževanja amplikona in zato nezanesljive kvantifikacije. Nadalje smo rezultate obdelovali po dveh metodah. Prva je **absolutna metoda**, s katero smo določili število kopij gena s pomočjo standardne krivulje. Druga pa **relativna kvantifikacija**, s katero smo določili razmerje med številom kopij gena, ki ga analiziramo, (CP-NTN) in referenčnim genom (COX). Relativno stopnjo izražanja tarčnega gena smo izračunali s formulo po Pfafflu, ki upošteva različne učinkovitosti pomnoževanja (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{E_{tarča}^{\Delta Ct_{(kontrola-vzorec)}}}{E_{referenca}^{\Delta Ct_{(kontrola-vzorec)}}} \quad \dots (1)$$

R predstavlja razmerje izražanja preučevanega gena med tarčnim in referenčnim genom. $E_{tarča}$ je učinkovitost pomnoževanja transkripta tarčnega gena (CP-NTN), $E_{referenca}$ je učinkovitost pomnoževanja transkripta referenčnega gena (COX), ΔCt je razlika vrednosti Ct med kontrolnim vzorcem in vzorcem. Kontrolni vzorec je vzorec, ki smo si ga izbrali izmed vseh vzorcev in na katerega smo nato primerjali izražanje vseh drugih.

Tako pri absolutni kot relativni kvantifikaciji smo kot parameter kvalitete izračunali učinkovitost pomnoževanja (E) amplikona. Za to smo potrebovali podatke pridobljene s standardno krivuljo.

$$E = 10^{(-1/naklon)} - 1 \quad \dots (2)$$

4. REZULTATI

4.1. FENOTIPSKE LASTNOSTI

4.1.1. Pojav bolezenskih znamenj

Rastline smo 24 ur pred okužbo z virusom PVY^{NTN} tretirali z 0,3 mM in 1 mM INA. Pri okuževanju smo nekatere rastline (predvsem transformante NahG-D2) zelo poškodovali s karborumdom, kar je bilo vidno kot večje površine odmrlega tkiva na listih, vendar smo ugotovili, da te poškodbe niso vplivale na stanje rastlin.

Lokalna bolezenska znamenja so se pojavila tako na inokuliranih listih netransformiranih rastlin krompirja sorte Igor kot na transformantah krompirja sorte Désirée. Vidna so bila na zgornji in spodnji površini lista. Pri sorti Igor so bila prva lokalna bolezenska znamenja v obliki majhnih točkastih nekroz, ki so kasneje postale večje (slika 6), medtem ko so bila lokalna bolezenska znamenja pri transformantah krompirja sorte Désirée v obliki črnih, rjavo-sivih točkastih nekroz in zelenih lis (sliki 9 in 12). Inokulirani listi so začeli tudi hitreje rumeneti, še posebej okoli nekroz. Pri obeh sortah so se pojavila tudi sistemska bolezenska znamenja. Ta so bila pri transformantah krompirja sorte Désirée bolj izrazita kot pa pri sorti Igor. Pri sorti Igor so bila v obliki zelo majhnih črnih nekroz (bile so manjše kot pa 1. simptomi na inokuliranih listih), pri transformantah krompirja sorte Désirée pa so bila v obliki večjih nekroz, ki so se pojavljale predvsem ob listnih žilah, nekaj pa jih je bilo tudi po ostalem delu listne ploskve. Nekateri neinokulirani listi transformant krompirja sorte Désirée so začeli mozaično rumeneti.

Prva lokalna bolezenska znamenja so se pri rastlinah sorte Igor začela pojavljati 6 dan po okuževanju (dpo), in sicer so bila najbolj izrazita na rastlinah krompirja sorte Igor, ki smo jih tretirali z 1 mM INA (bolezenska znamenja so se pojavila na vseh 5 rastlinah, na vsaj dveh inokuliranih listih) (tabela 5). Le ena rastlina sorte Igor, ki smo jo tretirali z 0,3 mM INA 6 dpo še ni imela lokalnih bolezenskih znamenj. Pri netretiranih rastlinah pa so se bolezenska znamenja pojavila le pri eni rastlini. Bolj izrazita bolezenska znamenja so se pri okuženih netretiranih rastlinah sorte Igor pojavila naslednji dan (7 dpo). Sistemska bolezenska znamenja so se pri rastlinah sorte Igor, ki smo jih tretirali z INA, pojavila 8 dpo torej prej kot pri netretiranem, ko so se pojavila 13 dpo. Sistemska bolezenska znamenja so najprej bolj množično izbruhnila na rastlinah sorte Igor, ki smo jih tretirali z 1 mM INA (pojavila so se na 4 rastlinah od 5), medtem ko je le ena rastlina sorte Igor tretirana z 0,3 mM INA imela sistemska bolezenska znamenja 8 dpo. Pri okuženih rastlinah sorte Igor smo opazili, da listi prej rumenijo in odpadejo kot pa pri neokuženih. Pri odpadanju listov so bile razlike med tretiranimi in netretiranimi rastlinami manj izrazite, medtem ko so listi netretiranih rastlin sorte Igor bolj rumeneli od tretiranih.



Slika 5: Bolezenska znamenja pri rastlinah krompirja sorte **Igor** okuženih s PVY^{NTN}, 8 dpo. Od leve proti desni: tretirana z 1 mM INA, tretirana z 0,3 mM INA, netretirana rastlina.



Slika 6: Inokulirani listi krompirja sorte **Igor** okuženega s PVY^{NTN}. Od leve proti desni: netretirana rastlina 12 dpo, tretirana rastlina z 0,3 mM INA 8 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 6 dpo.



Slika 7: Sistemska bolezenska znamenja krompirja sorte **Igor** okuženega s PVY^{NTN}, 14 dpo. Od leve proti desni: netretirana rastlina, tretirana rastlina z 0,3 mM INA, tretirana rastlina z 1 mM INA.

Pri NahG-D2 transformantih krompirja sorte Désirée so se prva lokalna bolezenska znamenja najprej pojavila le na rastlinah, ki jih nismo tretirali z INA, in sicer 5 dpo le na 1 rastlini, bolj izrazito pa 6 dpo (na 4 rastlinah od 5). Medtem ko so se dan kasneje pojavila na rastlinah tretiranih z 0,3 mM INA (na 3 rastlinah od 5) in dva dni kasneje na rastlinah, ki smo jih tretirali z 1 mM INA (na 2 rastlinah od 5). Sistemska bolezenska znamenja pa so

se pojavila tako pri tretiranih kot pri netretiranih rastlinah 12 dpo, s tem, da so imele 12 dpo sistemska bolezenska znamenja vse netretirane rastline, 3 rastline tretirane z 0,3 mM INA in 2 rastlini tretirani z 1 mM INA. Okužene rastline sorte *Désirée*, ki jih nismo tretirali z INA so začele tudi prej rumeneti. Pri odpadanju listov pa so bile tretirane in netretirane rastline bolj izenačene.



Slika 8: Bolezenska znamenja pri **NahG-D2** transformantih krompirja sorte **Désirée** okuženih s **PVY^{NTN}**, 8 dpo. Od leve proti desni: tretirana z 1 mM INA, tretirana z 0,3 mM INA, netretirana rastlina.



Slika 9: Inokulirani listi **NahG-D2** transformant krompirja sorte **Désirée** okuženega s **PVY^{NTN}**.
Od leve proti desni: netretirana rastlina 6 dpo, tretirana rastlina z 0,3 mM INA 8 dpo,
tretirana rastlina z 1 mM INA 12 dpo.



Slika 10: Sistemska bolezenska znamenja **NahG-D2** transformant krompirja sorte **Désirée** okuženega s **PVY^{NTN}**. Od leve proti desni: netretirana rastlina 12 dpo, tretirana rastlina z 0,3 mM INA 14 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 14 dpo.

Pri NahG-A transformantah krompirja sorte *Désirée* so se prva lokalna bolezenska znamenja najprej pojavili na netretiranih rastlinah (2 od 5 rastlinah) 5 dpo oz. bolj izrazita so bila naslednji dan (na 4 od 5 rastlin) (tabela 6). Na tistih tretiranih z 0,3 mM INA, so se prva lokalna bolezenska znamenja pojavila 6 dpo (na 4 od 5 rastlinah), pri tretiranih z 1 mM INA pa dan kasneje (2 od 5 rastlinah). Sistemska bolezenska znamenja so se pri vseh NahG-A rastlinah pojavili 12 dan po okuževanju na 5 netretirani, 1 tretiranih z 0,3 mM INA in na 3 tretiranih z 1 mM INA. Tako kot pri prejšnjem klonu so se rastline tretirane z INA počasneje starale.



Slika 11: Bolezenska znamenja pri **NahG-A** transformantah krompirja sorte **Désirée** okuženih s PVY^{NTN}, 8 dpo. Od leve proti desni: tretirana z 1 mM INA, tretirana z 0,3 mM INA, netretirana rastlina.



Slika 12: Inokulirani listi **NahG-A** transformant krompirja sorte **Désirée** okuženih s PVY^{NTN}. Od leve proti desni: netretirana rastlina 6 dpo, tretirana rastlina z 0,3 INA 6 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 8 dpo.



Slika 13: Sistemska bolezenska znamenja **NahG-A** transformant krompirja sorte **Désirée** okuženih s PVY^{NTN}. Od leve proti desni: netretirana rastlina 12 dpo, tretirana rastlina z 0,3 mM INA 14 dpo, tretirana rastlina z 1 mM INA 14 dpo.

Tabela 5: Pojavljanje bolezenskih znamenj pri okuženih rastlinah krompirja sotre **Igor**. INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, INA⁻ - netretirana rastlina, r1-r5 – rastlina krompirja, 1s-3s - spodnji z virusom inokulirani listi, dpo - dan po okuževanju z virusom, L – lokalno bolezensko znamenje, S1 – šibko sistemsko bolezensko znamenje, S – močnejše sistemsko bolezensko znamenje, P – inokulirani pobrani list.

dpo	IGOR																																																		
	INA-															0,3 mM INA															1 mM INA																				
	r1			r2			r3			r4			r5			r1			r2			r3			r4			r5			r1			r2			r3			r4			r5								
	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s						
5																																																			
6		L															L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L			
7	P	L	L	P	L	L	P			P	L			L		P	L		P		L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L
8		L	L		L	L					L			L			L		S1		L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L		L	L
12			L						L		L	L		L	L			L	S		L			L	S		L			L	S1	L			L	L	S	L	L	S	L	L	S	L	L	S	L	L			
13			L		S1				L		L	L		L	L			L	S		L			L	S		L			L	S1				L	L	S	L	L	S	L	L	S	L	L	S	L	L			
14			L		S1				L		L	L		L	L			L	S		L			L	S		L			L	S1				L	L	S	L	L	S	L	L	S	L	L	S	L	L			
18					S1			S								S1	P		S	P	L				S			S1			S1			S1			S			S			S			S					
28					S1			S			S1			S			S			S			S			S			S			S			S			S			S			S			S				

Legenda:

	zelen list
	svetlo zelen list
	rumen list
	list je odpadel

Tabela 6: Pojavljanje bolezenskih znamenj pri okuženih **NahG-D2** transformantah krompirja sorte Désirée. INA - 2,6–dikloroizonikotinsko kislino, INA⁻ - netretirana rastlina, r1-r5 – rastlina krompirja, 1s-3s - spodnji z virusom inokulirani listi, dpo - dan po okuževanju z virusom, L – lokalno bolezensko znamenje, S1 – šibko sistemsko bolezensko znamenje, S – močnejše sistemsko bolezensko znamenje, P – inokulirani pobrani list.

dpo	NahG-D2																																			
	INA-															0,3 mM INA									1 mM INA											
	r1			r2			r3			r4			r5			r1			r2			r3			r4			r5								
	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s						
5										L	L	L																								
6					L	L	L	L	L	L	L	L	L																							
7	P	L	L	P	L	L	P	L	L	P	L	L	L	L		P			P	L	L	P	L	L	P			L	L		P			P		
8		L	L		L	L		L	L		L	L	L	L						L	L		L	L				L	L		L	L				
12		S			S			S1		S	L	L	L	L			L	L		S1			S					S1				L			L	
13		S			S			S		S			S1	L		S1	L	L		S			S					S			S1			S1		L
14		S			S			S		S			S	L		S1	L	L		S			S					S			S1			S1		L
18		S			S			S		S			S			S	P			S			S					S			S			S		
28		S			S			S		S			S			S				S			S					S			S			S		

Legenda:









	zelen list
	svetlo zelen list
	rumen list
	list je odpadel

Tabela 7: Pojavljanje bolezenskih znamenj pri okuženih **NahG-A** transformantah krompirja sorte Désirée. INA - 2,6-dikloroizonikotinsko kislino, INA⁻ - netretirana rastlina, r1-r5 – rastlina krompirja, 1s-3s - spodnji z virusom inokulirani listi, dpo - dan po okuževanju z virusom, L – lokalno bolezensko znamenje, S1 – šibko sistemsko bolezensko znamenje, S – močnejše sistemsko bolezensko znamenje, P – inokulirani pobrani list.

dpo	NahG-A																																			
	INA-															0,3 mM INA									1 mM INA											
	r1			r2			r3			r4			r5			r1			r2			r3			r4			r5								
	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s	1s	2s	3s			
5	L						L	L	L										L																	
6	L	L	L				L	L	L	L	L	L	L			L			L	L																
7	P	L	L	P	L		P	L	L	P	L	L	L	L	L	P	L	L	P			P	L		P			P			P			P		
8		L	L		L	L			L		L	L	L	L	L			L		L						L			L	L		L	L			
12	S			S			S			S					L		L	L	S1				L	L				L	L		S1	L		S1		
13	S			S			S			S			S1	L		S1	L		S			S1	L					S1	L		S1			S1		
14	S			S			S			S			S1	L		S1	L		S			S1	L					S1			S1	L		S1		
18	S			S			S			S			S	P		S	P		S			S			S			S			S			S		
28	S			S			S			S			S			S			S			S			S			S			S			S		

Legenda:

	zelen list
	svetlo zelen list
	rumen list
	list je odpadel

4.1.2. Gomolji in koreninski sistem

Na koncu poskusa (13. maj 2008) smo prešteli gomolje in stekali koreninski sistem.

Tabela 8: Število gomoljev in masa korenin rastlin sorte **Igor** 60 dpo. Prikazani so rezultati slepo okuženih rastlin (kontrola) in rastlin okuženih s PVY^{NTN}. Rezultati predstavljajo povprečje (\pm SD) analiz 5 rastlin. Signifikantnost ($p < 0,05$) med pari rastlin je označena z črkami: a – neokužena vs. okužena, b – neokužena netretirana vs. neokužena tretirana.

	št. gomoljev	masa gomolja (g)	Skupna masa gomoljev (g)	masa korenin (g)
kontrola, INA ⁻	1,5 \pm 0,55	3,7 \pm 1,51	22,4	1,9 \pm 0,13 ^b
kontrola, 0,3 mM INA	1,4 \pm 0,89	3,0 \pm 1,68	21,2	1,0 \pm 0,32
kontrola, 1 mM INA	1,4 \pm 0,5	3,5 \pm 1,92	24,6	1,0 \pm 0,06 ^{ab}
PVY, INA ⁻	1,6 \pm 0,89	2,4 \pm 1,34	19,3	1,4 \pm 0,24
PVY, 0,3 mM INA	1,6 \pm 0,55	2,5 \pm 1,17	20,4	1,1 \pm 0,10
PVY, 1 mM INA	1,4 \pm 0,89	3,3 \pm 1,81	22,9	0,7 \pm 0,07 ^a

Tabela 9: Število gomoljev in masa korenin rastlin sorte **Dèsirée**, transformanta **NahG-D2** 60 dpo. Prikazani so rezultati slepo okuženih rastlin (kontrola) in rastlin okuženih s PVY^{NTN}. Rezultati predstavljajo povprečje (\pm SD) analiz 5 rastlin. Signifikantnost ($p < 0,05$) med pari rastlin je označena z črkami: a – neokužena vs. okužena, b – neokužena netretirana vs. neokužena tretirana, c – okužena netretirana vs okužena tretirana, d - okužena tretirana z 0,3 mM INA vs okužena tretirana s 1 mM INA.

	št. gomoljev	masa gomolja (g)	Skupna masa gomoljev (g)	masa korenin (g)
kontrola, INA ⁻	3,6 \pm 0,55 ^{abc}	3,0 \pm 1,99	50,6	3,7 \pm 0,38 ^b
kontrola, 0,3 mM INA	1,8 \pm 0,84 ^b	4,0 \pm 2,74	35,7	0,8 \pm 0,03
kontrola, 1 mM INA	2,0 \pm 0,71 ^{bc}	3,6 \pm 1,59	35,8	0,5 \pm 0,15 ^b
PVY, INA ⁻	1,2 \pm 0,45 ^a	3,2 \pm 1,94	19,0	2,7 \pm 0,13 ^c
PVY, 0,3 mM INA	1,4 \pm 0,55 ^d	3,1 \pm 2,09	21,7	0,5 \pm 0,24 ^c
PVY, 1 mM INA	2,25 \pm 0,50 ^d	2,1 \pm 1,75	19,2	0,4 \pm 0,06 ^c

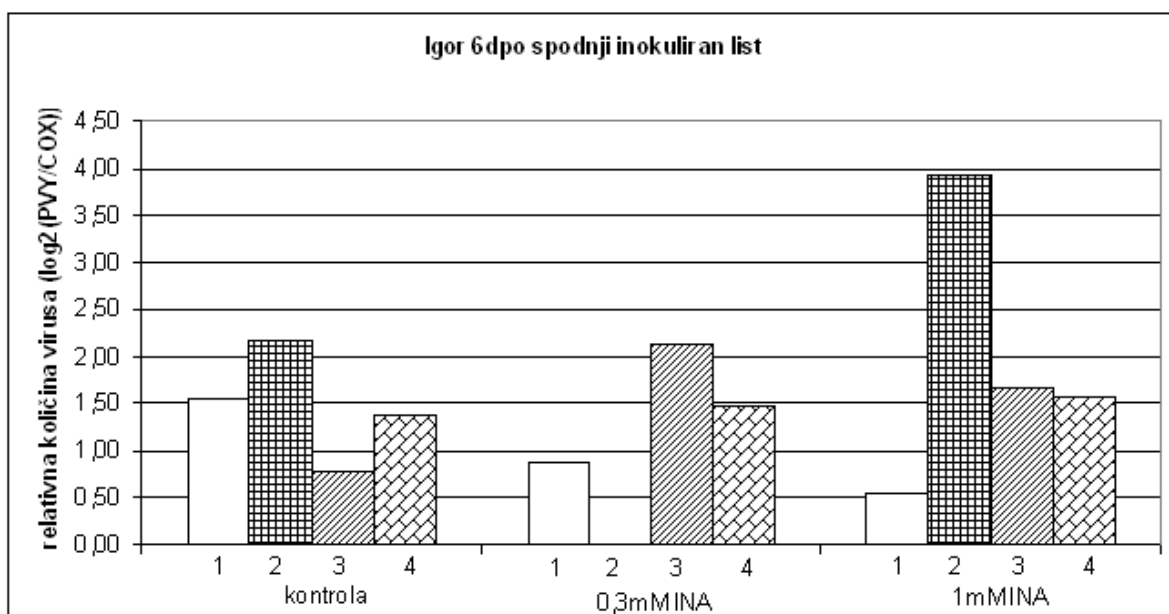
Tabela 10: Število gomoljev in masa korenin rastlin sorte **Dèsirée**, transformanta **NahG-A** 60 dpo. Prikazani so rezultati slepo okuženih rastlin (kontrola) in rastlin okuženih s PVY^{NTN}. Rezultati predstavljajo povprečje (\pm SD) analiz 5 rastlin. Signifikantnost ($p < 0,05$) med pari rastlin je označena z črkami: a – neokužena netretirana vs. neokužena tretirana, b – okužena netretirana vs okužena tretirana.

	št. gomoljev	masa gomolja (g)	Skupna masa gomoljev (g)	masa korenin (g)
kontrola, INA ⁻	2,0 \pm 1,22	2,8 \pm 2,06	28,1	2,0 \pm 0,20 ^a
kontrola, 0,3 mM INA	1,8 \pm 0,84	2,5 \pm 1,17	21,3	1,3 \pm 0,05
kontrola, 1 mM INA	2,3 \pm 0,52	1,9 \pm 0,98	26,6	0,8 \pm 0,22 ^a
PVY, INA ⁻	1,2 \pm 1,10	1,6 \pm 1,30	9,3	2,0 \pm 0,29 ^b
PVY, 0,3 mM INA	1,4 \pm 0,55	2,7 \pm 1,52	19,1	0,8 \pm 0,27 ^b
PVY, 1 mM INA	2,2 \pm 0,00	1,5 \pm 0,86	20,0	1,4 \pm 0,62

4.2. RAZMNOŽEVANJE IN ŠIRJENJE VIRUSA PO RASTLINI

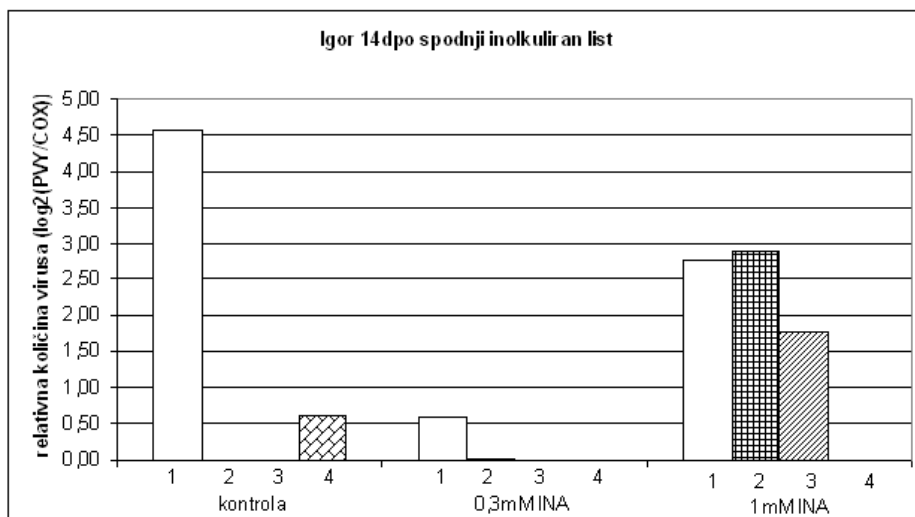
Razmnoževanje in širjenje virusa po rastlini smo spremljali z metodo Q-PCR v dveh korakih. Zanimalo nas je kolikšna je količina virusa v inokuliranih listih 6 dpo, ko so se pojavila prva lokalna bolezenska znamenja in pa kakšna je količina virusa v zgornjih neinokuliranih listih 14 dpo, ko so se pojavila sistemskabolezenska znamenja. 14 dpo smo preverili tudi, kakšna je količina virusov v spodnjih inokuliranih listih, ki so bili še na rastlini. Vrednosti na slikah so normalizirane na COX ampikon (grobi podatki so v prilogi 3) in obdelane z absolutno kvantifikacijo. Analizirali smo liste štirih rastlin.

6 dpo smo v vseh okuženih rastlinah sorte Igor zaznali virus v inokuliranih listih (slika 14). Le v 2. rastlini, ki smo jo tretirali z 0,3 mM INA, je bilo virusa tako zelo malo, da so bile dobljene vrednosti izven meje kvantifikacije in jih zato nismo mogli upoštevati. Količina virusa je bila tako v tretiranih kot netretiranih rastlinah bolj ali manj enaka.



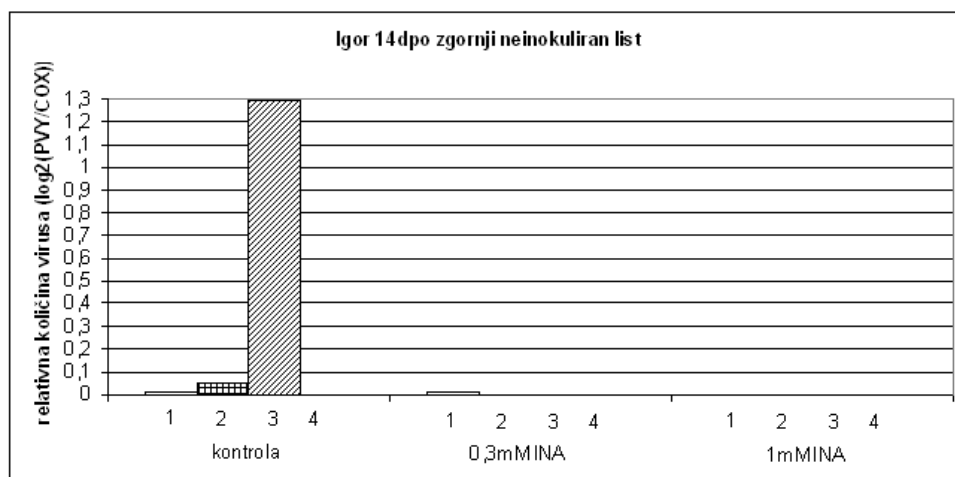
Slika 14: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v inokuliranem listu krompirja sorte Igor okuženem s PVY^{NTN}, 6 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo tretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če je bila dobljena vrednost izven meje kvantifikacije.

14 dpo so na naslednjih okuženih rastlinah sorte Igor spodnji inokulirani listi odpadli: 2. in 3. netretirani rastlini, na 3. in 4. rastlini tretirani z 0,3 mM INA ter na 4. rastlini tretirani z 1 mM INA. V njih tako nismo mogli določiti količine virusa. Količina virusa je bila le v eni netretirani rastlini višja kot v ostalih tretiranih (slika 15).



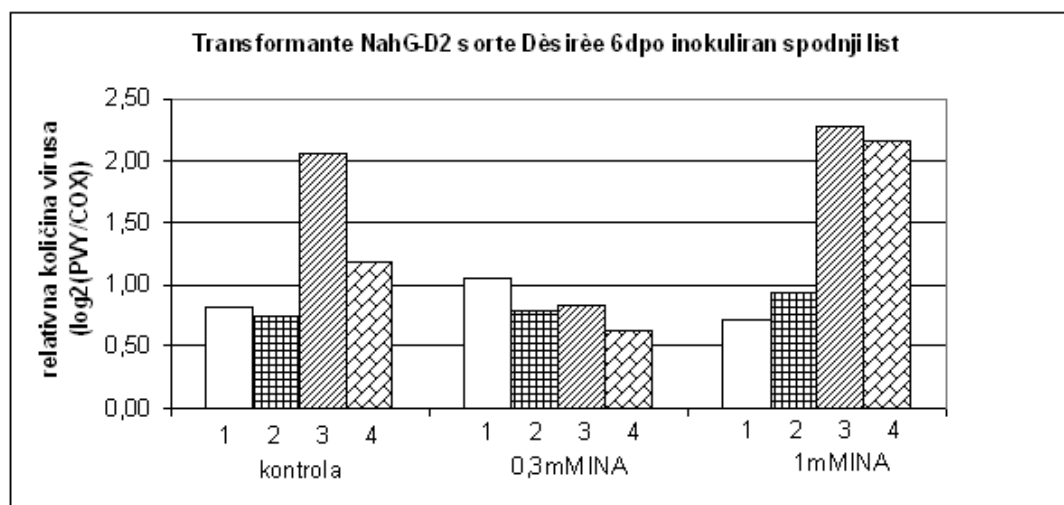
Slika 15: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v inokuliranem listu krompirja sorte Igor okuženem s PVY^{NTN}, 14 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo tretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če so listi odpadli pred 14 dpo.

14 dpo smo v zgornjih neinokuliranih listih okuženih rastlin sorte Igor virus zaznali v 4. netretirani rastlini, 2. in 3. rastlini tretirani z 0,3 mM INA ter 1. in 2. rastlini tretirani z 1 mM INA, vendar so bili rezultati izven meje kvantifikacije (slika 16). V ostalih primerih (4. rastlina tretirana z 0,3mM INA ter 3. in 4. rastlina tretirana z 1 mM INA), pa virusa sploh nismo zaznali. Nekaj več virusa smo zaznali le v zgornjem neinokuliranem listu 3. rastline, ki je nismo tretirali z INA.



Slika 16: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v neinokuliranem listu krompirja sorte Igor okuženem s PVY^{NTN}, 14 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo tretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če je bila dobljena vrednost izven meje kvantifikacije ali pa če virusa sploh nismo zaznali.

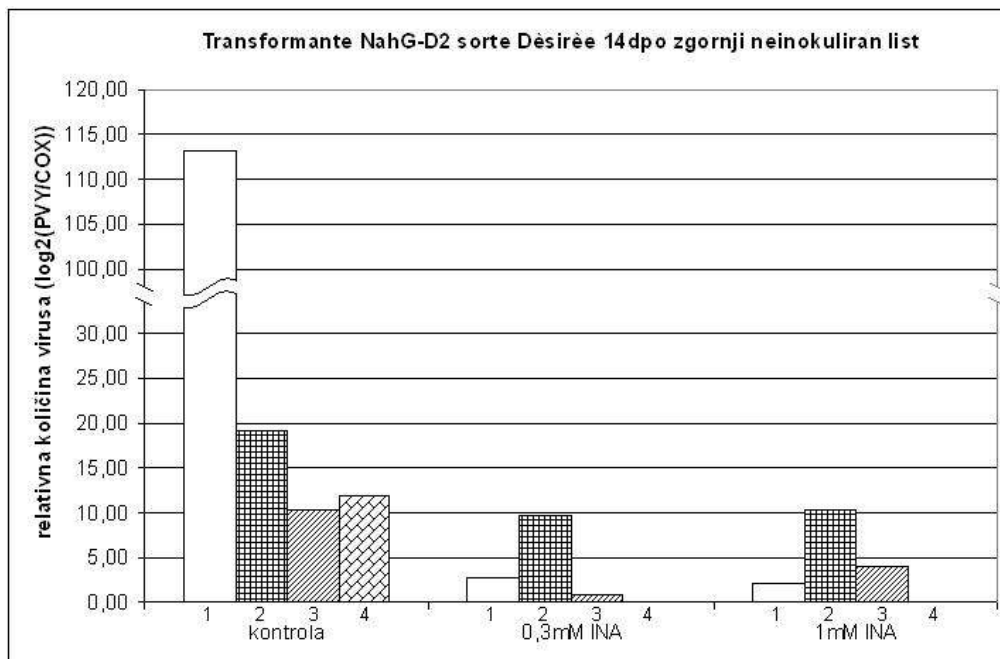
V vseh inokuliranih listih okuženih NahG-D2 transformant sorte Dèsirèe smo 6 dpo zaznali virus (slika 17). Količina virusa se med tretiranimi in netretiranimi rastlinami ni bistveno razlikovala.



Slika 17: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v inokuliranem listu NahG-D2 transformante krompirja sorte Dèsirèe okužen s PVY^{NTN}, 6 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo tretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA.

14 dpo so vsi inokulirani listi na NahG-D2 transformantah krompirja sorte Dèsirèe odpadli, razen na 1. rastlini tretirani z 0,3 mM INA je bil še spodnji inokuliran list, v katerem je bilo virusa tako malo, da so bile dobljene vrednosti izven meje kvantifikacije.

V vseh pobranih zgornjih neinokuliranih listih NahG-D2 transformant sorte Dèsirèe smo 14 dpo virus zaznali (slika 18). V povprečju je bila zaznana količina virusa v netretiranih rastlinah višja kot pa v tretiranih. Nenavadno veliko virusa smo zaznali v 1. netretirani rastlini. Medtem ko je bila količina virusa v rastlinah tretiranih z 0,3 mM ter 1 mM INA približno enaka. V 4. rastlini tretirani z 0,3 mM INA ter v 4. rastlini tretirani z 1 mM INA je bila količina virusa tako majhna, da vrednosti graf ni zajel. Količina virusa je bila v zgornjih neinokuliranih listih NahG-D2 transformant sorte Dèsirèe približno 10 krat večja kot pa v inokuliranih (slika 17 in 18).



Slika 18: Posamezen stolpec predstavlja količino virusa v neinokuliranem listu NahG-D2 transformante krompirja sorte Dèsirèe okužen s PVY^{NTN}, 14 dpo. Liste smo pobrali štirim rastlinam, ki so označene s številkami. Kontrola - rastline krompirja, ki jih nismo tretirali z INA; 0,3 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 0,3 mM INA; 1 mM INA - rastline krompirja, ki smo jih tretirali z 1 mM INA. Podatek za posamezno rastlino manjka, če je bila dobljena vrednost izven meje kvantifikacije.

5. RAZPRAVA

5.1. POJAVLJANJE BOLEZENSKIH ZNAMENJ

Pri rastlinah krompirja sorte Igor okuženih z virusom PVY^{NTN} so se prva lokalna bolezenska znamenja pojavila pri rastlinah tretiranih z INA, in sicer 6 dpo, medtem ko so se pri netretiranih bolj izrazito pojavili dan kasneje (tabela 5). Pri tretiranih rastlinah so bila prva lokalna bolezenska znamenja bolj prisotna na rastlinah tretiranih z 1 mM INA. Na slednjih rastlinah so se prej pojavila tudi sistemska bolezenska znamenja. Razlike v rumenjenju in odpadanju listov pa so bile med tretiranimi in netretiranimi rastlinami sorte Igor manjše. Tako pri tretiranih kot netretiranih rastlinah so listi začeli približno isti čas odpadati, medtem ko so malo prej začeli rumeneti listi netretiranih rastlin. Na podlagi opazovanih bolezenskih znamenj bi lahko sklepali, da pri netransformiranih rastlinah sorte Igor, ki imajo lastno SA, aplikacija analoga SA ni vplivala na zakasnitev pojavljanja bolezenskih znamenj, ampak so se na tretiranih rastlinah pojavili še prej. Tudi sistemska bolezenska znamenja so se pri tretiranih rastlinah pojavila hitreje kot pa pri netretiranih. Predhodnje analize so pokazale, da je endogeni nivo SA v rastlinah krompirja sorte Igor velik in da se ta v okuženih rastlinah z virusom PVY^{NTN} poveča dan po okuževanju oziroma še bolj značilno takrat, ko se pojavijo sistemska bolezenska znamenja. V nasprotju s tem je v rezistentni sorti Sante, ki ne kaže bolezenskih znamenj, proste SA in njenih konjugatov manj (Krečič – Stres in sod., 2005). Zaradi dodatne aplikacije analoga SA se je verjetno v rastlinah akumulirala supraoptimalna koncentracija te substance, ki je povzročila, da so rastline razvile močnejša bolezenska znamenja.

Pri obeh klonih NahG transformant krompirjeve sorte Désirée okuženih z virusom PVY^{NTN} so se prva lokalna bolezenska znamenja pojavili na netretiranih rastlinah 5 dpo (tabela 5 in 6). Tako pri NahG-A kot pri NahG-D2 transformantah so rastline, ki jih nismo tretirali z INA dobile prej bolezenska znamenja in začele prej rumeneti (že 5 dpo). Pri NahG-A transformantah so se naslednji dan pojavili prva lokalna bolezenska znamenja tudi na rastlinah tretiranih z 0,3 mM INA in dan kasneje na tistih tretiranih z 1 mM INA, medtem ko so se pri NahG-D2 transformantah lokalna bolezenska znamenja pojavljala na tretiranih rastlinah dan kasneje kot pri prejšnjem klonu, t.j. 7 dpo na tretiranih z 0,3 mM INA in 8 dpo na tretiranih z 1 mM INA. 12 dpo so se tako na netretiranih kot tretiranih rastlinah pojavila prva sistemska bolezenska znamenja. Pri NahG-D2 transformantah so bila ta pri netretiranih rastlinah močnejša kot pa pri tretiranih. Najšibkejša so bila na rastlinah tretiranih z 1 mM INA. Pri netretiranih NahG-A transformantah so bila sistemska bolezenska znamenja na vseh rastlinah zelo izrazita. Na tretiranih rastlinah z 0,3 mM INA so se pojavila le na eni rastlini v šibki obliki, a so bila naslednji dan (13 dpo) prisotna že na štirih od petih rastlin. Na tretiranih rastlinah z 1 mM INA pa so se zelo šibka sistemska bolezenska znamenja pojavila na treh od petih rastlin.

Prezelj (2008) pri svojem diplomskem delu na divjem tipu krompirja sorte Désirée ni opazila ne lokalnih in ne sistemskih bolezenskih znamenj, medtem ko so se kot v našem primeru na NahG transformantah iste krompirjeve sorte lokalna bolezenska znamenja pojavila na isti dan (5 dpo), sistemska pa malo prej (10 dpo) kot v našem primeru. Vendar pa je z uporabo metode Q-PCR zaznala razmnoževanje virusa v inokuliranih listih divjega tipa sorte Désirée med 4 in 5 dpo, v zgornjih neinokuliranih listih pa pri dveh rastlinah 7

dpo oziroma ravno tako pri dveh rastlinah 9 dpo (Prezelj, 2008). Na podlagi naštetih rezultatov bi lahko sklepali, da pri rastlinah, ki niso sposobne sintetizirati lastne SA, aplikacija analoga SA vpliva na zamik pojavljanja bolezenskih znamenj. Torej lahko sklepamo, da ima SA vlogo pri obrambi rastline pred virusom PVY^{NTN}.

Iz opazovanja pojavljanja bolezenskih znamenj smo tudi ugotovili, da se NahG transformante sorte Désirée, ki smo jih tretirali z INA počasneje starajo kot pa netretirane rastline. Razlike v staranju so opazne tudi med rastlinami tretiranimi z 0,3 mM in 1 mM INA. Pri NahG-A transformantah, ki jih nismo tretirali z INA so prvi listi začeli rumeneti že 5 dpo, na tretiranih z 0,3 mM INA 6 dpo, na tretiranih z 1 mM INA pa šele 8 dpo. Tudi na netretiranih NahG-D2 transformantah so listi rumeneli 5 dpo, medtem ko so tako na tretiranih z 0,3 mM kot z 1 mM INA začeli rumeneti 8 dpo, s tem da so rumeneli listi le na eni rastlini tretirani z 1 mM INA. Tudi drugi so že opazili, da je SA vpletena v razvoj senescence. Morris in sod. (2000) so na NahG in NPR mutantah ugotovili, da SA – signalna pot vpliva na ekspresijo genov med razvojem senescence, in sicer je bila pri teh mutantah senescenca upočasnjena (Morris in sod., 2000). Še bolj natančno sta Robatzek in Somssich pokazala, da SA vpliva na ekspresijo WRKY faktorjev, ki vplivajo na potek senescence listov (Robatzek in Somssich, 2002).

Tudi pri neokuženih rastlinah smo opazili, da so razlike v rumenju listov med tretiranimi in netretiranimi rastlinami. Pri neokuženih netretiranih transformantah sorte Désirée so slepo inokulirani listi začeli rumeneti prej kot pa pri tretiranih, in sicer pri netretiranih so začeli rumeneti 5 dpo, pri tretiranih z 0,3 mM INA 6 dpo pri NahG-A in 8 dpo pri NahG-D2 transformantah, pri tretiranih z 1 mM INA pa 8 dpo pri obeh transformantah. Pri netretirani neokuženih rastlinah sorte Igor je 12 dpo rumenel prvi slepo inokuliran list, ki je že naslednji dan odpadel. Na ostalih rastlinah slepo inokulirani listi sploh niso rumeneli. Do 28 dpo ko so vsi odpadli. Predvidevamo, da so začeli rumeneti med 18 in 28 dpo, ko jih nismo opazovali. Tako kot pri netretiranih neokuženih rastlinah sorte Igor je tudi pri tretiranih z 0,3 mM INA začel rumeneti prvi slepo inokuliran list 12 dpo, rumenenja ostalih listov pa nismo sledili. Vsi slepo inokulirani listi pa so odpadli do 28 dpo. Pri neokuženih rastlinah sorte Igor tretirani z 1 mM INA so prvi listi začeli rumeneti 12 dpo. Na eni rastlini je prvi slepo inokuliran list odpadel na ta dan. Vsi slepo inokulirani listi pa so odpadli do 18 dpo. Staranje je bilo lahko pri sorti Igor upočasnjeno, ker so te rastline imele poleg eksogene še lastno SA, ki je proces upočasnila. Vendar pa ne smemo pozabiti, da imamo dve različni sorti, ki je ne moremo kar tako med sabo primerjati.

Opazili smo tudi, da se bolezenska znamenja, ki so posledica okužbe z virusom PVY^{NTN}, med sorto Igor in transformanto Désirée NahG razlikujejo (slika 6, 9 in 10). Pri sorti Igor so se pojavila lokalna bolezenska znamenja najprej v obliki zelo majhnih črnih točkastih nekroz, ki so kasneje postale večje, medtem ko so bila pri NahG transformantah krompirja sorte Désirée v obliki črnih in rjavo-sivih točkastih nekroz ter zelenih lis. Inokulirani listi so pri sorti Igor začeli kasneje rumeneti in so značilno rumeneli bolj okoli nekroz. Pri transformantah krompirja sorte Désirée pa je list kmalu zatem, ko je razvil prva bolezenska znamenja oziroma istočasno s pojavom le teh začel rumenet. Za bolezenska znamenja na transformantah krompirja sorte Désirée je bilo značilno, da so bile nekroze večje in jih je bilo manj kot pa pri sorti Igor, pri kateri se je na inokuliranih listih pojavilo več manjših nekroz. Zanimivo je tudi to, da so imele rastline sorte Igor, ki jih nismo tretirali z INA

manj nekroz kot pa tretirane (slika 6). Netretirane transformante krompirja sorte Désirée pa so imele večje lezije kot tretirane. Sistemska bolezenska znamenja so bila na NahG transformantah krompirja sorte Désirée v obliki nekroz, ki so se pojavljale predvsem ob listnih žilah, nekaj pa jih je bilo tudi na ostalem delu listne ploskve (slika 10 in 13). Neinkulirani listi transformant so tudi bolj mozaično rumeneli. Na listih krompirja sorte Igor pa so se sistemska bolezenska znamenja najprej pojavila v obliki zelo majhnih črnih nekroz (slika 7), list je kasneje začel tudi rumenet. Opazovana bolezenska znamenja, ki so se razvila pri sorti Igor, se niso razlikovala od opisanih v literaturi (Kus, 1994).

5.2. GOMOLJI IN KORENINSKI SISTEM

Ob koncu poskusa (t.j. približno 3 mesece po tem, ko smo rastline iz gojišča prenesli v zemljo) smo vsem krompirjevim rastlinam vključenim v poskus pobrali gomolje in pregledali koreninski sistem (tabela 7-9).

Okužba krompirjevih rastlin z virusom PVY^{NTN} je večinoma vplivala na zmanjšanje števila in skupno maso gomoljev pri vseh netretiranih rastlinah vključenih v poskus, kar smo tudi pričakovali. Pri rastlinah sorte Igor je okužba vplivala tako na zmanjšanje skupne in povprečno mase gomoljev (tabela 7). Najbolj opazna razlika v zmanjšanju je bila vidna pri NahG transformantah krompirja sorte Désirée. Okužene NahG-D2 transformante so imele trikrat manjše število gomoljev, skupna masa gomoljev pa je bila skoraj trikrat manjša kot pri neokuženih (tabela 8). Manjše število gomoljev pri okuženih NahG-D2 transformantah v primerja vi z neokuženimi je bilo signifikantno različno. Okužene NahG-A transformante pa so imele približno dvakrat manjše število gomoljev in trikrat manjšo skupno maso gomoljev kot pa neokužene, tudi povprečna masa gomolja je bila manjša pri okuženih v primerjavi z neokuženimi (tabela 9).

Pri z virusom PVY^{NTN} okuženih rastlinah sorte Igor je bila razlika v številu gomoljev med tretiranimi in netretiranimi rastlinami manj opazna (tabela 7) kot pri NahG transformantah. Se je pa skupna masa gomoljev in povprečna masa gomolja pri okuženih rastlin sorte Igor povečevala z večanjem koncentracije INA. Še vedno pa so imele neokužene rastline več gomoljev kot okužene. Torej je tretiranje z INA pri rastlinah sorte Igor, ki proizvajajo že lastno SA, nekoliko vplivala na izboljšanje pridelka.

Pri NahG transformantah je bila razlika med netretiranimi in tretiranimi okuženimi rastlinami bolj opazna (tabela 8 in 9). Pri obeh klonih se je število gomoljev z večanjem koncentracije INA povečevalo in je bilo pri okuženih rastlinah tretiranih z 1 mM INA skoraj enkrat večje kot pri netretiranih. Statistična analiza je pokazala signifikantno različnost teh podatkov za NahG-D2 transformante. Se je pa povprečna masa gomolja z večanjem koncentracije INA manjšala. Tudi skupna masa gomoljev se je po tretiranju z INA povečevala, pri NahG-A klonu z večanjem koncentracije INA, medtem ko je bila masa gomoljev pri NahG-D2 večja pri tretiranih z 0,3 mM kot pa z 1 mM INA. Prezelj (2008) je v svojem diplomskem delu opazila, da je število gomoljev pri neokuženih rastlinah divjega tipa sorte Désirée dvakrat manjše kot pa pri NahG-D2 transformantah iste vrste. Tudi skupna masa gomoljev transformant je bila večja kot pa pri divjem tipu te vrste (Prezelj, 2008). Ti rezultati tako kot naši nakazujejo na to, da mogoče pomanjkanje SA vpliva na razvoj večjega števila gomoljev.

Iz teh rezultatov bi lahko sklepali, da okužba krompirja z virusom PVY^{NTN} zmanjša pridelek krompirja. Tretiranje okuženih rastlin z INA pa le delno prepreči škodo, ki jo je povzročil virus, saj je bila skupna masa in število gomoljev pri okuženih tretiranih rastlinah večja kot pri okuženih netretiranih, a še vedno manjša kot pri neokuženih. Lahko bi rekli, da SA neugodno vpliva na razvoj gomoljev, vendar ugodno v primeru okužbe krompirjevih rastlin z virusom PVY^{NTN}. Za razliko od naših rezultatov so Koda in sod. (1992) ugotovili, da koncentracije SA višje od 10^{-5} M sprožijo tvorbo gomoljev pri krompirju v *in vitro* pogojih. Seveda pa je bila izmerjena aktivnost SA v primerjavi z aktivnostjo jasmonske kisline, ki se smatra kot naravni spodbujevalec tvorbe gomoljev, tisočkrat manjša (Koda in sod., 1992).

Bolezenskih znamenj na gomoljih krompirja nismo zasledili pri nobeni rastlini sorte Igor niti pri transformantah sorte Désirée. Bolezenska znamenja se ponavadi razvijejo kasneje po izkopu (Kus, 1994).

Okužba krompirja z virusom PVY^{NTN} neugodno vpliva tudi na koreninski sistem, saj je pri neokuženih rastlinah večji kot pri okuženih. Pri neokuženih rastlinah opazimo, da se koreninski sistem z večanjem koncentracije INA manjša. Od tega odstopa le masa korenin transformante NahG-A tretirane z 1 mM INA, ki imajo večji koreninski sistem kot tretirane rastline z 0,3 mM INA, a še vedno manjši kot netretirane. Ti rezultati kažejo na to, da imajo tako okužene kot neokužene rastline z manj SA bolj razvit koreninski sistem. V neobajevljenih raziskavah na kulturi nodijev sorte Igor, so ugotovili, da nizka koncentracija SA (0,001 mM) spodbuja rast korenin, medtem ko jo 1 mM koncentracija zavira, saj nodiji do 18. dne v tkivni kulturi niso razvili nobene koreninice. Nekatere raziskovalne skupine so tudi za zelo nizke koncentracije SA na soji za koncentracijo 10^{-8} M in na *Tagetes erecta* za koncentracijo do 10^{-10} M dokazale, da ta ugodno vpliva na tvorbo korenin (dolžina in gostota korenin) (Hayat in sod., 1997b).

5.3. KOLIČINA VIRUSA V RASTLINI

Za spremljanje količine virusa v rastlini smo poleg preproste metode opazovanje simptomov uporabili tudi bolj specifično molekularno metodo Q-PCR v dveh korakih.

6 dpo smo v vseh listih rastlin, ki so imeli prisotna bolezenska znamenja po pričakovanjih zaznali virus, saj so simptomi posledica delovanja virusa. Z Q-PCR smo dokazali tudi sistemsko širjenje virusa po rastlini. Vendar pa so se zaznane količine virusa med enako tretiranimi rastlinami bile zelo različne.

Količina virusa v inokuliranih listih rastlin sorte Igor pobranih 6 in 14 dpo se ni signifikatno spreminjala med netretiranimi in tretiranimi rastlinami z analogom SA (slika 14 - 15), v bistvu je zelo nihala. Zato na podlagi rezultatov pridobljenih z Q-PCR ne moremo sklepati, da je INA vplivala na virus v rastlini.

Količina virusa, ki smo jo zaznali v zgornjih neinokuliranih listih rastlin sorte Igor pobranih 14 dpo, pa je bila malenkost večja pri netretiranih rastlinah kot pa pri tistih, ki smo jih tretirali z INA. Slednji rezultati kažejo na to, da je INA vplivala na količino virusa v rastlini. Za bolj relevantne rezultate bi morali v poskus vključiti več rastlin. Količino

virusa v zgornjih neinokuliranih listih smo določali 14 dpo, zato je lahko manjša količina virusa v tretiranih rastlinah posledica, delne razgradnje virusne RNK, saj so listi začeli že rumeneti in starati. Dobljeni rezultati z metodod Q-PCR niso kolerirali z opazovanimi bolezenskimi znamenji. Ta so bila močnejši pri tretiranih rastlinah, v katerih smo zaznali manj virusa. Mogoče je večja koncentracija SA povzročila, da so rastline sorte Igor reagirale na okužbo z močnejšimi bolezenskimi znamenji, ki so lahko negativno vplivali na virus.

V inokuliranih listih NahG-D2 transformantah sorte Dèsirèe pobranih 6 dpo nismo zaznali razlike v količini virusa med tretiranimi in netretiranimi rastlinami (slika 17). Pričakovali bi, da se je virus lahko bolj neovirano razmnoževal v netretiranih NahG rastlinah. Že več kot deset let nazaj so namreč dokazali, da so rastline z vstavljenim NahG genom za salicilat hidrosilazo, ki ne morejo akumulirati SA, bolj občutljive na virulenten mikroorganizem (Gaffney in sod., 1993). Vendar pa smo v dveh rastlinah, ki smo jih tretirali z 1 mM INA zaznali več virusa v spodnjih inokuliranih listih 6 dpo kot pa v netretiranih. Na podlagi teh rezultatov bi lahko sklepamo, da analog SA ni vplival na virus v inokuliranih listih. Vendar pa je Prezelj (2008) v svoji diplomski nalogi ugotovila, da se virus PVY^{NTN} začne v inokuliranih listih NahG transformant sorte Dèsirèe razmnoževati med 5 in 7 dpo. Kar pomeni, da smo lahko mi v naši časovni točki, okoli katere se virus ravno začne pomnoževati, določili tudi virus, ki smo ga na liste nanegli. Da bi lahko bolj natančno ugotovila kaj se z virusom dogaja v inokuliranih listih netretiranih oziroma tretiranih rastlin, bi morali imeti več časovnih točk. Tako kot pri rastlinah sorte Igor se dobljeni rezultati z metodo Q-PCR niso skladali z opazovanimi bolezenskimi znamenji. To nas ne preseneča, saj je že Prezelj je v svojem diplomskem delu opazila, da se bolezenska znamenja na rastlinah sorte Dèsirèe, ki so posledica okužbe z virusom PVY^{NTN}, ne skladajo z rezultati dobljenimi z metodo Q-PCR. Na okuženih netransformiranih rastlinah sorte Dèsirèe se bolezenska znamenja sploh niso pojavila, medtem ko so z Q-PCR virus tako v inokuliranih kot zgornjih neinokuliranih listih zaznali (Prezelj, 2008). Neskladje med zaznanimi količinami virusa z DAS - ELISO in opazovanimi bolezenskimi znamenji so opazili tudi v predhodni študiji na sorti Dèsirèe, saj so lahko virus PVY^{NTN} s to metodo zaznali v listih pred pojavom bolezenskih znamenj (Mehle in sod., 2004).

Količina virusa, ki smo jo zaznali v zgornjih neinokuliranih listih NahG-D2 transformant sorte Dèsirèe pobranih 14 dpo je bila v povprečju večja pri netretiranih kot tretiranih rastlinah (slika 18). V enem primeru je bila celo desetkrat večja, vendar je ta rezultat nenavadno odstopal od ostalih. Med tretiranimi rastlinami z 0,3 mM in 1 mM INA pa v količini virusa ni bilo opaznih razlik. Tudi opazovana sistemska bolezenska znamenja so bila 14 dpo močnejši pri netretiranih kot pa pri tretiranih rastlinah. Očitno je pri NahG-D2 transformantah sorte Dèsirèe aplikacija analoga SA vplivala na upočasnitev sistemskega širjenja virusa po rastlini ali pa je vplivala na zmanjšanje pomnoževanja virusa v neinokuliranih listih. Predhodne raziskovalne skupine so že dokazale, da lahko SA moti podvajanje in sistemske gibanje virusa, in sicer na rastlinah tobaka okuženih z TMV virusom in pa krompirjevim virusom X (Murphy in sod., 1999). Opazili smo tudi, da je bila zaznana količina virusa v zgornjih neinokuliranih listih NahG-D2 transformant sorte Dèsirèe pobranih 14 dpo tudi do petkrat večja kot pa v inokuliranih listih pobranih 6 dpo (slika 17). Torej se je virus kljub tretiranju rastlin z INA širil v višje predele rastline in namnožil.

Iz dobljenih rezultatov z metodo Q-PCR smo tudi opazili, da se je virus bolj razmnoževal v neinokuliranih listih NahG-D2 transformantah sorte Dèsirèe kot pa pri rastlinah sorte Igor (slika 16 in 18). Tudi predhodna raziskovalna skupina je ugotovila, da se virus PVY^{NTN} hitreje razmnoževal v zmerno občutljivem divjem tipu krompirja sorte Dèsirèe kot pa v občutljivi sorti Igor (Mehle in sod., 2004). Količina virusa, ki smo jo zaznali v zgornjih neinokuliranih listih rastlin sorte Igor, je bila predvsem pri rastlinah tretiranih z 0,3 mM in 1 mM INA tako majhna, da so bile vrednosti že izven meje kvantifikacije. Mogoče je dodana eksogena SA skupaj z endogeno vplivala na količino virusa. Sta pa to dve različni sorti, zato obstaja velika verjetnost, da je na širjenje in razmnoževanje virusa vplivala katera druga komponenta. Kovač in sod. (2009) so dokazali, da je za zgodnji lokalni (1 - 3 ure po okužbi), ne pa za sistemski obrambni odgovor rastline pred okužbo krompirja z virusom PVY^{NTN}, pomembna JA. Mogoče je SA, na kar kažejo tudi naši rezultati, v zgodnjem odgovoru manj pomembna. Ima pa večjo vlogo pri sistemski obrambi pred okužbo z virusom PVY^{NTN}. Čeprav je predhodna raziskovalna skupina z merjenjem endogene količine SA v rastlinah krompirja sorte Igor okuženega z virusom PVY^{NTN} ugotovila, da se je dan po inokulaciji nivo proste SA signifikantno povešal v primerjavi z neokuženimi rastlinami. 5 dpo, ko so se pojavila prva lokalna bolezenska znamenja, pa niso zaznali nobene signifikantne spremembe v nivoju SA v inokuliranih listih. Najvišji nivo SA so zaznali 11 dpo ob pojavu sistemskih bolezenskih znamenj v neinokuliranih listih okužene rastline. Slednji dvig razlagajo kot možna posledica dviga nivoja fenolnih substanc, ki ga je povzročil stres zaradi virusne okužbe (Krečič-Stress in sod., 2005).

6. SKLEPI

Ugotovili smo, da okužba rastlin sorte Igor in NahG transformant sorte Dèsirèe z virusom PVY^{NTN} vpliva na število in skupno mase gomoljev ter na koreninski sistem rastlin. Tretiranje okuženih rastlin z analogom SA pa je večinoma pozitivno vplival na pridelek krompirja z večanjem koncentracije SA.

Pri rastlinah sorte Igor je tretiranje z analogom SA vplivalo na zgodnejše pojavljanje tako lokalnih kot sistemskih bolezenskih znamenj, medtem je bila koncentracija virusa PVY^{NTN} v povprečju enaka v inokuliranih listih netretiranih in z INA tretiranih rastlinah. V zgornjih neinokuliranih listih pa je bila količina virusa večja v netretiranih kot pa v tretiranih rastlinah, kar bi bila lahko posledica dodanega analoga SA.

Pri NahG transformantah sorte Dèsirèe, so se tako lokalna kot sistemska bolezenska znamenja pojavili hitreje in bolj intenzivno pri netretiranih kot pa z INA tretiranih rastlinah. Izmerjena količina virusa PVY^{NTN} v inokuliranih listih je bila med tretiranimi in netretiranimi rastlinami v povprečju enaka. Medtem ko je bila količina virusa v zgornjih neinokuliranih listih malo večja pri netretiranih kot pa pri tretiranih rastlinah.

Tako iz rezultatov pridobljenih na rastlinah sorte Igor kot na NahG transformantah sorte Dèsirèe, bi lahko sklepali, da dodatna aplikacija SA vpliva na virus PVY^{NTN}, kar smo predvsem zaznali v zgornjih neinokuliranih listih. Sklepali bi lahko, da dodan analog SA zavira sistemsko širjenje virusa po rastlini oziroma da upočasnjuje pomnoževanje virusa v zgornjih neinokuliranih listih. Lahko bi pa tudi sklepali, da ima SA večjo vlogo pri sistemski obrambi pred okužbo z virusom PVY^{NTN} kot pa v zgodnjem odgovoru.

Naši rezultati kažejo na to, da ima SA vlogo pri obrambi rastlin krompirja pred virusom PVY^{NTN}. Vendar pa so poti obrambe kompleksne in vanje so vključene tudi druge komponente poleg SA. V nadaljne raziskave, ki bi nam omogočile natančnejše in lažje sklepanje, bi morali vključiti več časovnih točk in netransformirane rastline sorte Dèsirèe. Potrebovali bi tudi več rastlin, saj so bile razlike med posameznimi rastlinami iste sorte, ki smo jih gojili v enakih pogojih in tretirali z INA na enak način, predvsem pri pridobivanju podatkov z molekularno metodo Q-PCR, zelo velike.

7. LITERATURA

1. Agrios G.N. 2005. Parasitism and disease development. V: Plant pathology 4th edition, London, Academic Press: 72-104
2. Bustamante P.I., Hull R. 1998. Plant virus gene expression strategies, Electronic Journal of Biotechnology, 1. 2, 15. avg. 1998: Dostopno na: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34581998000200003&script=sci_arttext
3. Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective, Journal of Molecular Endocrinology, 34:597-601
4. Cunha L., McFall A.J., Mackey D. 2006. Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. Microbes and Infection 8, 5: 1372-1381
5. Cohn J., Sessa G., Martin G.B. 2001. Innate immunity in plants, Current Opinion in Immunology, 13, 1:55–621
6. Coquoz J.L., Buchala A.J., Métraux J.P., 1998, The Biosynthesis of Salicylic acid in Potato Plants, Plant Physiology, 117, 3: 1095-1101.
7. Coquoz J.L., Buchala A.J., Meuwly P., Métraux J.P. 1995. Arachidonic Acid Induced Local but not Systemic Synthesis of Salicylic Acid and Confers Resistance in Potato Plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*, Biochemistry and Cell Biology, 85, 10: 1219-1224
8. Cunha L., McFall A.J., Mackey D., 2006, Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses, Microbes and Infection, 8: 1372-1381
9. Dangl J.L., Jones J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection, Nature, 411: 826-833
10. Delaney T.P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T, Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E., Ryals J. 1994. A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance, Science, 266: 1247-1250
11. Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 18: 547–575.
12. Dong X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants, Current Opinion in Plant Biology, 1:316-323
13. Durner J., Shah J., Klessig D.F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants, Trends in Plant Science, 2, 7:266-274
14. Edreva A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research Progress in the last 15 years, Gen. Appl. Plant Physiology, 31, 1-2:105-124

15. Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. 1993. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance, *Science*, 261, 5122: 754-756
16. Gene network on plant interaction with pathogen organisms. 2006. GeneNetWorks™. <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/papers/goryachkovsky/plant-trrd/pathogen1.htm> (28. okt. 2008)
17. Goldbach R., Bucher E., Prins M. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview, *Virus Research*, 92, 2: 207-212
18. Halim V.A., Eschen-Lippold L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., Rosahl S. 2007. Salicylic Acid Is Important for Basal Defense of *Solanum tuberosum* Against *Phytophthora infestans*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 11: 1346-1352
19. Halim V.A., Vess A., Scheel D., Rosahl S. 2006. The Role of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Pathogen Defence, *Plant Biology*, 8, 3: 307-313
20. aHayat S., Ali B., Ahmad A. 2007. Salicylic acid: Biosynthesis, Metabolism and Physiological Role in Plants. V: Salicylic Acid – A Plant Hormone, Hayat S. in Ahmad A. (ur.): 1–14
21. bLarqué-Saavedra A., Martín-Mex R. 1997. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. V: Salicylic Acid – A Plant Hormone, Hayat S. in Ahmad A. (ur.): 15-23
22. Hinrichs J., Berger S., Shaw J.G. 1998, A hypersensitive response – like mechanism is involved in resistance of potato virus Y and tobacco etch virus. *Journal General Virology*; 79:167-176
23. Jameson P.E., Clarke S.F. 2002. Hormone–Virus Interactions in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 3: 205–228
24. Jones J.D.G. 1996. Plant disease resistance gene: structure, function and evolution, *Current Opinion in Biotechnology*, 7:155-160
25. Koda Y., Takahashi K., Kikuta Y. 1992. Potato tuber-inducing activities of salicylic acid and related compounds, *Journal of Plant Growth Regulation*, 11, 4: 215-219
26. Kovač M., Müller A., Milovanović Jarh D., Milavec M., Döchting P., Ravnikar M. 2009. Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonate signalling in the early defence of potato to potato virus Y^{NTN}, *Biologia Plantarum*, 53, 1: 195-199
27. Krečič-Stres H., Vučak C., Ravnikar M., Kovač M. 2005. Systemic Potato virus Y^{NTN} infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes, *Plant Pathology*, 54, 4: 441-447

28. Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 107-115
29. Klessig D.F., Malamy J. 1994. The salicylic acid signal in plants, *Plant Molecular Biology*, 26: 1439-1458
30. Lee H.I., Leon J., Raskin I. 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10: 4076-4079
31. LeRomancer M., Nedellec M., 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ring disease (PTNRD). *Plant Pathology* 46, 1: 104–111
32. Mauch-Mani B., Métraux J.P. 1998. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack, *Annals of Botany*, 82: 535-540
33. Maule A., Leh V., Lederer C. 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions, *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 4: 279-284
34. McDowell J.M., Dangl J.L. 2000. Signal transduction in the plant immune response, *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 2: 79-82
35. Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe – Novak M., Baebler Š., Krečič – Stres H., Gruden K., Ravnikar M. 2004. Spread of potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity, *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 64: 293-300
36. Métraux J.P., 2002. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis, *Trends in Plant Science*, 7, 8: 332-334
37. Morris K., Mackerness S.A.H., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Wollaston V.B. 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence, *The Plant Journal*, 23, 5: 677-685
38. Murphy A.M., Chivasa S., Singh D.P. Carr J.P. 1999. Salicylic acid - induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways?, *Trends in Plant Science*, 4, 4: 155-160
39. Murphy A.M., Gilliland A., Wong C.E., West J., Singh D.P., Carr J.P. 2001. Signal transduction in resistance to plant viruses, *European Journal of Plant Pathology*, 107, : 121–128
40. Navarre D.A., Mayo D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potati, *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 64, 4: 179-188
41. Nolan T., Hands E., Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, *Nature Protocols*, 1, 3: 1559-1582

42. Oostendrop M., Kunz W., Dietrich B., Staub T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals, *European Journal of Plant Pathology*, 107, 1: 19-28
43. Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR, *Nucleic Acid Research*, 29, 9: 2002-2007
44. Pfaffl M.W. 2004. Relative quantification. V: Real – time PCR. Dorak T. (editor). New York, International University Line, New: 63-82
45. Pieterse C.M.J., Wees S.C.M., Hoffland E., Pelt J.A., Loon L.C. 1996, Systemic Resistance in Arabidopsis Induced by Biocontrol Bacteria Is Independent of Salicylic Acid Accumulation and Pathogenesis-Related Gene Expression, *The Plant Cell*, 8, 8: 1225-1237
46. Prezelj N., 2008, Vpliv obrambnih mehanizmov krompirja na razmnoževanje in širjenja virusa PVY^{NTN} po rastlini, diplomsko delo, Ljubljana, FKKT, program Biokemija, 45
47. Raskin I., 1992. Salicylate, A New Plant Hormone, *Plant Physiology*. 99, 3: 799-803
48. Robatzek S., Somssich I.E., 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense, *Genes and development*, 16: 1139-1149
49. Ryals J.A, Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y, Hunt D.M. 1996. Systemic Acquired Resistance, *The Plant Cell*, 8, 10: 1809-1819
50. Schell D. 1996. Resistance response physiology and signal transduction, *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 305-310
51. Shah J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 4: 365-371
52. Shirasu K., Dixont R.A., Lamb C. 1996. Signal transduction in plant immunity, *Current Opinion in Immunology*, 8, 1:3-7
53. Singh R.P., Valkonen P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones5 R.A.C., Schubert J. 2008. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato, *Archives of virology*, 153: 1-13
54. Soosaar J.L.M., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. 2005. Mechanisms of Plant Resistance to Viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 10: 789-798
55. Staswick P.E., Davies P.J. 1995. Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, Kluwer Academic Publisher, Netherlands

56. Taiz L., Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*, 3rd edition. Sunderland, Sinauer Associates, Inc.: 690 str.
57. Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions, *Virus Research*, 74, 1-2: 157–175
58. Wong M.L, Medrano J.F. 2005. Real-time PCR form RNA quantitation, *BioTechniques*, 39, 1: 75-85
59. Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR, *Adv. Physiol. Educ.*, 29: 151-159
60. Van der Biezen E.A., Jones J.D. 1998. Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 12: 454–456
61. Vernooij B., Friedrich L., Morse A., Reist R., Kolditz-Jawhar R., Ward E., Uknes S., Kessmann H., Ryals J. 1994. Salicylic Acid is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but is Required in Signal Transduction, *The Plant Cell*, 6, 7: 959-965.
62. Yang Y., Shah J., Klessig D.F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses, *Genes and development*, 11, 13: 1621-1639
63. Yu D., Fan B., Klessig D.F., Chen Z. 1997. Is the High Basal Level of Salicylic Acid Important for Disease Resistance in Potato?, *Plant Physiology*, 115: 343-349

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorici prof. dr. Maji Ravnikar, ker mi je omogočila opravljanje diplomskega dela ter za pregled naloge.

Dr. Maji Kovač se najlepše zahvaljujem za praktične nasvete pri opazovanju sprememb na okuženih rastlina ter za vzpodbudo, izčrpno pomoč in nasvete pri pisanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se dr. Kristini Gruden za nasvete in pomoč pri spoznavanju molekularne metode Q-PCR ter za odgovore na vsa moja vprašanja.

Zahvalo dolgujem še Katji Stare in Nini Prezelj, ki sta me uvedli v laboratorijsko delo in mi bili na voljo za moja vprašanja ter Neži Turnšek, ki me je spoznala z laboratorijskim delom Q-PCR metode.

Najlepša hvala tudi vsem iz oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo ter drugim, ki so mi na kakršenkoli način pomagali pri izdelavi diplomskega dela.

Hvala staršem, ki so mi vedno stali ob strani in me spodbujali v času mojega šolanja.

In seveda Marku za njegovo potrpežljivost, vzpodbudo in oporo.

PRILOGE

Priloga 1: Seznam pobranih listov pri z virusom PVY^{NTN} okuženih rastlinah krompirja sorte Igor ter NahG-D2 in NahG-A transformantah sorte Désirée 6 dan po okuževanju, ko so se pojavili prvi lokalni simptomi. r1-r4 – rastline krompirja, INA⁻ - netretirane rastline, INA - 2,6-dikloroizonikotinsko kislino, 1s – prvi spodnji z virusom inokuliran list.

	Igor			NahG-D2			NahG-A		
	INA ⁻	0,3 mM INA	1 mM INA	INA ⁻	0,3 mM INA	1 mM INA	INA ⁻	0,3 mM INA	1 mM INA
r1	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s
r2	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s
r3	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s
r4	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s	1s

Priloga 2: Seznam pobranih listov pri z virusom PVY^{NTN} okuženih rastlinah krompirja sorte Igor ter NahG-D2 in NahG-A transformantah sorte Désirée 14 dan po okuževanju, ko so se pojavili sistemski simptomi. r1-r4 – rastline krompirja, INA⁻ - netretirane rastline, INA - 2,6-dikloroizonikotinsko kislino, 1s - 3s–spodnji z virusom inokuliran list, 1z - 4z – zgornji z virusom neinokulirani listi.

	Igor			NahG-D2			NahG-A		
	INA ⁻	0,3 mM INA	1 mM INA	INA ⁻	0,3 mM INA	1 mM INA	INA ⁻	0,3 mM INA	1 mM INA
r1	3s, 2z	3s, 2z	2s, 2z	4z	2s, 2z	2z	3z	3s, 2z	2z
r2	2z	2s, 2z	2s, 2z	2z	2z	2z	1z	3s, 2z	3s, 2z
r3	2z	2z	3s, 2z	2z	2z	2z	2z	3z	2z
r4	3s, 2z	2z	2z	3z	2z	2z	4z	3s, 2z	2z

Priloga 3: Grobi podatki Q-PCR. S – spodnji inokuliran list, Z – zgornji neinokuliran list, dpo – dan po okuževanju, 1 - 4 rastlina, 100X – 100 krat redčeno, 1000X – 1000 krat redčeno, Undetermined – nismo zaznali pomnožene tarčne molekule, INA - 2,6-dikloroizonikotinsko kislino, z modro so označene vrednosti, ki so izven meje kvantifikacije.

vzorec	Ct - COX	Ct - PVY
Igor S 6 dpo PVY_1_100X	24,076466	23,476252
Igor S 6 dpo PVY_1_100X	24,133049	23,605286
Igor S 6 dpo PVY_1_1000X	27,530201	26,809095
Igor S 6 dpo PVY_1_1000X	27,532593	26,913801
Igor S 6 dpo PVY_2_100X	25,739382	24,363178
Igor S 6 dpo PVY_2_100X	25,45334	24,507648
Igor S 6 dpo PVY_2_1000X	28,875006	27,844479
Igor S 6 dpo PVY_2_1000X	29,145142	27,938322
Igor S 6 dpo PVY_3_100X	25,840755	26,310083
Igor S 6 dpo PVY_3_100X	25,963242	26,170427
Igor S 6 dpo PVY_3_1000X	29,4658	29,958307
Igor S 6 dpo PVY_3_1000X	29,201624	29,6484
Igor S 6 dpo PVY_4_100X	24,92406	24,527435
Igor S 6 dpo PVY_4_100X	24,941416	24,470306
Igor S 6 dpo PVY_4_1000X	28,334728	27,799988
Igor S 6 dpo PVY_4_1000X	28,40957	27,95116
Igor S 14 dpo PVY_1_100X	22,786512	20,760038
Igor S 14 dpo PVY_1_100X	22,979185	20,863174
Igor S 14 dpo PVY_1_1000X	26,566032	24,245556
Igor S 14 dpo PVY_1_1000X	26,600084	24,141142

vzorec	Ct - COX	Ct - PVY
Igor Z 14 dpo PVY_1_100X	23,539024	30,22129
Igor Z 14 dpo PVY_1_100X	23,516762	30,470404
Igor Z 14 dpo PVY_1_1000X	26,945734	34,01318
Igor Z 14 dpo PVY_1_1000X	26,9426	33,790943
Igor Z 14 dpo PVY_2_100X	23,224697	28,331465
Igor Z 14 dpo PVY_2_100X	23,434723	28,186522
Igor Z 14 dpo PVY_2_1000X	26,867252	31,240194
Igor Z 14 dpo PVY_2_1000X	26,81757	31,17315
Igor Z 14 dpo PVY_3_100X	22,623539	22,30817
Igor Z 14 dpo PVY_3_100X	22,73854	22,662058
Igor Z 14 dpo PVY_3_1000X	26,525026	25,930483
Igor Z 14 dpo PVY_3_1000X	26,22795	25,860104
Igor S 14 dpo PVY_4_100X	22,584982	23,497736
Igor S 14 dpo PVY_4_100X	22,676035	23,33459
Igor S 14 dpo PVY_4_1000X	25,943087	26,543306
Igor S 14 dpo PVY_4_1000X	25,962748	26,767523
Igor Z 14 dpo PVY_4_100X	23,449308	35,10114
Igor Z 14 dpo PVY_4_100X	23,123747	34,94412
Igor Z 14 dpo PVY_4_1000X	26,713562	Undetermined
Igor Z 14 dpo PVY_4_1000X	26,732943	37,63787
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	25,64799	25,818604
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	25,609764	25,853163
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	29,033712	29,403378
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	29,197336	29,263813
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	24,382462	33,359932
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	24,298271	33,45462
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	27,897333	36,734993
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	27,72257	36,91188
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	26,315294	25,633276
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	26,131159	25,141182
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	29,64486	28,206858
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	29,698652	28,51395
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	25,441536	24,702324
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	25,514921	24,743746
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	28,988626	28,379484
Igor S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	28,634119	28,507832
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	22,81133	25,525965
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM I NA_1_100X	22,752058	23,625145
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	26,179995	27,034868
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	26,207628	27,017042
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	22,571793	28,849089
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	22,034126	28,812252
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	26,072458	32,356686
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	26,08104	32,165775
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	24,44731	30,580547
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	24,50097	30,628967

vzorec	Ct - COX	Ct - PVY
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	28,000498	34,596817
Igor S 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	27,945791	35,284065
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	22,186588	33,14053
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	22,043806	32,96948
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	25,909185	36,95557
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	25,895607	36,68308
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	22,243795	32,646667
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	22,188246	32,120193
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	25,97852	36,183247
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	25,846434	36,574886
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	23,264006	Undetermined
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	23,125023	38,67276
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	27,154903	Undetermined
Igor Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	26,971287	Undetermined
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_1_100X	25,042385	25,980715
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_1_100X	25,04283	25,848766
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_1_1000X	28,158772	29,258617
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_1_1000X	28,323753	29,195675
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_2_100X	26,803278	24,65642
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_2_100X	26,793747	24,639786
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_2_1000X	30,327991	28,425375
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_2_1000X	30,299006	28,421904
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_3_100X	26,147644	25,352638
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_3_100X	26,071566	25,358631
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_3_1000X	29,574375	28,957615
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_3_1000X	29,585354	28,732029
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_4_100X	25,783855	25,219833
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_4_100X	25,721224	25,091618
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_4_1000X	29,236298	28,506456
Igor S 6 dpo PVY 1mM INA_4_1000X	29,152899	28,500574
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_1_100X	24,734219	23,5297
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_1_100X	24,893713	23,572323
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_1_1000X	28,60627	26,981419
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_1_1000X	28,471111	26,69341
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_1_100X	21,942364	36,823513
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_1_100X	22,174791	37,289787
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_1_1000X	25,960964	Undetermined
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_1_1000X	26,054295	Undetermined
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_2_100X	23,066156	21,367882
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_2_100X	23,404778	21,434956
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_2_1000X	26,927574	24,92227
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_2_1000X	26,905823	24,936565
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_2_100X	21,829456	30,558195
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_2_100X	21,973125	30,58033
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_2_1000X	25,65337	34,402412
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_2_1000X	25,802961	34,369007

vzorec	Ct - COX	Ct - PVY
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_3_100X	24,447378	23,457575
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_3_100X	24,64867	23,527977
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_3_1000X	28,52306	27,006294
Igor S 14dpo PVY 1mM INA_3_1000X	28,230934	27,167732
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_3_100X	22,602245	Undetermined
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_3_100X	22,443583	37,548935
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_3_1000X	25,871758	Undetermined
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_3_1000X	26,036777	Undetermined
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_4_100X	24,005344	Undetermined
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_4_100X	24,001364	Undetermined
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_4_1000X	27,665047	Undetermined
Igor Z 14dpo PVY 1mM INA_4_1000X	27,617376	Undetermined
NahG-D2 S 6 dpo PVY_1_100X	25,481358	25,976093
NahG-D2 S 6 dpo PVY_1_100X	25,952766	26,04352
NahG-D2 S 6 dpo PVY_1_1000X	29,384085	29,30458
NahG-D2 S 6 dpo PVY_1_1000X	29,456896	29,706873
NahG-D2 S 6 dpo PVY_2_100X	27,028328	27,501827
NahG-D2 S 6 dpo PVY_2_100X	27,046606	27,565067
NahG-D2 S 6 dpo PVY_2_1000X	30,550678	30,801376
NahG-D2 S 6 dpo PVY_2_1000X	30,894363	31,0175
NahG-D2 S 6 dpo PVY_3_100X	25,525965	24,464668
NahG-D2 S 6 dpo PVY_3_100X	25,604298	24,505257
NahG-D2 S 6 dpo PVY_3_1000X	29,373135	27,983427
NahG-D2 S 6 dpo PVY_3_1000X	29,27369	27,957977
NahG-D2 S 6 dpo PVY_4_100X	26,586437	26,173018
NahG-D2 S 6 dpo PVY_4_100X	26,45232	26,235477
NahG-D2 S 6 dpo PVY_4_1000X	30,185799	29,75724
NahG-D2 S 6 dpo PVY_4_1000X	30,016588	29,596703
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_1_100X	25,411074	18,164537
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_1_100X	25,416155	18,186052
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_1_1000X	28,862387	21,327652
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_1_1000X	28,99445	21,338928
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_2_100X	24,526426	19,869377
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_2_100X	24,526497	19,839779
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_2_1000X	28,017956	23,197048
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_2_1000X	28,017443	23,159521
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_3_100X	27,701286	23,939201
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_3_100X	27,688185	23,973364
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_3_1000X	31,045694	27,234896
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_3_1000X	31,365608	27,262758
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_4_100X	25,85782	21,934887
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_4_100X	25,656734	21,929419
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_4_1000X	29,883337	25,62808
NahG-D2 Z 14 dpo PVY_4_1000X	29,831556	25,642406
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	25,304607	25,249685
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	25,458796	25,34555

vzorec	Ct - COX	Ct - PVY
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	29,200441	28,860895
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	29,095194	28,803802
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	25,287298	25,786005
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	25,533674	25,7153
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	29,166967	29,488466
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	29,115835	29,142368
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	24,960047	25,273254
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	25,164585	25,214895
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	28,800894	29,052378
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	28,96378	28,96465
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	26,76181	27,39988
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	26,769112	27,53315
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	30,32394	30,789013
NahG-D2 S 6 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	30,265884	30,690136
NahG-D2 S 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	25,40192	31,782936
NahG-D2 S 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	25,428995	31,209291
NahG-D2 S 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	28,854832	36,20384
NahG-D2 S 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	29,032991	35,282677
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	24,5664	22,892275
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_100X	24,529263	22,919476
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	28,045471	26,092577
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_1_1000X	27,994835	26,155283
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	24,693941	20,94426
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_100X	24,556679	20,885656
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	28,266747	24,64727
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_2_1000X	28,371813	24,496958
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	22,73891	22,864939
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_100X	22,765926	22,859467
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	26,529943	26,523413
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_3_1000X	26,66456	26,549221
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	23,00705	27,766336
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_100X	23,034525	27,856657
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	26,600515	31,454485
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 0'3mM INA_4_1000X	26,605946	31,470343
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_1_100X	26,17068	26,34161
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_1_100X	26,10778	27,041227
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_1_1000X	29,68364	30,049324
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_1_1000X	29,718485	29,872854
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_2_100X	27,69772	27,601473
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_2_100X	27,740686	27,721102
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_2_1000X	31,093935	31,334583
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_2_1000X	31,217373	31,020426
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_3_100X	26,522045	25,04269
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_3_100X	26,638117	25,05564
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_3_1000X	29,945229	28,392733
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_3_1000X	29,92037	28,290304

vzorec	Ct - COX	Ct - PVY
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_4_100X	26,203007	24,735638
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_4_100X	26,208645	24,763916
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_4_1000X	29,738508	28,242489
NahG-D2 S 6 dpo PVY 1mM INA_4_1000X	29,782558	28,257862
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_1_100X	21,919718	20,498356
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_1_100X	22,023476	20,495565
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_1_1000X	25,681267	24,068716
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_1_1000X	25,564287	24,06371
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_2_100X	22,382694	18,389189
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_2_100X	22,337507	18,489618
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_2_1000X	26,058916	22,042046
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_2_1000X	26,003828	22,071123
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_3_100X	23,567387	20,982677
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_3_100X	23,496984	21,08904
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_3_1000X	26,987465	24,426897
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_3_1000X	26,592533	24,354685
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_4_100X	22,95589	27,660803
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_4_100X	22,920723	27,758818
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_4_1000X	26,463175	31,31026
NahG-D2 Z 14 dpo PVY 1mM INA_4_1000X	26,48146	31,673752