

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janja LAMOVŠEK

**UČINEK MEDSEBOJNEGA VPLIVA OGORČICE
Meloidogyne ethiopica IN BAKTERIJE *Agrobacterium*
tumefaciens NA GOSTITELJSKE RASTLINE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janja LAMOVŠEK

**UČINEK MEDSEBOJNEGA VPLIVA OGORČICE *Meloidogyne
ethiopica* IN BAKTERIJE *Agrobacterium tumefaciens* NA
GOSTITELJSKE RASTLINE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INTERACTION BETWEEN *Meloidogyne ethiopica* NEMATODE AND
Agrobacterium tumefaciens BACTERIA ON HOST PLANTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Delo sem v celoti opravila na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univeze z dne 21.09.2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje agronomija. Za mentorja je bil imenovan doc. dr. Gregor Urek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Nina Kacjan Maršić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Mario Lešnik
Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

Član: doc. dr. Žiga Laznik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: december 2015

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Janja Lamovšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 632.23:632.651:632.35:577.2(043.3)
KG	rak koreninskega vratu/paradižnik/recA/antagonizem/lončni poskus/RT-qPCR/ sistemski odziv/s patogenezo povezan protein 1
AV	LAMOVŠEK, Janja, univ. dipl. mikrobiol.
SA	UREK, Gregor (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje agronomije
LI	2015
IN	UČINEK MEDSEBOJNEGA VPLIVA OGORČICE <i>Meloidogyne ethiopica</i> IN BAKTERIJE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NA GOSTITELJSKE RASTLINE
TD	Doktorska disertacija
OP	XV, 137, [6] str., 24 pregl., 32 sl., 3 pril., 358 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pojavnost raka koreninskega vratu (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) se že dolgo povezuje z dejavnostjo ogorčic koreninskih šišek (<i>Meloidogyne</i> spp.) na koreninah gostiteljskih rastlin. V nalogi predstavljamo rezultate pregledne študije o raznolikosti talnih izolatov bakterije <i>A. tumefaciens</i> biovar 1 s kmetijskih površin ter rezultate študije o medsebojnem odnosu med <i>M. ethiopica</i> in patogenim sevom <i>A. tumefaciens</i> 06-424-7 na koreninah paradižnika. Oba organizma na koreninah povzročata zadebelitve v obliki gal in tumorjev, ki omejujejo pretok hranil in ob napredovanju bolezni do propada rastline. Na kmetijskih površinah po Sloveniji smo potrdili vsesplošno prisotnost nepatogenih agrobakterij v tleh. Z nadaljnjo karakterizacijo na podlagi nukleinskega zaporedja gena za rekombinazo <i>recA</i> smo seve uvrstili v genomski vrsti <i>A. tumefaciens</i> G1 (62 %) in G4 (38 %). Iz lončnih poskusov smo ugotovili, da ogorčica poveča težo tumorjev na paradižniku, če je bakterija prisotna ob koreninah v času povečanega vstopanja ličink <i>M. ethiopica</i>. Ugotovili smo tudi, da prisotnost <i>A. tumefaciens</i> deluje antagonistično na razmnoževanje ogorčice. V obravnavanju, kjer smo <i>A. tumefaciens</i> dodali dva dni pred ogorčicami, smo zabeležili 2,4-krat manjšo populacijo ogorčice ($p < 0,001$) 45 dpi. S tehniko ločenih korenin in uporabo RT-qPCR (SYBR Green I) smo dokazali, da bakterija <i>A. tumefaciens</i> C58 sproži v rastlini obrambni odgovor, ki je najverjetneje posledica aktivacije obrambne poti salicilne kisline. Na ločenih koreninah smo dokazali povečano izražanje gena PR-1, ki je markerski gen poti salicilne kisline (SA). Sočasno smo ugotovili, da so bili kljub aktivaciji poti SA aktivirani tudi geni iz antagonistične poti JA. Ugotovili smo, da ne moremo na podlagi odziva na posamezne patogene predvideti odziv rastline na kombinacije patogenov. Predvidevamo, da na izbiro obrambne poti odločilno vpliva zaporedje okužb.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
UDC 632.23:632.651:632.35:577.2(043.3)
CX crown gall/tomato/recA/antagonism/pot trial/RT-qPCR/systemic response/
pathogenesis-related protein 1
AU LAMOVŠEK, Janja
AA UREK, Gregor (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral
Programme in Biosciences, Field: Agronomy
PY 2015
TI INTERACTION BETWEEN *Meloidogyne ethiopica* NEMATODE AND
Agrobacterium tumefaciens BACTERIA ON HOST PLANTS
DT Doctoral Dissertation
NO XV, 137, [6] p., 24 tab., 32 fig., 3 ann., 358 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The incidence of crown gall disease (*Agrobacterium tumefaciens*) has been associated with root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) activity on host roots for a long time. The study presents results from research on *A. tumefaciens* biovar 1 diversity in Slovenian agricultural soils, and results from the interaction study between *M. ethiopica* and pathogenic strain *A. tumefaciens* 06-424-7 on tomato roots. Both organisms form knot-like structures on host roots that impair nutrient flow through the plant leading to decay of the plant. We confirmed the widespreadness of non-pathogenic agrobacteria in agricultural soils of Slovenia. We further classified them to G1 (62 %) and G4 (38 %) genomic species of *A. tumefaciens* biovar 1 complex group. Pot trial designed for interaction studies showed that the nematode *M. ethiopica* increased tumour weight tumour growth on tomato roots, but only if the agrobacteria are present at the time of massive juvenile penetration into the roots. On the other hand, the agrobacteria antagonise *M. ethiopica* reproduction on tomato roots. When agrobacteria were inoculated 2 days prior to the nematodes, the population of *M. ethiopica* was 2,4-times lower after 45 dpi ($p < 0,001$). We used a split-root technique and RT-qPCR method (SYBR Green I) to prove that *A. tumefaciens* C58 elicits a plant defence response that most likely results in salicylic acid (SA) pathway activation. On split roots we observed an increase in gene expression of PR-1, a marker gene of SA pathway. Simultaneously, a jasmonic acid (JA)-regulated genes were activated, even though the SA and JA pathway antagonize each other. Based on the results we concluded that we cannot predict the plant defence response on different combinations of plant pathogens based solely on the plant response to an individual pathogen. Moreover, we speculate that sequential pathogen inoculations affect the selection of defence pathway activation in plants.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	3
1.2 CILJ NALOGE IN DOPRINOS K ZNANOSTI	3
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 POMEN V KMETIJSTVU	5
2.1.1 Ogorčice koreninskih šišk (<i>Meloidogyne</i> sp.)	5
2.1.2 Agrobakterije	6
2.2 TAKSONOMSKI PREGLED	7
2.2.1 Rod <i>Meloidogyne</i>	7
2.2.2 Rod <i>Agrobacterium</i>	9
2.3 BIONOMIJA OGORČIC KORENINSKIH ŠIŠK	11
2.4 RAK KORENINSKEGA VRATU	14
2.5 RASTLINSKI OBRAMBNI ODZIV	17
2.5.1 Sistemska obramba v rastlinah	18
2.5.2 Obramba rastline proti agrobakterijam	24
2.5.3 Odziv rastline na ogorčice koreninskih šišk	28
2.6 ODNOSI MED BAKTERIJAMI IN OGORČICAMI KORENINSKIH ŠIŠK	32
3 MATERIALI IN METODE	35
3.1 ŠTUDIJA RAZNOLIKOSTI TALNIH IZOLATOV <i>Agrobacterium tumefaciens</i> S KMETIJSKIH POVRŠIN NA PODLAGI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA <i>recA</i>	35
3.1.1 Vzorčenje tal	35
3.1.2 Izolacija in identifikacija izolatov <i>A. tumefaciens</i>	36
3.1.3 Patogenost sevov <i>A. tumefaciens</i>	37
3.1.4 Pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena <i>recA</i> in njegova analiza	37
3.1.5 Morfologija kolonij na različnih temperaturah gojenja izolatov	38
3.2 TEST <i>IN VITRO</i> NA <i>Arabidopsis thaliana</i>	39

3.2.1	Priprava rastlin	40
3.2.2	Priprava ličink <i>M. ethiopica</i> za test na koreninah <i>A. thaliana in vitro</i>	41
3.2.3	Priprava bakterijske suspenzije <i>A. tumefaciens</i> za <i>in vitro</i> test	42
3.2.4	Vrednotenje poskusa vstopa ličink	42
3.3	LONČNI POSKUSI NA PARADIŽNIKU	42
3.3.1	Priprava sadik paradižnika na poskus	46
3.3.2	Pridobivanje inokuluma <i>Meloidogyne ethiopica</i>	47
3.3.3	Priprava bakterijskih suspenzij	47
3.3.4	Način okuževanja in obravnavanja v lončnem poskusu I	49
3.3.5	Način okuževanja in obravnavanja v lončnem poskusu II	50
3.3.6	Način okuževanja in obravnavanja v lončnem poskusu III	50
3.3.7	Vrednotenje lončnega poskusa	51
3.4	IZLEGANJE LIČINK OGORČIC <i>IN VITRO</i>	52
3.5	METODA IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO METODO RT-PCR V REALNEM ČASU	54
3.5.1	Obravnavanja v poskusu spremljanja systemskega odziva paradižnika	55
3.5.2	Materiali in aparature	55
3.5.3	Izolacija RNA s kitom Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen)	56
3.5.4	Razgradnja genomske DNA	56
3.5.5	Obratno prepisovanje celokupne RNA v DNA	57
3.5.6	Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov	57
3.5.7	Optimizacija in validacija kvantitativne reakcije pomnoževanja DNA v realnem času	57
3.5.8	Analiza diferencialne ekspresije po metodi razširjenega testa Wilcoxon-Mann-Whitney	58
3.5.9	Ovrednotenje stabilnosti izražanja referenčnih genov	60
3.5.10	Inter-reakcijska kalibracija	61
3.6	STATISTIČNE METODE	61
4	REZULTATI	63
4.1	ŠTUDIJA RAZNOLIKOSTI TALNIH IZOLATOV <i>Agrobacterium tumefaciens</i> S KMETIJSKIH POVRŠIN NA PODLAGI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA <i>recA</i>	63
4.1.1	Ugotavljanje prisotnosti izolatov <i>A. tumefaciens</i> v tleh in testiranje patogenosti sevov	63
4.1.2	Raznolikost zaporedja alelov gena <i>recA</i>	63
4.2	VSTOP LIČINK <i>M. ethiopica</i> V KORENINE <i>A. thaliana IN VITRO</i>	67
4.3	LONČNI POSKUSI NA PARADIŽNIKU	70
4.3.1	Vpliv ogorčice in bakterije na rast paradižnika	70
4.3.2	Vpliv prisotnosti bakterije na razmnoževanje <i>M. ethiopica</i>	71
4.3.3	Vpliv ogorčic <i>M. ethiopica</i> na nastanek tumorjev	79

4.4	IZLEGANJE LIČINK OGORČIC <i>IN VITRO</i>	80
4.5	METODA IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO METODO RT-qPCR V REALNEM ČASU	81
4.5.1	Optimizacija in validacija metode qPCR	82
4.5.2	Izražanje biosinteznih genov etilena	83
4.5.3	Vpletenost genov iz signalizacijske poti JA	83
4.5.4	Splošna imunost posredovana s transkripcijskim dejavnikom SIWRKY72	85
4.5.5	Primerjava spremenjenega izražanja genov med obravnavanji N2B1 in C58	85
4.5.6	Izražanje markerskega gena <i>PR-1</i> v sistemsko pridobljeni odpornosti	85
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	88
5.1	RAZPRAVA	88
5.1.1	Raznolikost talnih izolatov <i>A. tumefaciens</i> s kmetijskih površin	88
5.1.2	Test vstopa ličink <i>M. ethiopica</i> v korenine <i>A. thaliana in vitro</i>	90
5.1.3	Izleganje ličink <i>M. ethiopica in vitro</i>	91
5.1.4	Lončni poskusi na testnih rastlinah paradižnika	91
5.1.5	Sistemski odziv paradižnika na hkratno okužbo z agrobakterijami in ogorčicami koreninskih šišk	98
5.2	SKLEPI	104
6	POVZETEK (SUMMARY)	107
6.1	POVZETEK	107
6.2	SUMMARY	109
7	VIRI	112
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematični prikaz življenjskega kroga sedentarnih endoparazitov iz rodu <i>Meloidogyne</i> . (1) Infektivna ličinka J2; (2) orientacija proti vstopnemu mestu tik ob koreninskem vršičku; (3) vstop v korenino; (4) migracija po apoplastu proti koreninskemu vršičku; (5) migracija do primerne mesta prehranjevanja ob vaskularnem cilindru; (6) nastanek prehranjevalnega mesta in sprememba morfolologije ličinke; (7) odrasla samica izlega jajčeca na površino gale; (8) izleganje ličink J2 in pričetek novega razvojnega kroga (Thomas, 2009).	12
Slika 2:	Položaj genov na oktopinskem tipu plazmida Ti.	14
Slika 3:	Shematični prikaz zaporedja v patogenezi <i>Agrobacterium</i> sp..(1) prepoznavanje rastlinskih signalov; (2) aktivacija dvokomponentnega signalnega sistema VirA/G; (3) aktivacija genov virulence in sinteza T-DNA; (4) prenos T-kompleksa preko sekrecijskega sistema tipa IV; (5) prenos T-kompleksa v jedro in (6) vgraditev T-DNA v genom gostitelja (Pitzschke in Hirt, 2010).	15
Slika 4:	Primerjava odziva ISR s SAR. Prenos signala pri ISR v večini primerov poteka po poti jasmonske kisline (JA) in kasneje po poti etilena (ET). Potreben je tudi pozitiven regulator (NPR1), ki se aktivira ob zaenkrat še neznanih signalizacijskih poteh navzdol od poti ET. Temu sledi sprožitveni odziv. To pomeni, da po aktivaciji ISR ni takojšnjega prepisovanja genov, ampak je obrambna sposobnost gostiteljske rastline povečana takoj ob napadu patogena (Chan, 2013).	20
Slika 5:	Shematski prikaz prenosa signala, ki ga sprožijo hormoni SA, JA in ET v <i>Arabidopsis thaliana</i> (KEGG sly04075) (Kanehisa in Goto, 2000; Kanehisa in sod., 2014).	22
Slika 6:	Model odziva rastline na infekcijo z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Veena in sod., 2003). Prvih 12 h po infekciji se aktivira splošni odziv rastline, vendar se le-ta močno utiša po uspešni transformaciji, kateri sledi izražanje bakterijskih genov. Če do transformacije ne pride, se po določenem času splošni odziv rastline zopet poveča.	25
Slika 7.	Model prenosa signalov med <i>Agrobacterium</i> in gostiteljsko rastlino (Yuan in sod., 2008a). Model prikazuje učinek rastlinskih signalov na virulenco bakterije in njeno zaznavanje kvoruma. Puščice nakazujejo aktivacijo in zaključene puščice inhibicijo. Acc – acc operon za razgradnjo opinov; SSA – sukcin semialdehid; T4SS – sekrecijski sistem tipa IV.	27
Slika 8:	Shematični prikaz študije raznolikosti genov <i>recA</i> pri talnih izolatih <i>A. tumefaciens</i> na slovenskih kmetijskih površinah.	35

Slika 9:	Shematični prikaz poteka poskusa vrednotenja vstopa ličink <i>M. ethiopica</i> v korenine <i>A. thaliana</i> ob prisotnosti patogenega seva <i>A. tumefaciens</i> .	39
Slika 10:	Priprava za pridobivanje ličink ogorčic.	41
Slika 11:	Shematični prikaz lončnih poskusov za vrednotenje odnosov med paradižnikom, ogorčico <i>M. ethiopica</i> , bakterijo <i>A. tumefaciens</i> po enem (45 dpi) in drugem (90 dpi) zaključenem razmnoževalnem krogu ogorčice <i>M. ethiopica</i> .	43
Slika 12:	Shematični prikaz poskusa vrednotenja sistemskega odziva paradižnika na okužbo z <i>A. tumefaciens</i> na razmnoževanje ogorčic <i>M. ethiopica</i> na ločeni strani korenin po zaključenem prvem razmnoževalnem krogu ogorčice.	44
Slika 13:	Shematični prikaz poskusa za vrednotenje vpliva bakterij <i>A. tumefaciens</i> na vstop ličink <i>M. ethiopica</i> v korenine paradižnika.	45
Slika 14:	Shematični prikaz poskusa za vrednotenje izražanja izbranih genov paradižnika kot odgovor na okužbo z ogorčicami <i>M. ethiopica</i> in bakterijami <i>A. tumefaciens</i> .	54
Slika 15:	Morfologija kolonij sevov <i>Agrobacterium tumefaciens</i> iz genomske vrste G1 in G4 na 1A gojišču. Kulture smo inkubirali 4 dni pri 27 °C. (A) Oranžnorjava pigmentacija seva 72-3 iz genomske vrste G1. (B) Svetlo vijolična pigmentacija in sluzavost kolonij seva 44-1 iz genomske vrste G4.	64
Slika 16:	Morfologija kolonij med sevi G1 (prikazan sev 11-1) se je razlikovala pri gojenju na 12 oz. 21 °C na gojišču KB. (A) Gladke kolonije pri 12 °C po 1 tednu. (B) Hrapave kolonije pri 21 °C po 4 dneh.	64
Slika 17:	Prikaz tehnike ločenih korenin <i>in vitro</i> za vrednotenje sistemskega odziva rastline <i>A. thaliana</i> ob prisotnosti ličink ogorčic in bakterij na ločenih straneh korenine.	67
Slika 18:	Infektivni ličinki <i>M. ethiopica</i> se pripravljata na vstop v korenine <i>A. thaliana in vitro</i> .	67
Slika 19:	Ustvarjanje mesta prehranjevanja (A) 3 dni in (B) 4 dni po vstopu ličinke <i>M. ethiopica</i> v korenine <i>A. thaliana in vitro</i> .	68
Slika 20:	Tvorba bakterijskega biofilma na koreninah <i>A. thaliana</i> v sistemu <i>in vitro</i> .	69
Slika 21:	Obarvani ličinki <i>M. ethiopica</i> v galah na korenini <i>A. thaliana</i> 3 dpi <i>in vitro</i> . Enota velikosti na sliki predstavlja 500 µm.	69
Slika 22:	Korenine paradižnika Arawak F1 z (A) manjšimi galami po 45-ih dneh in (B) večjimi galami po 90-ih dneh od inokulacije z jajčeci <i>M. ethiopica</i> (obravnavanje N).	73

- Slika 23: Korenine paradižnika Arawak F1 90 dpi v obravnavanjih (A) N1B2 in (B) N2B1. 75
- Slika 24: Razvoj korenin paradižnika po uporabi tehnike ločenih korenin. 76
- Slika 25: Vrednotenje systemskega odziva rastlin paradižnika Arawak F1 na razmnoževanje ogorčic *M.ethiopica* v različnih obravnavanjih z bakterijami: (A) celokupno število gal 45 dpi; (B) celokupno število jajčnih vrečk 45 dpi. 77
- Slika 26: Razvoj tumorja na stebelu paradižnika 10 dni po mehanski inokulaciji seva *A. tumefaciens* 06-424-7. 78
- Slika 27: Pojav tumorjev na koreninah paradižnika okuženega s patogenim sevom *A. tumefaciens* 45 dpi. (A) Razvoj enega večjega tumorja in (B) razvoj treh manjših tumorjev v enakem obravnavanju. 80
- Slika 28: Število izleženih ličink *in vitro* po 3, 6 in 10-ih dneh inkubacije jajčec *M. ethiopica* v vodnih raztopinah. dH₂O – inkubacija jajčec v sterilni deionizirani vodi; H₂O – inkubacija jajčec v sterilni deionizirani vodi z izločki s korenin paradižnika; H₂O+B – inkubacija jajčec v sterilni deionizirani vodi z izločki z bakterijo okuženih korenin paradižnika. Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako (n = 32). 81
- Slika 29: Verjetnost povečanega izražanja gena *ACO1* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 12 dpi. 84
- Slika 30: Verjetnost povečanega izražanja gena *JA3* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 12 dpi. 84
- Slika 31: Verjetnost povečanega izražanja gena *SIWRKY72* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 4 dpi. 85
- Slika 32: Verjetnost povečanega izražanja obrambnega gena *PR-1* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 12 dpi. 86

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Povzetek objav o medsebojnem odnosu ogorčic koreninskih šišek in agrobakterij na gostiteljskih rastlinah.	33
Pregl. 2:	Seznam bakterijskih sevov uporabljenih v nalogi.	49
Pregl. 3:	Obravnavanja v lončnem poskusu I.	50
Pregl. 4:	Obravnavanja v lončnem poskusu II.	50
Pregl. 5:	Obravnavanja v lončnem poskusu III.	51
Pregl. 6:	Oznake obravnavanj v poskusu spremljanja izražanja tarčnih genov.	55
Pregl. 7:	Seznam tarčnih in referenčnih genov s pripadajočimi oligonukleotidnimi začetniki, ki smo jih uporabili v študiji.	59
Pregl. 8:	Raznolikost in pogostost alelov <i>recA</i> v talnih sevih <i>A. tumefaciens</i> biovar 1 izoliranih iz tal kmetijskih površin v Sloveniji.	65
Pregl. 9:	Analiza zaporedja gena <i>recA</i> med slovenskimi talnimi sevi <i>A. tumefaciens</i> biovar 1.	66
Pregl. 10:	Vstop ličink <i>M. ethiopica</i> v korenine <i>A. thaliana</i> <i>in vitro</i> ob posredni in neposredni prisotnosti bakterij <i>A. tumefaciens</i> na koreninah.	68
Pregl. 11:	Obravnavanja v lončnih poskusih za ugotavljanje medsebojnega odnosa med ogorčico in bakterijo na koreninah paradižnika.	70
Pregl. 12:	Indeksi rasti paradižnika Arawak F1 okuženega z jajčeci <i>M. ethiopica</i> in bakterijo <i>A. tumefaciens</i> (45 dpi).	71
Pregl. 13:	Indeksi rasti paradižnika Arawak F1 okuženega z jajčeci <i>M. ethiopica</i> in bakterijo <i>A. tumefaciens</i> (90 dpi).	71
Pregl. 14:	Uspešnost razmnoževanja ogorčic <i>M. ethiopica</i> na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih 45 dni po inokulaciji.	72
Pregl. 15:	Uspešnost razmnoževanja ogorčic <i>M. ethiopica</i> na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih 90 dni po inokulaciji.	72
Pregl. 16:	Indeksi uspešnosti razmnoževanja ogorčic <i>M. ethiopica</i> na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih po 45-ih dneh.	74
Pregl. 17:	Indeksi uspešnosti razmnoževanja ogorčic <i>M. ethiopica</i> na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih po 90-ih dneh.	75

- Pregl. 18: Obravnavanja v lončnih poskusih za ugotavljanje systemskega vpliva bakterij na razmnoževanje ogorčic *M. ethiopica*. 76
- Pregl. 19: Vstop ličink *M. ethiopica* v korenine paradižnika v različnih obravnavanjih po 8. in 12. dneh. 78
- Pregl. 20: Pojav tumorjev na koreninah paradižnika 45 dpi v različnih obravnavanjih z ogorčico *M. ethiopica*. 79
- Pregl. 21: Učinkovitost pomnoževanja tarčnih in referenčnih genov pri optimizirani koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov. 82
- Pregl. 22: Indeksi stabilnega izražanja referenčnih genov. 82
- Pregl. 23: Povzetek analize verjetnosti povečanega izražanja tarčnih genov (LogOr) v primerjavi z izražanjem v kontrolnem obravnavanju. Statistično značilno spremenjeno izražanje genov je prikazano v obarvanih vrsticah. 87
- Pregl. 24: Primerjava verjetnosti povečanega izražanja tarčnih genov v posameznem obravnavanju v primerjavi z izbranim neodvisnim obravnavanjem. Statistično značilno spremenjeno izražanje genov je prikazano v obarvanih vrsticah. 87

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Podroben opis izvora, opažene morfologije kolonij ter določeni aleli gena *recA* s pripadajočo akcesijsko številko vseh sevov uporabljenih v pregledni študiji populacij *A. tumefaciens* biovar 1 na kmetijskih površinah v Sloveniji.
- Priloga B: Določanje koncentracije bakterij *A. tumefaciens* v vodi glede na prosojnost (transmitanca) vodne suspenzije. Polne pike prikazujejo povprečno vrednost koncentracije bakterij ($\log(\text{CFU/ml})$) v treh ponovitvah s pripadajočim intervalom zaupanja (95 %).
- Priloga C: Uspešnost izolacije bakterij *A. tumefaciens* 06-424-7 z drobnega kremenčevega peska (Termit) z 20 % vlago, ki smo ga uporabili kot rastni substrat paradižnika v lončnih poskusih. Polne pike prikazujejo povprečno vrednost koncentracije bakterij ($\log(\text{CFU/g})$) izračunano po izolaciji bakterij iz petih ponovitev. Prikazani so pripadajoči intervali zaupanja (95 %).
- Priloga D: Povprečna stabilnost izražanja štirih referenčnih genov (vrednost M) v treh časovnih točkah vzorčenja (0, 4, 12 dpi) in združenega vzorca (roots). Iz slike je razvidno, da je uporaba vseh štirih referenčnih genov v normalizaciji smiselna, saj je vrednost M manjša od 0,5. Graf smo izdelali s paketom SLqPCR (Kohl, 2007) v programu R.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
cDNA	komplementarna DNA
CFU	enota, ki oblikuje kolonijo (ang. <i>colony-forming units</i>)
Cq	cikel kvantifikacije oz. točka, v kateri pride do dviga signala fluorescence poročevalske molekule nad vrednostjo praga, ki se izraža v številu ciklov (ang. <i>quantification cycle</i>)
CV	koeficient variabilnosti (%)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
dpi	dnevi po inokulaciji (ang. <i>days post infection</i>)
E_k	učinkovitost pomnoževanja gena v reakciji PCR v realnem času (%)
ET	etilen
IAA	rastlinski hormon indol očetna kislina oz. avksin
ISR	inducirana sistemska odpornost
J2	drugostopenjska ličinka ogorčice
JA	jasmonska kislina
KIS	Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana
LPS	lipopolisaharid (sestavni del bakterijske celične stene)
M	povprečna variacija para referenčnih genov glede na variacijo vseh drugih kontrolnih genov
MAMP	z mikrobi povezani molekularski vzorci (ang. <i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>)
MAPK	z mitogenom aktivirane proteinske kinaze
NPR1	non-expressor of pathogenesis-related protein 1
NTC	kontrola navzkrižne okužbe reakcijske mešanice (ang. <i>non-template control</i>)
PAMP	s patogeni povezani molekularski vzorci (ang. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PRs	s patogenezo povezani proteini
pTi	tumor-inducirajoči plazmid
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
rDNA	ribosomalna DNA
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne oblike kisika (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	obrti na minuto
RT	obratno prepisovanje
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodnim obratnim prepisovanjem (ang. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SA	salicilna kislina

SAR	sistemska pridobljena imunost
SSU	majhna ribosomalna podenota (ang. <i>small subunit</i>)
T4SS	bakterijski sekrecijski sistem tipa 4
T-DNA	prenešena DNA (ang. <i>transferred DNA</i>)
TE pufer	tris-EDTA pufer
T _m	temperatura tališča verige DNA
T _{povp}	povprečna dnevna temperatura
ΔRn	velikost normaliziranega fluorescentnega signala

1 UVOD

Rastlinsko parazitska ogorčica *Meloidogyne ethiopica* spada v tropsko skupino termofilnih vrst rodu *Meloidogyne*. Leta 2003 smo jo odkrili v Sloveniji (Širca in sod., 2004) in to je bila tudi prva najdba te vrste v Evropi. Izolirana je bila s korenin paradižnika, ki je rasel v rastlinjaku. Kasneje so njeno prisotnost potrdili tudi v drugih državah Evrope, in sicer v Grčiji (Conceição in sod., 2012) ter Turčiji (Aydinli in sod., 2013), zato je bila vrsta *Meloidogyne ethiopica* leta 2011 uvrščena na opozorilni seznam Evropske organizacije za varstvo rastlin (EPPO). Najdba te nevarne vrste je najverjetneje posledica globalnega trgovanja z rastlinskim materialom. Tuji škodljivci rastlin v novih okoljih vzpostavljajo odnose z avtohtonimi, nanje neprilagojenimi, organizmi in izid srečanja je lahko nepredvidljiv, saj je odvisen od odziva vnesenega škodljivca v novem okolju.

Gospodarska škoda, ki jo povzročajo ogorčice rodu *Meloidogyne*, je največja na kmetijskih površinah tropskega in subtropskega podnebne pasu (Kiewnick in Sikora, 2006, cit. po Moens in sod., 2009). Čeprav večina termofilnih vrst rodu *Meloidogyne* v Evropi povzroča škodo v zaprtih prostorih, kjer temperatura ne pade pod ledišče niti v zimskih mesecih, je vrsta *M. ethiopica* sposobna preživeti na prostem v območjih s sredozemskim in celinskim podnebjem (Strajnar in sod., 2011). Njena prisotnost v slovenskih tleh kaže na to, da bi se lahko ustalila in razširila tudi v območjih Evrope s podobnimi podnebnimi razmerami kot so v Sloveniji. Pri polifagnih ogorčicah *Meloidogyne* spp., ki se razmnožujejo z mitotično partenogenezo (t.j. nespolno), je zaskrbljujoča tudi njihova izjemna prilagodljivost na nova okolja in tudi sposobnost razmnoževanja na odpornih gostiteljskih kultivarjih (Castagnone-Sereno, 2006). S poskusi umetno povzročene selekcije so dokazali, da lahko nevirulentna populacija *M. incognita* postane virulentna po petih do desetih rodovih parazitiranja na odporni sorti paradižnika (Castagnone-Sereno in sod., 1994). Primer uspešne prilagoditve na novo okolje je primer ogorčice *M. minor* (Karssen, 2004), ki se zadnja leta širi po Evropi. Sprva je bil pojav ogorčic omejen na športne zelenice na Nizozemskem (l. 1997), kasneje je ogorčica povzročala poškodbe na krompirju (l. 2000), danes pa se že pojavlja v številnih državah po Evropi (Elling, 2013).

M. ethiopica je polifagna vrsta saj parazitira številne dvokaličnice in enokaličnice. Je eden najpomembnejših škodljivcev vinske trte (*Vitis vinifera*), kivija (*Actinida deliciosa* C.) ter krompirja (*Solanum tuberosum*) v Čilu (Carneiro in sod., 2007). Iz Čila je bila *M. ethiopica* vnesena v Brazilijo z okuženimi sadikami kivija, vendar v Braziliji ne povzroča večje gospodarske škode. Carneiro in sod. (2007) poročajo o večji agresivnosti vrste *M. ethiopica* v primerjavi z drugimi vrstami iz rodu *Meloidogyne*. Vrsta *M. ethiopica* spodbudi nastanek večjih gal na koreninah, samice izlegajo več jajčec in napadena rastlina hitreje propade. Na seznamu gostiteljskih vrst *M. ethiopica* so številne gospodarsko pomembne poljščine, zelenjadnice (Strajnar in sod., 2011) in sadne rastlinske vrste, kot sta vinska trta in kivi (Carneiro in sod., 2007). Na območju Slovenije smo do danes potrdili

prisotnost štirih vrst ogorčic koreninskih šišk, in sicer *M. hapla* (Urek in Hrzič, 1998), *M. incognita*, *M. arenaria* in *M. ethiopica* (Urek in sod., 2003; Širca in Urek, 2005; Strajnar, 2012). Po trenutnih podatkih povzročajo te ogorčice največ škode v rastlinjakih, kjer lahko prezimijo (Širca S., osebno).

Napad ogorčic poveča občutljivost gostiteljske rastline za druge škodljive organizme, tudi za patogene agrobakterije. Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* je povzročitelj bolezni raka koreninskega vratu in je prav tako gospodarsko pomemben škodljivec. Večina sevov te vrste je talnih saprofitov, manjši del pa so rastlinski patogeni. Bakterija lahko povzroči nastanek tumorjev na dvokaličnicah iz več kot 90-ih družin (De Cleene in De Ley, 1976) in predstavlja velik problem po vsem svetu, predvsem v vinogradih, nasadih jablan in koščičarjev, ter na nekaterih okrasnih rastlinah (Kennedy in Alcorn, 1980; Epstein in sod., 2008; Pulawska, 2010). Razširjena je na območjih s sredozemskim podnebjem, pojavnost raka pa je povezana z ekstremnimi nihaji v temperaturi, kot so vroča poletja in zmrzali v pomladnih mesecih (Escobar in Dandekar, 2003; Agrios, 2005). V Sloveniji rak koreninskega vratu ne povzroča večje gospodarske škode. Največje izgube smo beležili med letoma 1999 in 2000, ko so okužbe vinske trte s sorodno vrsto *A. vitis* Ophel & Kerr 1980 pripeljale do uničenja večjega števila trsov in celo do propada vinogradov (Šabec-Paradiž in sod., 2002). Zaradi hitrega odziva in strogih ukrepov se bolezen danes pojavlja le sporadično in ne povzroča večje škode. Poleg vinogradništva je v Sloveniji razširjeno tudi sadjarstvo. Čeprav so jablane prav tako gostitelji bakterije *A. tumefaciens*, pa pojav raka koreninskega vratu ne povzroča težav pridelovalcem. Sklepamo, da se bolezen v preteklosti ni pogosto pojavljala, saj zapisov o prisotnosti ali škodljivem vplivu bakterije *A. tumefaciens* na sadna drevesa v Sloveniji ni.

Bakterije *A. tumefaciens* vstopijo v korenine preko poškodb rastlinskega tkiva, ki so lahko posledica dejavnosti nekaterih talnih organizmov, tudi ogorčic koreninskih šišk (Karimi in sod., 2000). Patogeni sevi *A. tumefaciens* nosijo konjugativen plazmid Ti, katerega del se vstavi v rastlinski genom in spodbudi nenadzorovano delitev gostiteljskih celic opazno kot tumorska tvorba. Delitev celic spodbujajo rastlinski hormoni, kot so avksini in citokinini, katerih zapis izvira iz bakterije (Escobar in Dandekar, 2003). Nadzor nad odzivom gostitelja prevzamejo tudi ogorčice koreninskih šišk, ki prilagodijo odziv gostitelja v svojo korist (Davis in sod., 2004; Gheysen in Jones, 2006). Zapise za podobne homologe rastlinskih hormonov nosijo tudi ogorčice koreninskih šišk (De Meutter in sod., 2003). Porušeno hormonalno ravnoesje v rastlini, bodisi zaradi napada ogorčic ali okužbe z agrobakterijami, vpliva na rastlinski imunski odziv. Ogorčice koreninskih šišk lahko omogočijo vstop patogenim bakterijam *A. tumefaciens* v korenine rastlin in povečajo frekvenco transformacije bakterijske DNA v rastlinski genom (Karimi in sod., 2000).

Povod za raziskavo je bila opažena povezava med pojavnostjo raka koreninskega vratu ter ogaljenostjo korenin na sadnem drevju. O sinergističnem delovanju med *A. tumefaciens* in

ogorčicami koreninskih šišk so pisali Griffin (1968) na malinah, Orion in Zutra (1971, 1982) na mandljih in bombažu, Dhanvantari (1975) na breskvah, Süle in sod. (1995) na vinski trti ter Rubio-Cabetas in sod. (2001) na okrasnem drevju lovorikovcu. Skupina raziskovalcev Fakhouri in sod. (1996) je objavila rezultate študije, ki postavlja domnevo o antagonističnem delovanju med ogorčico in bakterijo. Ovrednotili so zmanjšano pojavnost bakterijskih tumorjev na paradižniku ob prisotnosti ogorčice *M. javanica* ter manjše razmnoževanje ogorčic ob predhodno kolonizirani korenini z *A. tumefaciens*. Podobno opisujejo El-Beltagi in sod. (2011) na koreninah vinske trte, kjer je enoletna prisotnost *A. tumefaciens* zmanjšala razmnoževanje *M. incognita*. Medsebojni odnos med obema škodljivima organizmoma je sodeč po nasprotujočih si rezultatih mnogo kompleksnejši, kot je bil v preteklosti predstavljen. S pričujočo nalogo smo želeli ovrednotiti njun medsebojni vpliv ob pogojih, kjer samostojno ne povzročata vidnih sprememb v vitalnosti gostiteljske rastline.

1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- Bakterije vrste *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 so vsesplošno prisotne v obdelovalnih tleh, a so večinoma nepatogene in ne povzročajo gospodarske škode.
- Med prehranjevanjem in razmnoževanjem ogorčic *Meloidogyne* nastanejo poškodbe na koreninah, ki predstavljajo potencialna vstopna mesta za bakterije. Predvidevamo, da se ob napadu korenin z *M. ethiopica* poveča število vstopnih mest za bakterijo *A. tumefaciens*. Stopnja obolelosti rastline je odvisna od začetnega inokuluma ogorčice *M. ethiopica* in bakterije *A. tumefaciens* ter časovne porazdelitve obeh škodljivih organizmov v okolici. Napad z obema organizmoma hkrati se odraža v zmanjšani rasti rastline.
- Med obema škodljivima organizmoma bo prevladoval sinergistični odnos.
- Pričakujemo, da se bo medsebojni vpliv med omenjenima škodljivima organizmoma pokazal na ravni izražanja genov, ki so vpleteni v obrambo rastline.

1.2 CILJ NALOGE IN DOPRINOS K ZNANOSTI

- A) Prvi cilj naloge je pregledna študija razširjenosti *A. tumefaciens* v obdelovalnih tleh v Sloveniji za potrebe izdelave ocene tveganja pojavnosti raka koreninskega vratu ob morebitni razširitvi ogorčice *M. ethiopica* v slovenskih tleh.
- B) Z vidika varstva rastlin je poznavanje medsebojnega odnosa med *A. tumefaciens* in *M. ethiopica* izredno pomembno in dveh razlogov: (1) na tržišču trenutno ni učinkovitih

sredstev za zatiranje teh dveh organizmov in (2) kljub številnim raziskavam narava in delovanje obeh organizmov na gostiteljsko rastlino ter vloga rastline v tem odnosu niso docela razjasnjeni. Še več, pojavljajo se nasprotujoči si rezultati, kar je znak nerazumevanja biologije teh organizmov. Zaradi naštetega smo si zadali naslednje cilje:

- Ugotovitev vpliva ogorčic *M. ethiopica* in bakterij *A. tumefaciens* na rast gostiteljskih rastlin v lončnih poskusih.
- Ugotovitev vpliva bakterij *A. tumefaciens* na razmnoževanje ogorčic *M. ethiopica* na koreninah gostitelja.
- Ugotovitev vpliva bakterij *A. tumefaciens* na vstop infektivnih ličink (J2) *M. ethiopica* v gostiteljske korenine.
- Preučitev pojavnosti raka koreninskega vratu ob prisotnosti ogorčic *M. ethiopica* v lončnih poskusih na gostiteljskih rastlinah.
- Vrednotenje izražanja izbranih genov paradižnika, ki sodelujejo v imunskem odzivu rastline, ob okužbi z ogorčicami *M. ethiopica* in bakterijami *A. tumefaciens*.

S predstavljen nalogi smo želeli preveriti domnevo o sinergizmu med ogorčicami koreninskih šišek in patogenimi agrobakterijami. S poznavanjem obrambe bomo pripomogli k izbiri primernih sredstev za obvladovanje obeh organizmov.

2 PREGLED OBJAV

Za razumevanje odnosa *Meloidogyne ethiopica* – *Agrobacterium tumefaciens* na gostiteljskih rastlinah je ključno poznavanje obeh vrst. V naslednjih poglavjih opisujem taksonomijo in patogenezo ogorčice in bakterije. Nadalje povzemam najpomembnejše rezultate študij o medsebojnem odnosu med *Meloidogyne* spp. in *Agrobacterium* spp. in vzajemnem učinku na bionomijo ogorčice oziroma na pojav bakterijskih tumorjev.

2.1 POMEN V KMETIJSTVU

2.1.1 Ogorčice koreninskih šišč (*Meloidogyne* sp.)

Rastlinsko parazitske ogorčice so zajedavci skoraj vseh vrst kritosemenk (Angiospermae). V kmetijstvu povzročajo največ škode ogorčice koreninskih šišč *Meloidogyne* spp. (Moens in sod., 2009). To so obligatni endoparaziti rastlin, ki parazitirajo širok krog gostiteljskih rastlin in so razširjene po vsem svetu. Identificiranih je okoli 90 vrst *Meloidogyne* spp., od katerih največjo gospodarsko škodo povzročajo vrste *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita* in *M. hapla* (Moens in sod., 2009; Nicol in sod., 2011). Ti škodljivci prizadenejo številne poljščine, trave, vrtnine in okrasne rastline. Značilna znamenja napada ogorčic koreninskih šišč so šiškam podobne odebelitve na koreninah, zaradi katerih je omejen pretok tekočin po prevodnih tkivih korenine. Dovzetnost napadenih rastlin za sušni stres je zato večja. Zmanjša se vitalnost rastline, upade njena odpornost proti drugim škodljivim organizmom ter posledično tudi kakovost in količina pridelka (Moens in sod., 2009; Naz in sod., 2012). Ena samica ogorčic koreninskih šišč lahko izleže tudi več kot 500 jajčec, iz katerih se izležejo drugostopenjske infektivne ličinke (J2), ki so sposobne parazitirati rastline. Celotni razvojni krog traja okoli 40 do 60 dni, odvisno od okoljskih razmer. V eni rastni sezoni imajo lahko tudi več kot dva rodova. Drugi rod je številčnejši in stopnja prizadetosti gostiteljskih rastlin se zato povečuje; prizadeta rastlina lahko tudi odmre. Stopnja prizadetosti rastline je odvisna tudi od vrste ogorčice, sorte napadene rastline, letnega časa, tipa tal in kolobarja (Wasemael in sod., 2011).

Ogorčice lahko v neokužena območja vnesemo s premeščanjem okuženih tal, rastnega substrata ter sadilnega materiala, zlasti okuženih čebulnic in gomoljev. Nezanemarljiv je tudi raztros ogorčic preko oprijemanja okuženih tal na delovne stroje, orodja ter na podplate obutve. Pri enoletnih posevkih obvladujemo številčnost populacije s kolobarjenjem, podoravanjem in najpogosteje s sajenjem odpornih sort. Težavnejše je obvladovanje v trajnih nasadih, saj učinkovitih sredstev za zatiranje trenutno ni. Metil bromid je bilo najučinkovitejše nematicidno sredstvo vse do leta 2005, ko je postala njegova uporaba v EU prepovedana zaradi škodljivega vpliva na zdravje ljudi ter okolje (Oka in sod., 2000; Naz in sod., 2012), uporaba drugih nematicidov pa močno omejena. Alternativo kemičnim sredstvom ponuja biotično varstvo z uporabo živih

mikroorganizmov z antagonističnim delovanjem ali uporabo izvlečkov nekaterih rastlin in mikroorganizmov (Lamovšek in sod., 2013). Med najbolj prodajana sredstva biotičnega varstva proti ogorčicam koreninskih šišk sodijo pripravki, ki vsebujejo žive bakterije (*Bacillus firmus* v pripravku VOTiVO™ podjetja Bayer CropScience), spore gliv (*Purpureocillium lilacinus* v pripravkih BioAct WG (Bayer) in PL Gold (BASF)) in spore endoparazita ogorčic *Pasteuria penetrans* (pripravek Econem, Syngenta) (Hallmann in sod., 2009; Lamovšek in sod., 2013).

2.1.2 Agrobakterije

Podobno kot ogorčice koreninskih šišk, tudi patogene agrobakterije (*Agrobacterium* sp.), ki povzročajo bolezen raka koreninskega vratu, uvrščamo v skupino gospodarsko pomembnih organizmov. Patogene agrobakterije so sposobne okužiti rastline iz več kot 90 družin, predvsem dvokaličnic. Večjo gospodarsko škodo imajo predvsem drevesničarji, trsničarji in pridelovalci sadja po vsem svetu (Pulawska, 2010). Pravzaprav je bolezen v državah z mediteranskimi podnebnimi razmerami ena najpomembnejših bakterioz na koščičarjih (Krimi in sod., 2002). Bakterija povzroči nastanek tumorske tvorbe na koreninskem vratu mlade rastline, kar ovira pretok hranil in vode od korenin do poganjkov. Odmiranje rastline je postopno in je povezano s hitrostjo rasti tumorja. Rast tumorja je odvisna od okužene gostiteljske rastline, tipa tal, okoljskih razmer in tudi od prisotnosti drugih škodljivih organizmov, ki lahko oslabijo odpornost rastline (Agrios, 2005). Pri trajnicah se postopno odmiranje kaže v obliki vse večjega sušnega in prehranskega stresa (Poncet in sod., 1996). Večina naravne talne populacije agrobakterij v kmetijskih tleh ni patogena, zato so takšna tla primerna tudi za gojenje sadnih vrst dreves in lupinarjev, malin ter vrtnic, ki so sicer občutljive za okužbe s patogenimi sevi bakterije *A. tumefaciens* (Escobar in Dandekar, 2003; Pulawska, 2010).

Preprečevanje poškodb rastlinskega tkiva občutno zmanjša pojav tumorjev, zato pazljivo obrezujemo ter varujemo rastline pred zmrzaljo in škodljivimi žuželkami. Patogene agrobakterije namreč zaznajo poškodovano tkivo in se usmerijo proti njemu. Nastanek tumorjev pogojuje prisotnost konjugativnega plazmida Ti (ang. *tumor-inducing*) v bakteriji (Van Larebeke in sod., 1974). Plazmid Ti se lahko prenaša s patogenih agrobakterij na nepatogene populacije bakterij v rizosferi (Teyssier-Cuvelle in sod., 2004). Dejstvo, da lahko plazmid Ti poleg agrobakterij sprejmejo tudi druge bakterije iz družine Rhizobiaceae, predstavlja grožnjo za hitro razširitev patogenih populacij v talnem okolju. Do okužbe torej lahko pride preko okuženih tal in najpogosteje preko kužnega sadilnega materiala. V nasadih z urejenim namakalnim sistemom se lahko patogeni sevi prenesejo z vodo po celotnem območju nasada. Ker so agrobakterije gibljive, lahko prek korenin okužijo tudi gostiteljske rastline, ki rastejo v bližini okužene rastline (Escobar in Dandekar, 2003). Učinkovitega sredstva za zatiranje povzročitelja raka koreninskega vratu ni. Nove okužbe lahko zajezimo z uporabo biotičnega pripravka z nepatogenimi agrobakterijami (*A.*

radiobacter K84 in K1026) pred sajenjem (New in Kerr, 1972; EPA, 2015). Na splošno pa velja, da bolezen omejujemo s sajenjem zdravega, neokuženega sadilnega materiala, z odstranjevanjem močno obolelih rastlin iz nasadov in tudi s sajenjem rastlin na primerne lege.

2.2 TAKSONOMSKI PREGLED

2.2.1 Rod *Meloidogyne*

Zgodovino taksonomije ogorčic koreninskih šišk je Gerrit Karssen razdelil na tri obdobja (Karssen, 2002). V prvem obdobju (1855 – 1878) je bila vzpostavljena povezava med šiškami na koreninah in njihovimi povzročitelji t.j. ogorčicami. Temu obdobju je sledilo daljše obdobje (1879 – 1948), ko so ogorčice koreninskih šišk uvrščali v isti rod kot cistotvorne ogorčice (*Heterodera* Schmidt 1871). V zadnje, tretje obdobje pa Karssen uvršča dogajanje v taksonomiji po ustanovitvi lastnega rodu *Meloidogyne* za ogorčice koreninskih šišk, ki je zaznamovano s porastom v številu na novo opisanih vrst.

Leta 1887 je Göldi na ogaljenih koreninah kakavovca (*Coffea* sp.) opisal novo vrsto ogorčice in predlagal ime *Meloidogyne* za rod ter vrstno ime *M. exigua* Göldi. Dve leti kasneje je Neal, nevede za Göldijev predlog, predlagal rodovno ime *Anguillula arenaria* Neal 1889 (Karssen, 2002). V istem letu je Atkinson, ki je preučeval histologijo koreninskih šišk, večjedrne celice označil za mrtve samice, a danes vemo, da je opazoval prehranjevalna mesta znotraj gale. Ogorčice koreninskih šišk je poimenoval *Heterodera radiculicola* (Greeff) Müller in jih tako uvrstil v rod cistotvornih ogorčic (Karssen, 2002). Zaradi nesoglasja med taksonomi glede poimenovanja rodu so nove vrste ogorčic koreninskih šišk uvrščali v tri sinonimne rodove: *Meloidogyne* sp., *Anguillula* sp. ter *Heterodera radiculicola* (Karssen, 2002).

V začetku 20. stoletja je Kati Marcinowski poenotila poimenovanje vseh vrst ogorčic koreninskih šišk v *H. radiculicola*. V to vrsto je uvrstila že opisane vrste *arenaria*, *exigua* in *javanica* (Karssen, 2002). Uskladitev v poimenovanju so dosegli šele po letu 1949, in sicer po objavi revizije rodu (Chitwood, 1949, cit. po Karssen, 2002). Z revizijo je Chitwood obudil rodovno ime *Meloidogyne* Göldi 1887 in *M. exigua* kot tipsko vrsto tega rodu, kljub temu da živega materiala ni bilo na voljo. V svojem delu je Chitwood ponovno opisal nekatere vrste in v rod *Meloidogyne* uvrstil tri vrste: *M. incognita* (nekdanja *Oxyuris incognita* Kofoid & White 1919), *M. javanica* in *M. arenaria*. Uvedel je tudi uporabo perinealnih vzorcev v diagnostiki vrst *Meloidogyne*, ki jih uporabljamo še danes. Na podlagi teh vzorcev je opisal tudi vrsto *M. hapla* Chitwood 1949. Chitwood je bil prvi, ki je dokončno razmejil ogorčice koreninskih šišk od cistotvornih ogorčic (Karssen, 2002).

V letu 1964 sta Sledge in Golden predlagala rodovno ime *Hypsoperine* Sledge & Golden 1964 namesto imena *Meloidogyne* (Karssen, 2002). Mnogi avtorji niso prevzeli tega poimenovanja. Kasneje (l. 1986) je Siddiqui ime *Hypsoperine* potrdil za veljavno in rod razdelil na dva podrodova: *Hypsoperine* (*Hypsoperine*) in *Hypsoperine* (*Spartonema*) (Karssen, 2002). Šele leta 2000 je sprejel rodovno ime *Meloidogyne* vanj uvrstil podrod *Hypsoperine* (*Hypsoperine*), medtem ko je podrod *Hypsoperine* (*Spartonema*) povzdignil na raven rodu (Karssen, 2002). Rod *Hypsoperine* (*Spartonema*) je kasneje razveljavil Plantard (2007) na podlagi zaporedij 18 S rDNA. Danes morfološko diagnostiko vse bolj zamenjuje molekularna filogenija (Tigano in sod., 2005). Shema po kateri se ravnamo danes ima poddružino Meloidogyninae znotraj družine Hoplolaimidae.

Danes temelji identifikacija vrst *Meloidogyne* na izoencimskem profilu. S poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) ločimo grobi ekstrakt proteinov, nakar histokemično obarvamo različne encime (nespecifične esterase, superoksid dismutaze, malat dehidrogenaze, glutamat oksalacetat transaminaze, itd.), od katerih so najbolj uporabne nespecifične esterase in malat dehidrogenaza (Carneiro in sod., 2000). Uporabne so tudi številne molekularne tehnike (PCR) pomnoževanja vrstno specifičnih odsekov na jedrnem (Adam in sod., 2007) ali mitohondrijskem genomu (Zijlstra, 2000).

Na podlagi SSU rDNA zaporedij razvrščano vrste v družini Meloidogynidae v tri klade (Tandingan de Ley in sod., 2002; Holterman in sod., 2006). V klado I uvrščamo tropske ogorčice koreninskih šišek (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*), v klado II spadajo *M. hapla* in druge, ter v klado III večino vrst s seznama EPPO A2 (*M. chitwoodi*, *M. fallax*). Vrsta *M. ethiopica* spada v klado I.

2.2.1.1 *Meloidogyne ethiopica*

Taksonomija vrste *Meloidogyne ethiopica* je sledeča (Karssen, 2002):

Nadkraljestvo:	Animalia
Kraljestvo:	Bilateria
Naddeblo:	Pseudocoelia
Deblo:	Nematoda
Družina:	Meloidogynidae
Poddružina:	Meloidogyninae
Rod:	<i>Meloidogyne</i> Göldi, 1887
Vrsta:	<i>Meloidogyne ethiopica</i> Whitehead 1968

Vrsto *Meloidogyne ethiopica* je Whitehead leta 1968 opisal na podlagi ene jajčne vrečke na koreninah paradižnika iz regije Mlalo, območja Lushoto v provinci Tanga v Tanzaniji. Sočasno je Whitehead preučeval jajčne vrečke s paradižnika vzorčenega v Zimbabveju in mikroskopske preparate iz Južne Afrike. Obe populaciji sta bili predhodno identificirani

kot *M. arenaria* (Neal 1898) Chitwood 1949 na podlagi perinealnih vzorcev. Ti vzorci so bili po obliki podobni vrstama *M. arenaria* in *M. incognita* (Kofoed & White 1919) Chitwood 1949 in so se celo razlikovali glede na ogorčice iz iste jajčne vrečke, zato Karssen predvideva, da je prišlo do napačne identifikacije (Karssen, 2002).

Vrsto *M. ethiopica* je ponovno opisala skupina Carneiro in sod. (2004), ko je primerjala različne populacije teh vrst iz Brazilije s populacijami iz Čila in Kenije. Med tremi populacijami *M. ethiopica* niso odkrili večjih razlik. Populacijo *M. ethiopica* iz Evrope, ki se je prvič pojavila v Sloveniji, so identificirali Širca in sod. (2004). Nadaljnjo karakterizacijo pa so naredili Strajnar in sod. (2011, 2012).

2.2.2 Rod *Agrobacterium*

Rod *Agrobacterium* uvrščamo med alfa proteobakterije, natančneje v družino Rhizobiaceae, kamor spadajo tudi simbiotski fiksatorji dušika *Rhizobium* spp. To so aerobne gramnegativne in gibljive nesporulirajoče bakterije. Premikajo se s peritrihimi bički. Imajo en krožni kromosom in dva plazmida, linearne in krožne (Holt in sod., 1994). Večina predstavnikov rodu *Agrobacterium* je talnih saprofitov in komenzalov. Manjši delež predstavljajo rastlinski patogeni, ki povzročajo bolezen raka koreninskega vratu na dvokaličnicah iz več kot 90-ih družin (De Cleene in De Ley, 1976).

Raziskave na agrobakterijah potekajo v dveh smereh; *Agrobacterium* sp. kot (1) modelni rastlinski patogen ter kot (2) vektor za vnos genov v moderni biotehnologiji in razvoju gensko spremenjenih organizmov.

2.2.2.1 *Agrobacterium tumefaciens* (Smith in Townsend 1907) Conn 1942

Taksonomija agrobakterij se je v zadnjem stoletju spreminjala. Sprva so povzročitelja raka koreninskega vratu imenovali *Bacillus tumefaciens* (Smith in Townsend 1907), *Pseudomonas tumefaciens* (Smith in Townsend 1907) Duggar 1909, *Phytomonas tumefaciens* (Smith in Townsend 1907) Bergey in sod. 1923, in kasneje *Polymonas tumefaciens* (Smith in Townsend 1907) Lieske 1928. Danes je uradno ime *Agrobacterium tumefaciens* (Smith in Townsend 1907) Conn 1942 (Escobar in Dandekar, 2003).

Agrobakterije so nadalje delili glede na patogenost in gostiteljsko rastlino: *A. tumefaciens* in rak koreninskega vratu, *A. rubi* in trsni rak na malinah (*Rubus idaeus*), *A. rhizogenes* in dlakavost korenin (bakterija nosi plazmid Ri), ter *A. radiobacter* kot nepatogeni sevi. Spoznanje, da se patogenost prenaša s plazmidom Ti (Van Larebeke in sod., 1974; Watson in sod., 1975), je prineslo nove spremembe v razumevanju taksonomije. Teoretično bi torej izguba plazmida spremenila vrsto bakterije (Kerstens in De Ley, 1984; Kerr, 1992; Young in sod., 2001). Ker je večina taksonomov zagovarjala zanemarljiv prispevek genov na plazmidu k fenotipskim ali genotipskim lastnostim seva, so ustvarili delitev agrobakterij na

biovarje na podlagi biokemijskih in fizioloških lastnosti sevov. Po tej delitvi so agrobakterije razdelili na tri biovarje: biovar 1 (*A. tumefaciens*), 2 (*A. rhizogenes*) in 3 (*A. vitis* – rak koreninskega vratu na vinski trti). Kljub temu pa z uvedbo biovarjev niso dosegli skladnosti s taksonomijo vrst.

Young in sod. (2001) so predlagali uvrstitev celotnega rodu *Agrobacterium* v rod *Rhizogenes*. Temu so nasprotovali Farrand in sod. (2003), saj naj bi med rodovima *Rhizobium* in *Agrobacterium* obstajale dovolj velike razlike za ohranitev rodovnega imena *Agrobacterium*. Polifiletski status rodu so razrešili s prenosom vrste *A. rhizogenes* biovar 2 v rod *Rhizobium*. Danes je ime *R. rhizogenes* veljavno ime za seve iz skupine biovar 2 (Costechareyre in sod., 2010). V monofiletsko skupino rodu *Agrobacterium* so trenutno uvrščene vrste *A. vitis* (biovar 3), *A. rubi*, *A. larrymoorei*, *R. skierniewicense*, *A. sp.* NCPPB 1650 (najverjetneje *Allorhizobium undicola*) ter genomske vrste *A. tumefaciens* iz skupine biovar 1.

Z uporabo DNA-DNA hibridizacijskih molekularnih metod je postalo jasno, da je skupina *A. tumefaciens* biovar 1 na genomski ravni izredno raznolika. Predstavnike iz skupine biovar 1 (*A. tumefaciens*) delimo na 11 genomskih vrst, ki jih označujemo z G1 do G9 ter G13 in G14 (Popoff in sod., 1984, cit po Lindström in Young, 2011; Shams in sod., 2013). Zatorej ena sama vrsta *A. tumefaciens* ne obstaja, temveč govorimo o »kompleksu vrst *A. tumefaciens*« (Costechareyre in sod., 2010). Vsaka genomska vrsta bo sčasoma preimenovana v novo vrsto, kot so to nedavno storili za genomsko vrsto G4 (= *A. radiobacter*; Lindström in Young, 2011). Predlagali so tudi spremembo imen drugih genomskih vrst, npr. za G2 (= *A. pusense*; Panday in sod., 2011), G8 (= *A. fabrum*; Lassalle in sod., 2011), in G14 (= *A. nepotum*; Pulawska in sod., 2012), vendar ta imena še niso sprejeta. Lassalle in sod. (2011) predvidevajo, da so genomske vrste ekovrste, torej vrste *A. tumefaciens* prilagojene na točno določen talno-rizosferni habitat.

Določevanje genomskih vrst se je do danes poenostavilo. DNA-DNA hibridizacijo je nadomestila metoda AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism*), ki ločuje med genomskimi vrstami *Agrobacterium* sp. (Mougel in sod., 2002; Portier in sod., 2006), vendar metodo omejuje daljši čas izvedbe. Enostavnejše ločevanje med genomskimi vrstami omogoča primerjava zaporedij določenih ohranjenih genov. Metoda se imenuje MLSA (ang. *multilocus sequence analysis*) in je bila prvotno razvita za klinične bakterijske seve (Maiden in sod., 1998), a se je izkazalo, da je uporabna za vse bakterijske seve. Na podlagi najmanj petih zaporedij genov, ki niso pod selekcijskim pritiskom, kot t.i. hišni geni, lahko določimo genomske vrste (Martens in sod., 2008). Metoda je primerljiva z rezultati analize genov 16S rRNA ter 23S rRNA. Costechareyre in sod. (2010) so določanje genomskih vrst *A. tumefaciens* še dodatno poenostavili. Dokazali so, da lahko na podlagi zaporedij gena *recA* natančno določimo genomsko vrsto sevov *A. tumefaciens* ter alele gena *recA*.

2.3 BIONOMIJA OGORČIC KORENINSKIH ŠIŠK

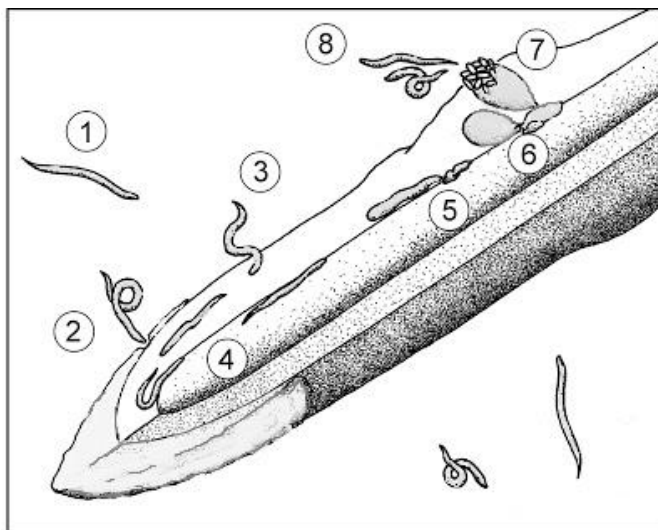
Ogorčice koreninskih šišk (*Meloidogyne* spp. Göldi 1892) so obligatni paraziti, ki parazitirajo številne gostiteljske rastline. Razmnožujejo in prehranjujejo se znotraj korenin, kjer povzročijo nastanek gal. Bolezenski znaki napada na nadzemnih delih rastline so netipični in so podobni večini bolezenskih znamenj, ki nastanejo zaradi kakršnekoli prizadetosti koreninskega sistema. Napadena rastlina kaže znake zakrnele rasti, zmanjšane vitalnosti in uvenelosti zaradi zmanjšanega prenosa vode in hranil od korenin do poganjkov (Perry in Moens, 2011).

Odrasla samica izleže jajčeca obdana z želatinastim ovojem na površino gale. Jajčna vrečka je sprva svetle barve, a se s staranjem obarva temno rjavo. Znotraj jajčec se razvije prvostopenjska ličinka (J1). Čas izleganja je odvisen predvsem od temperature. Izjema so vrste *Meloidogyne hapla*, *M. triticroyzae* in *M. chitwoodi*, kjer se delež jajčec izvali le ob prisotnosti koreninskih izločkov, ki so potrebni pri kasnejših rodovih v rastni sezoni (Perry in Wasemael, 2008). Nadzorovano izleganje zagotavlja ličinki primerno okolje za preživetje dokler ne vstopi v korenino gostitelja. Selektivna prepustnost jajčne ovojnice, ki jo sestavljajo trije sloji, varujejo ranljivo ličinko pred zunanjimi vplivi ter pred kemičnimi sredstvi za zatiranje ogorčic. Optimalna temperatura za izleganje ličink *M. ethiopica* je nad 25 °C, pri čemer naj rastlinski koreninski izločki ne bi vplivali na hitrost izleganja ličink *M. ethiopica* (Perry in Moens, 2011).

Prva levitev ličinke poteka znotraj jajčeca. Prvostopenjske ličinke se izležejo kot drugostopenjske infektivne ličinke (J2), katere imajo sposobnost gibanja v tleh in parazitiranja rastlin. V času od izleganja do vstopa v korenino in vzpostavitev prehranjevalnega mesta se ličinke J2 ne prehranjujejo. S pomočjo svojih čutil, imenovanih amfide, se orientirajo proti korenini in sledijo gradientom bodisi CO₂, aminokislin, ionov, pH ali temperature. Ogljikov dioksid, ki izhaja iz korenine, naj bi deloval kot atraktant na daljavo in je eden od ključnih signalov, s katerim ličinka zazna prisotnost rastline (Robinson in Perry, 2006). Za ličinke ogorčic koreninskih šišk naj bi bil pomemben, za enkrat še neznan, lokalni atraktant, ki se izloča s koreninskega vršička. Koreninski vršiček je pogostokrat vstopno mesto ličink J2 v korenino. Predvidevajo, da se ličinka J2 orientira po gradientu električnega potenciala v okolici koreninskega vršička, drugi pa predvidevajo, da je signal povišana temperatura v okolici vršička (Perry in Moens, 2011).

Priljubljeno mesto vstopa je prostor tik ob mestu, kjer se korenina podaljšuje. Infektivna ličinka J2 vstopi v korenino tik za koreninskim vršičkom in potuje intercelularno po apoplastni poti proti vršičku. Ob koreninskem apeksu se obrne, izogne endodermu in migrira po korenini navzgor do mesta v bližini vaskularnega cilindra. Čeprav večino ličink J2 privlačijo mesta ob koreninskih vršičkih, jih privlačijo tudi mesta, od koder poganjajo lateralne korenine in mesta, skozi katera so ličinke že vstopile (Jones in Goto, 2011). Za

razliko od cistotvornih ogorčic (rodova *Globodera* in *Heterodera*) ogorčice koreninskih šišk med migracijo pretirano ne poškodujejo koreninskega tkiva. Ličinka J2 namreč proizvaja koktajl encimov, ki ji omogoča lažjo migracijo. Encimi se tvorijo v subventralnih žlezah in se izločajo skozi ustni organ v obliki votlega bodala imenovanega stilet ali bodalo. Encimi pomagajo oslabiti oz. razgraditi trdne celične stene in tako olajšati prehod ličinkam. V izločkih ličink J2 so odkrili celulaze, pektat liaze, ksilanaze in poligalakturonaze (Davis in sod., 2000; Huang in sod., 2003; Jaubert in sod., 2005a; Gheysen in Jones, 2006). V genomu *M. incognita* so odkrili veliko zapisov za celulaze in pektat liaze. Zaradi raznolikosti in ogromnega števila ponovitev genskih zapisov teh genov, predvidevajo, da je nekoč prišlo do horizontalnega prenosa teh genov iz bakterij v ogorčice (Jones in sod., 2005; Ledger in sod., 2006).



Slika 1: Shematični prikaz življenjskega kroga sedentarnih endoparazitov iz rodu *Meloidogyne*. (1) Infektivna ličinka J2; (2) orientacija proti vstopnemu mestu tik ob koreninskem vršičku; (3) vstop v korenino; (4) migracija po apoplastu proti koreninskemu vršičku; (5) migracija do primerne mesta prehranjevanja ob vaskularnem cilindru; (6) nastanek prehranjevalnega mesta in sprememba morfologije ličinke; (7) odrasla samica izlega jajčeca na površino gale; (8) izleganje ličink J2 in pričetek novega razvojnega kroga (Thomas, 2009).

Ko ličinka J2 prispe do primerne mesta, si tam ustvari stalno prehranjevalno mesto. To je tudi njen edini vir hrane. Ličinke ogorčic koreninskih šišk si zagotovijo neprekinjen dotok hranil tako, da z izločki dorzalnih in ventralnih žrelnih žlez spodbudijo nastanek nekaj dvojedrnih celic, običajno šest. Po nekaj ciklih mitoze brez sočasne delitve celic nastanejo večjedrne gigantske celice. Gigantske celice se navadno razvijejo iz ene same celice, ki vsebuje tudi do 80 jeder. Vsako posamezno jedro znotraj gigantske celice pa ima lahko tudi do 8-krat večje število kromosomov (Wiggers in sod., 1990). Gigantske celice so lahko tudi do 400-krat večje od posameznih vaskularnih celic v korenini. Značilno za gigantske celice je povečana gostota citoplazme in zamenjava večjih vakuol z manjšimi. V teh celicah najdemo dobro razvite Golgijeve aparate, gladek endoplazmatski retikulum,

povečano število mitohondrijev, plastidov in ribosomov. Zaradi uvihane celične stene ima gigantska celica povečano površino, da poveča prenos hranil iz vaskularnega sistema (Perry in Moens, 2011).

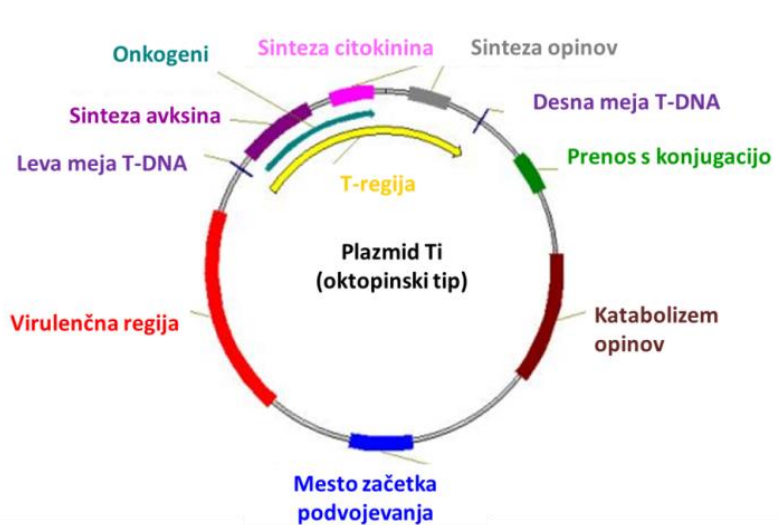
Gala, ki jo opazimo na površini korenine, je posledica celične delitve in hipertrofije koreninskega tkiva v okolici prisesane ličinke in nastale gigantske celice (Wyss in sod., 1992). Aktivacijo celičnega cikla v parenhimatskih celicah pericikla in ksilema povezujejo s prisotnostjo citokininov iz lizatov različnih ogorčic koreninskih šišek, ki naj bi jih izločale v napadeno tkivo (Goverse in sod., 2000; De Meutter in sod., 2003). Sočasno se v začetnih fazah nastajanja mesta prehranjevanja v koreninah napadenih z *Meloidogyne* sp. poveča odzivnost na avksin. Avksin je potreben za nastanek gale, ne pa tudi v kasnejših fazah rasti gigantske celice (Hutangura in sod., 1999; Grunewald in sod., 2009). Velikost gal je odvisna od vrste ogorčice in od gostiteljske rastline. Od vrste ogorčice je odvisna tudi oblika gale, oblika jajčne vrečke ter položaj gale na korenini (Perry in Moens, 2011).

Ogorčice *Meloidogyne* se levijo štirikrat. Po vstopu ličinke J2 v korenino in vzpostavitvi prehranjevalnega mesta se ličinka levi še dvakrat, v J3 in J4 stopnjo, in ob tem spreminja svojo obliko iz cevaste v stekleničasto in nazadnje v okroglo, jabolki podobno obliko odrasle samice *Meloidogyne*. Kutikula na površini ličink se ne zamenja popolnoma, ampak se del nje absorbira. Hitrost levitev iz ene stopnje v drugo je različna. Ob ugodnih pogojih se po 14-ih dneh ličinka J2 prelevi v tretjestopenjsko ličinko (J3). Naslednja levitev iz J3 v odraslo samico pa je hitrejša, okoli 4 - 6 dni (Perry in Moens, 2011).

Rastlinsko parazitske ogorčice se razmnožujejo spolno in nespolno. V obsežnem mednarodnem projektu International *Meloidogyne* Project, Triantaphyllou (1985) so primerjali razmnoževanje med okoli 600 populacijami iz 24 vrst. Zaključili so, da je značilnost vrst *Meloidogyne* mejotična in mitotična partenogeneza, skupaj z različno stopnjo poliploidije in aneuploidije. Najpogostejša oblika nespolnega razmnoževanja pri mnogih vrstah ogorčic *Meloidogyne* je obligatna mitotična partenogeneza (apomiksičnost). Izjema je vrsta *M. hapla*, kjer v populaciji prevladuje fakultativna mejotična partenogeneza (avtomiksičnost), v manjšem delu iste populacije pa mitotična partenogeneza. Pri vrstah, ki se razmnožujejo s fakultativno ali obligatno partenogenezo, kot sta *M. hapla* in *M. incognita*, najdemo različna razmerja med spoloma. Na razmerje med ženskim in moškim spolom najverjetneje vpliva okolje (Perry in Moens, 2011).

2.4 RAK KORENINSKEGA VRATU

Prvi opisi bolezni raka koreninskega vratu segajo v leto 1853, ko sta Fabre in Dunal tumorske tvorbe na koreninskem vratu opisala kot neoplastično bolezen, ki prizadene številne rastlinske vrste (Escobar in Dandekar, 2003). Izraz neoplazija je skovanka dveh grših besed: nova (neo-) in nastanek (-plazija), ki se uporablja za označevanje nenormalnih tvorbo nastalih z nenadzorovano delitvijo celic. Petintrideset let kasneje je Fridriano Cavara opisal bakterijo *Bacillus ampelosorae* in jo označil za povzročitelja raka na vinski trti in tako bolezen povezal z bakterijo (Cavara, 1897, cit. po Escobar in Dandekar, 2003). Leta 1907 sta Smith in Townsend kot povzročitelja raka na koreninskem vratu navadne marjetice (*Bellis perennis*) identificirala bakterijo *Bacterium tumefaciens* (danes *Agrobacterium tumefaciens*) (Escobar in Dandekar, 2003). Tumorske tvorbe naj bi bile posledica "tumor-inducirajočega načela" (TIP – *tumor-inducing principle*), ki se prenese iz bakterije v gostiteljsko celico in normalno celico preobrazi v tumorsko (Braun, 1947, cit. po Gelvin, 2003). Šele v 70-ih letih prejšnjega stoletja so ugotovili, da je TIP pravzaprav T-DNA (ang. *transferred-DNA*). T-DNA je del regije na bakterijskem plazmidu Ti (Sl. 2), ki se vgradi v rastlinski genom (Chilton in sod., 1977). To je bil prelomni trenutek v zgodovini raziskav agrobakterij, ne le kot rastlinskega patogena, ampak tudi kot sredstva za prenos genov med kraljestvi.

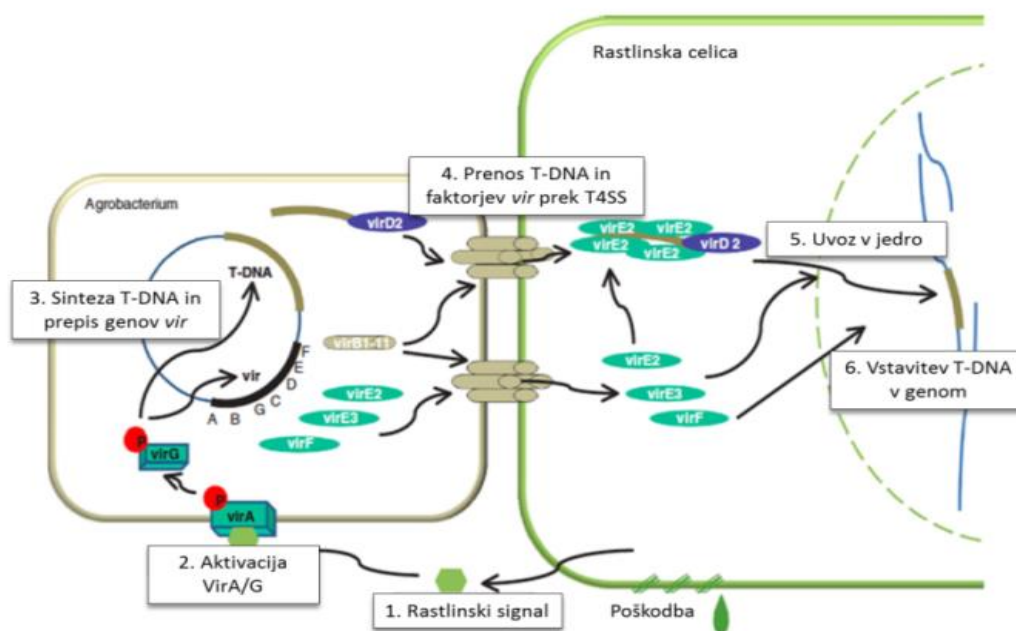


Slika 2: Položaj genov na oktopinskem tipu plazmida Ti (Dharajiya, 2015).

Patogeneza agrobakterij je edinstvena med bakterijami. Največ raziskav je bilo narejenih na vrsti *A. tumefaciens*, katere patogeneza je postala model horizontalnega prenosa genov med bakterijami ter od bakterij na višje organizme. Zaporedje dogodkov v patogenezi je podobno kot pri drugih rastlinskih ali živalskih patogenih (Sl. 3). Da lahko povzroči bolezen mora bakterija naprej (1) prepoznati signal in se orientirati proti gostitelju, (2) vzpostaviti stik s površino gostitelja, sprva reverzibilno nato irreverzibilno, (3) sestaviti

kanal za prenos T-DNA v gostiteljsko citoplazmo (sekrecijski sistem tipa 4 – T4SS), (4) prenesti T-DNA v jedro gostitelja, (5) vključiti zapis v njegov genom in (6) izraziti zapisane gene patogenosti za pričetek delitve gostiteljskih celic in nastanek tumorjev (Escobar in Dandekar, 2003).

Simptomi okužbe s patogenimi agrobakterijami so v večji meri odvisni od plazmida, ki se nahaja v določenem sev agrobakterij. Odstranitev plazmida oz. kuracija iz celice in nadomestitev z drugim tipom plazmida lahko spremeni bolezenske znake (Lam in sod., 1984). Pravzaprav ima velik vpliv na simptomatiko bolezni tudi kromosomsko ozadje seva, ki nosi plazmid Ti (Hood in sod., 1987). Plazmidi Ti (pTi) so dvoverižne krožne molekule DNA, ki se nahajajo v patogenih agrobakterijah (Van Larebeke in sod., 1974). Velikosti pTi so različne in segajo od 180 do 800 kbp (Gelvin, 2003). Največja regija na pTi je virulenčna regija (*vir*) z geni za prenos T-DNA v gostiteljsko celico in njeno vgradnjo v gostiteljski genom. Na plazmidu se nahajajo še geni, ki sodelujejo pri konjugaciji (*tra*), katabolizmu opinov ter regija T, ki nosi zapis za T-DNA, ki se v končni fazi vgradi v rastlinski genom. Velikost T-regije je med 10 in 30 kbp in jo sestavlja več genov, katerih produkti so encimi za izgradnjo rastlinskih hormonov (citokini in avksini) odgovornih za nastanek bolezni v gostiteljski rastlini (Sl. 2).



Slika 3: Shematični prikaz zaporedja v patogenezi *Agrobacterium* sp..(1) prepoznavna rastlinskih signalov; (2) aktivacija dvokomponentnega signalnega sistema VirA/G; (3) aktivacija genov virulence in sinteza T-DNA; (4) prenos T-kompleksa preko sekrecijskega sistema tipa IV; (5) prenos T-kompleksa v jedro in (6) vgraditev T-DNA v genom gostitelja (Pitzschke in Hirt, 2010).

Na T-DNA se nahaja zapis za sintezo opinov, ki ga po vgradnji v genom prične proizvajati gostiteljska celica in izločati v okolico. Opini so konjugirane spojine aminokislin in sladkorjev ter predstavljajo vir ogljika in včasih dušika za bakterije, ki nosijo pTi in so zato

sposobne katabolizirati opine. Čeprav opini nimajo večje vloge pri nastanku tumorjev, pa spodbujajo kemotakso in konjugativni prenos pTi med agrobakterijami (Kim in sod., 2001). Najbolj pomembna sta dva opina: oktopin in nopalin. Oktopin nastane iz aminokislin arginin in alanin, nopalin pa iz arginina in glutamina. Nopalinski tip plazmida Ti nosi zapis za encim, ki sintetizira *trans*-zeatin (*tzs*), in se nahaja v regulonu *vir* (Hwang in sod., 2010). Ta encim je odgovoren za povečano sintezo citokinina v agrobakterijskih sevih z nopalinskim tipom pTi. Manjši vir citokinina predstavlja izopentenilirana prenosna RNA (tRNA), katere sintezo nadzirajo geni na bakterijskem kromosomu in so prisotni v vseh sevih agrobakterij (Gray in sod., 1996). Agrobakterije z oktopinskim ali noplinskim tipom pTi imajo v okolju, kjer se nahajajo opini, selekcijsko prednost. Večjih razlik med oktopinskim in nopalinskim tipom pTi ni. Regija T je skupna obema, vendar je običajno oktopinska T-DNA krajša. Regija T je omejena z zaporedjem, ki je enako na levi in desni strani regije. Ti dve mejni zaporedji sodelujeta pri prenosu T-DNA v gostiteljsko celico (Gelvin, 2003).

Na površini patogenih agrobakterij se nahajajo receptorji za zaznavo kemijskih signalov, ki izhajajo iz poškodovanega rastlinskega tkiva in tako usmerijo agrobakterije v bližino poškodovanih rastlin. Zaznava gostitelja poteka pri patogenih agrobakterijah preko dvokomponentnega signalnega sistema VirA/G (Stachel in Zambryski, 1985). VirA je transmembranski protein s kinazno aktivnostjo na notranji strani celične membrane. Po prepoznavi signala iz okolice se VirA aktivira in fosforilira citoplazemski protein VirG, ki deluje kot odzivni regulator (Wolanin in sod., 2002). Prek VirA receptorja patogene agrobakterije v okolici zaznajo fenole, aldozne monosaharide, nizko vrednost pH ter nizko koncentracijo fosfatnih ionov (Palmer in sod., 2004; Brencic in Winans, 2005). Aktiviran protein VirG deluje neposredno na izražanje genov povezanih z virulenco, in sicer kot transkripcijski dejavnik z vezavo na promotorske regije operonov *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* in *virG* na plazmidu Ti (Sl. 2, Sl. 3, virulenčna (*vir*) regija) (Brencic in Winans, 2005). Ključnega pomena za okužbo in transformacijo gostitelja je prisotnost fenolnih spojin (npr. acetosiringoni in hidroksi acetosiringoni), ker le-te aktivirajo izražanje virulenčnih genov z regije *vir*, medtem ko ostali signali le vzdražijo receptor VirA (Shimoda in sod., 1990).

Po aktivaciji genov *vir* vzpostavijo agrobakterije intimni stik z rastlinsko celico. Ta je nujen za prenos T-DNA v gostitelja. Za specifično vezavo so odgovorni agrobakterijski kromosomski geni in ne prisotnost pTi (Douglas in sod., 1982). Šibko povezavo zagotavljajo acetilirani poliasaharidi, čemur sledi močnejša vezava s celuloznimi fibrili (Gelvin, 2000). Molekula T-DNA se skupaj z ostalimi proteini Vir prenese v rastlinsko celico prek proteinskega kompleksa sestavljenega iz proteinov VirB in VirD4, ki služi kot kanal in pripada sekrecijskemu sistemu tipa 4 (T4SS). T4SS imajo tudi druge gramnegativne bakterije, saj je ta sistem pomemben pri konjugativnem prenosu plazmidov med bakterijami, kot tudi pri prenosu virulenčnih dejavnikov iz patogena v gostiteljsko celico (Cascales in Christie, 2003). Znotraj gostiteljske celice se T-DNA premesti v jedro,

kjer se vgradi v kromosom gostitelja. Z izražanjem genov s T-DNA se prične rastlinska celica nenadzorovano deliti in hkrati proizvajati opine (Pitzschke in Hirt, 2010).

Nenadzorovana delitev transformirane rastlinske celice in nastanek tumorja je posledica porušenega ravnovesja med rastlinskimi hormoni ter spremenjenega odziva na te hormone. Oktopinska T-DNA nosi pet onkogenov, in sicer *iaaM*, *iaaH*, *ipt*, *6b* in *5*. Encim triptofan monooksigenaza *iaaM* pretvori triptofan v indol-3-acetamid, ki se nadalje pretvori v rastlinski hormon avksin (IAA - indol očetna kislina) v reakciji, ki jo katalizira indolacetamid hidroksilaza *iaaH*. Produkt gena *ipt* pa sodeluje pri sintezi prekurzorjev rastlinskega hormona citokinina. Povečana količina avksina in citokinina vodi v nenadzorovano delitev celice in tumorigenezo. Ostala dva gena, *6b* in *5*, spremenita odzivnost celice na hormone. Produkt gena *6b* poveča občutljivost za avksin in zmanjša občutljivost za citokinin, medtem ko produkt gena *5* pretvarja triptofan v indol-3-laktat, ki deluje kot antagonist avksinu, saj tekmuje z avksinom za vezavo na avksin vezavne proteine (Escobar in Dandekar, 2003).

2.5 RASTLINSKI OBRAMBNI ODZIV

Rastline so sesilni organizmi in ob napadu ne morejo pobegniti, vendar še zdaleč niso nemočne. Tekom evolucije so rastline razvile obrambne mehanizme proti škodljivim organizmom, ki se razlikujejo od imunskega sistema pri živalih. Rastline nimajo mobilnih obrambnih celic in somatske prilagojene imunosti s protitelesi; imajo pa naravno, nespecifično imunost, ki se deli na dve skupini. Prva skupina je imunski odgovor sprožen ob prepoznavi vzorcev na molekulah tujih organizmov, ki jih rastlina prepozna kot tujke (PAMP, ang. *Pathogen Associated Molecular Pattern*). To imunost imenujemo s PAMP sprožena imunost (PTI, ang. *PAMP-triggered immunity*) (Nürnberger in sod., 2004; Boller in He, 2009). PTI se aktivira tudi ob prepoznavi ohranjenih molekulskih lastnosti večje filogenetske skupine mikrobov (MAMP, ang. *Microbe Associated Molecular Pattern*), ki se pogosto nahajajo na zunanji površini (npr. bakterijski flagelin, glivni hitin). PTI se aktivira takoj po vezavi PAMP ali MAMP molekul na posebne receptorje, ki sprožijo kaskadni prenos signala. Po vstopu ionov v celico se aktivirajo z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) (Zhang in Klessig, 2001). Rezultat je masovna proizvodnja reaktivnih oblik kisika (ROS), spremenjeno izražanje genov in ojačanje celičnih sten (Tsuda in Katagiri, 2010; Schwessinger in Ronald, 2012).

V drugo skupino rastlinske imunosti pa uvrščamo odpornost, ki se je evolucijsko razvila po PTI, potem ko so patogeni organizmi razvili mehanizme utišanja imunskega odziva rastline. Patogeni v notranjost rastlinske celice sprostijo virulenčne dejavnike imenovane efektorji. Če jih rastlina prepozna, se nanje odzove. To imunost imenujemo z efektorji sprožena imunost (ETI, ang. *effector-triggered immunity*) (Bonardi in Dangl, 2012; Gassmann in Bhattacharjee, 2012). Odgovor rastline z ETI se zgodi na mestu infekcije v

zelo kratkem času. Rastline prepoznajo prisotnost efektorskih molekul prek proteinov R, čemur sledi povečan vstop kalcijevih in kalijev ionov v rastlinsko celico, aktivira se pot MAPK, tvorijo se molekule ROS in končno se vključi še programirana celična smrt poznana kot hipersenzitivni odgovor (HR), ki se kaže v nekrozi tkiva okoli patogena. Rastlina z aktivacijo imunosti ETI prepreči širjenje patogena in se hkrati zaščiti pred nadaljnjimi napadi (Shah in Zeier, 2013). Sistemsko odpornost lahko sprožijo tudi nekatere kemikalije (benzotiadiazol (BTH), β -aminobutirat, 2,6-dikloroizonikotinat, metil jasmonat, *cis*-jasmonat) (Cohen in sod., 1994; Durner in Klessig, 1995; Wendehenne in sod., 1998; Orozco-Cárdenas in sod., 2001; Sahebani in sod., 2011; Oluwafemi in sod., 2013), nepatogeni organizmi, avirulentne oblike patogenov, nekompatibilne rase patogenov in celo virulentni patogeni, vendar le pod določenimi pogoji (npr. okoljski dejavniki, ki preprečijo stopnjevanje infekcije) (Agrios, 2005).

Eden od zgodnjih obrambnih odzivov rastline je tvorba reaktivnih oblik kisika (ROS). Zaradi ROS se sprožijo reakcije, ki impregnirajo celično steno rastlin z lignini, suberini, kalozo in tako ojačajo steno in onemogočijo vstop patogenim organizmom. Sledi sinteza protimikrobnih snovi, kot so s patogenezo povezani proteini PR, fitoaleksini ter različni transkripcijski dejavniki. Sistemski odziv rastline opisujemo kot povečano sposobnost obrambe ne le v primarno okuženih delih rastline, ampak tudi v neokuženih, oddaljenih tkivih (Jones in Dangl, 2006). Informacija o okužbi se v sistemskem odzivu prenaša z nizko-molekularnimi signalizacijskimi molekulami ali s hormoni. Glavni regulatorji naravne imunosti pri rastlinah so salicilna kislina (SA), jasmonska kislina (JA) in etilen (ET). Tvorba teh signalov variira v količini, sestavi in času. Na splošno velja, da se signalna pot SA aktivira med obrambo proti biotrofnim patogenom, medtem ko obramba proti nekrotrofom in poškodbam sloni na signalni poti JA (Jones in Dangl, 2006). Obe poti sta med sabo povezani, vendar na različnih ravneh, in na obe poti močno vpliva še tretja signala molekula - etilen (ET). Etilen se nakopiči v rastlini po napadu patogena, kar sproži kaskado v prenosu signala (Spoel in Dong, 2008).

2.5.1 Sistemska obramba v rastlinah

2.5.1.1 Sistemsko pridobljena odpornost ali SAR

Inducirano odpornost, ki se izrazi z nekrozo tkiva in hipersenzitivnim odgovorom, imenujemo sistemsko pridobljena odpornost ali SAR (ang. *Systemic Acquired Resistance*). Za SAR je značilno kopičenje salicilne kisline (SA) in sistemsko izražanje s patogenozo povezanih proteinov PR. Kopičenje SA je lokalno in sistemsko oz. skladno z razvojem sistemske odpornosti. Povečano izražanje proteinov PR je povezano z okužbami z nekrotizirajočimi patogeni in naznanja inducirano stanje odpornosti v rastlini. Značilna za SAR je dolgotrajna odpornost, saj se odpornost na patogena zvišuje ob zaporednih infekcijah. Kako močan SAR bo rastlina razvila, je odvisno od vrste in kultivarja

gostiteljske rastline, količine inokuluma patogenega organizma ter vrste oz. seva patogena. Za sprožitev odziva SAR je nujna prisotnost hormona SA. SA je majhna fenolna spojina, ki deluje kot signalna molekula v obrambnem odzivu rastline. Ob okužbi se poveča endogena koncentracija SA, ki nadalje aktivira izražanje proteinov PR v okolici okuženega mesta ter v oddaljenih delih, potem ko se sproži sistemski odziv SAR (Van Loon in sod., 1998). Na raven SA vplivata tudi ET, JA in abscizinska kislina (Pieterse in sod., 2012). Povečana koncentracija JA ali ET najverjetneje poveča občutljivost tkiva za nizke koncentracije SA (Lawton in sod., 1995; Schweizer in sod., 1997).

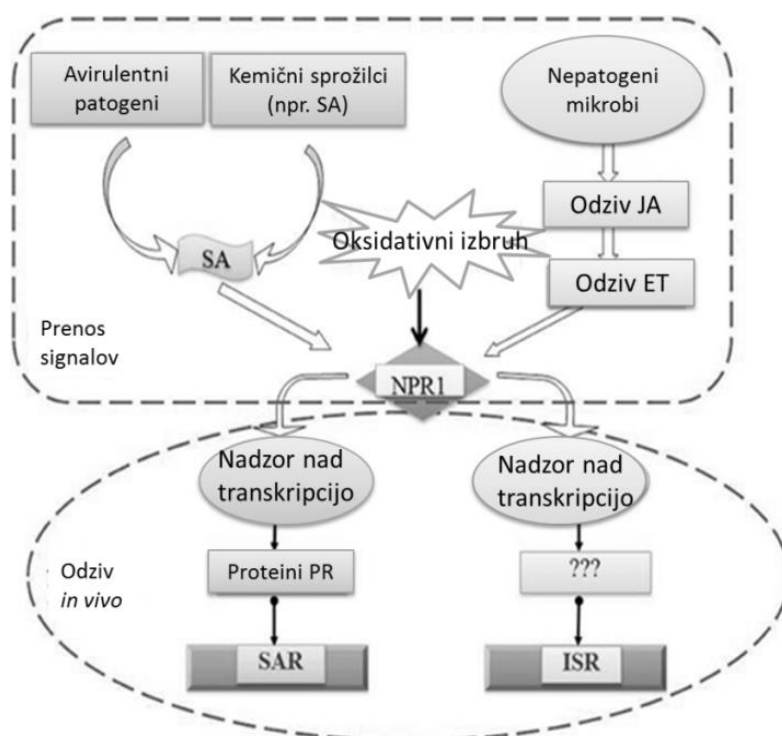
S patogenezo povezani proteini PR so skupina rastlinskih proteinov s pomembno vlogo v obrambi SAR pred patogenimi organizmi (Pieterse in sod., 1996; Siddiqui in Shaukat, 2004). Vsem proteinom PR je skupen antimikotični učinek, medtem ko imajo nekateri še dodatne antibakterijske, insekticidne, nematicidne in antiviralne lastnosti. Proteini PR so nizko-molekularni proteini (6 – 43 kDa), ki so stabilni pri nizkih vrednostih pH (< 3), so termostabilni in zelo odporni proti razgradnji s proteazami (Van Loon in Van Strien, 1999). Nahajajo se lahko v vakuolah ali v apoplastu, kjer se največkrat tudi kopičijo. Najdemo jih tudi v primarni in sekundarni celični steni okuženih rastlin. Razvrščamo jih v pet glavnih družin, od PR-1 do PR-5. Vsako družino sestavlja več proteinov s podobnimi lastnostmi. Do danes je prepoznanih že 14 družin. Lastnosti proteinov se med posameznimi družinami razlikujejo. Proteini PR iz družine PR-2 imajo β -1,2-glukanazno aktivnost, drugi delujejo kot hitinaze (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), proteinaze (PR-7), peroksidaze (PR-9), ribonukleaze (PR-10) ter lizocimi (PR-8). Nekateri proteini PR imajo lastnosti proteinaznih inhibitorjev (PR-6), drugi delujejo kot defenzini (PR-12), tionini (PR-13) in lipidni prenašalci (PR-14) in vplivajo na prepustnost membrane. Ostali so osmotini in taumatinu-podobni proteini (PR-5). Najbolj številni so proteini iz skupine PR-1, ki v okuženem tkivu predstavljajo kar 1 - 2 % od vseh proteinov v listu, vendar njihova vloga še danes ni jasna. Glede na podobnost proteinskega zaporedja med različnimi vrstami rastlin, so PR-1 zelo ohranjeni v rastlinah (Edreva, 2005).

Izražanje proteinov PR spodbudijo patogeni organizmi, žuželke, ogorčice ter rastlinojedci. Tudi nekateri kemični in fizikalni dejavniki lahko vplivajo na njihovo izražanje, to so salicilna in poliakrilna kislina, maščobne kisline, anorganske soli, poškodbe tkiva, UV-B sevanje, osmotski šok, nizke temperature, sušni stres in prisotnost reaktivnih oblik kisika (ROS) (Edreva, 2005).

2.5.1.2 Inducirana sistemska odpornost ali ISR

Nekateri sevi nepatogenih rizobakterij spodbujajo rast in povečajo odpornost rastlin na širok spekter povzročiteljev bolezni. Takšno inducirano aktivno odpornost imenujemo inducirana sistemska odpornost imenovana ISR (ang. *Induced Systemic Resistance*). Oba odziva, ISR in SAR, sta sistemska. ISR se sproži v rastlini ob okužbi z nekaterimi

bakterijami, predvsem z rizobakterijami, kjer okužba poteka brez vidnih simptomov bolezni na gostitelju (Sl. 4). Pravzaprav delujejo nekatere rizobakterije stimulatивно na gostiteljevo rast. Obramba, ki jo rastlini posredujejo rizobakterije, je učinkovita proti širokemu spektru patogenov na dvokaličnicah (Bakker in sod., 2007; Van Wees in sod., 2008). ISR se aktivira ob prisotnosti hormonov JA in ET, vendar aktivacija ni povezana z endogenim zvišanjem koncentracije teh dveh hormonov, ampak z močnejšim izražanjem genov, ki so nadzorovani z JA in ET (Pieterse in sod., 2000; Van der Ent in sod., 2009). Značilno za odziv ISR je tudi slabše izražanje ali odsotnost nekaterih proteinov PR, predvsem PR-1, poveča se sinteza fitoaleksinov in opazne so spremembe v celični steni korenin (Van Loon in sod., 1998).



Slika 4: Primerjava odziva ISR s SAR. Prenos signala pri ISR v večini primerov poteka po poti jasmonske kisline (JA) in kasneje po poti etilena (ET). Potreben je tudi pozitivni regulator (NPR1), ki se aktivira ob zaenkrat še neznanih signalizacijskih poteh navzdol od poti ET. Temu sledi sprožitveni odziv. To pomeni, da po aktivaciji ISR ni takojšnjega prepisovanja genov, ampak je obrambna sposobnost gostiteljske rastline povečana takoj ob napadu patogena (Chan, 2013).

V navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) so identificirali gene, ki se aktivirajo med okužbo z nepatogenim rizobakterijskim sevom *Pseudomonas fluorescens* WCS417. Med identificiranimi geni so odkrili tiste, ki so nujno potrebni za sprožitev odziva ISR. V pot signalizacije z JA so vpleteni geni *jar1*, *myc2*, *eds8* in *coi1* (Pieterse in sod., 1998; Ton in sod., 2002; Pozo in sod., 2008); gena *etr1* (*ethylene responsive*), *ein2* (*ethylene insensitive*) pa v signalizacijo z ET (Pieterse in sod., 1998; Knoester in sod., 1999). Za sprožitev ISR se mora rastlina odzivati na JA ali ET. Rastline paradižnika z okvarjenim odzivom na ET (mutanta *Never ripe*) ali JA (*def1* mutanti) ne morejo sprožiti ISR ob

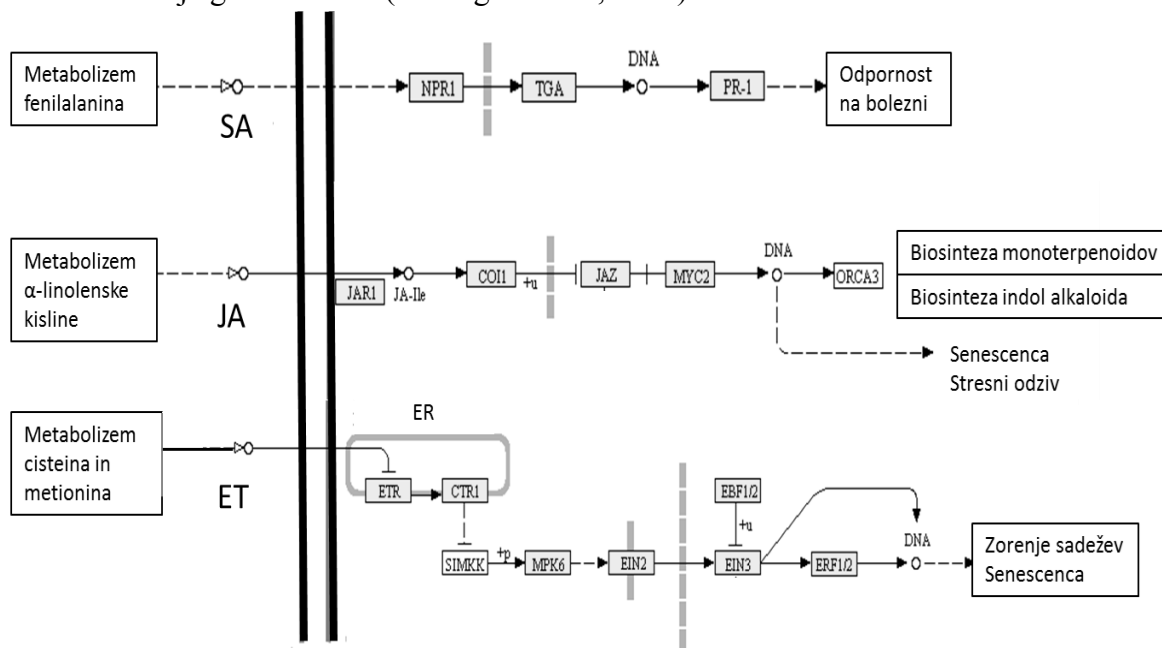
napadu oomicete *Phytophthora infestans*, kljub prisotnosti rast-spodbujajočih rizobakterij *Bacillus* spp. ali *P. fluorescens* na površini korenin (Yan in sod., 2002). Čeprav se rastline na rizobakterije odzivajo s hormonom JA in ET, pa nekateri sevi rizobakterij aktivirajo SAR. To so rizobakterije, ki proizvajajo hormon SA. Sev *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 proizvaja SA in sproži SAR v fižolu (De Meyer in Höfte, 1997) in tobaku (Audenaert in sod., 2002). Če tobak nosi bakterijski gen za salicilat hidroksilazo *nahG*, ki pretvarja SA v katehol in tako prepreči kopičenje SA, se ob prisotnosti seva 7NSK2 SAR ne aktivira (Audenaert in sod., 2002).

Količina JA in ET v rastlini se po inokulaciji z rizobakterijami in aktivaciji odziva ISR ne poveča. Poveča se občutljivost na ta hormona in ne njuna količina. To senzitacijo imenujemo »priming« oziroma sprožitveni odziv, ki ga označuje hitrejši in močnejši odziv celične obrambe po napadu patogena (Conrath in sod., 2006; Conrath, 2011; Pastor in sod., 2012). Molekulski mehanizmi priminga so še neraziskani. Ena od hipotez pravi, da stanje povečane senzitacije temelji na kopičenju ali post-translacijski modifikaciji enega ali več signalnih proteinov, kateri po izražanju in/ali modifikaciji ostanejo neaktivni. Ob prepoznavi patogena ali drugega stresnega signala, se sproži hitrejša in močnejša obrambna reakcija prav zaradi pripravljenosti rastline na obrambo. Signali za pospešeno izražanje obrambnih genov so v večini primerov SA, JA in ET, pri čemer so jasmonati najučinkovitejši (Pozo in sod., 2005). Na primer, v rižu JA spodbudi izražanje gena za protein PR-1, ki se je aktiviral po napadu glive *Magnaporthe grisea*, ter tako zviša raven zaščite posredovane s SA proti glivi (Schweizer in sod., 1997). Zelo verjetno je, da so v priming vpleteni številni transkripcijski dejavniki, kot so dejavniki iz družin transkripcijskih dejavnikov MYC in AP2/ERF (Conrath in sod., 2006). Dejavniki MYC2 imajo dokazano osrednjo vlogo v signalizacijskih poteh JA in abscizinske kisline (Sl. 5) (Dombrecht in sod., 2007).

Kljub visokemu izražanju genov transkripcijskih dejavnikov kot je MYC2, se v rastlini ne poveča izražanje obrambnih genov, ki so pod njihovim nadzorom. Vse to nakazuje na neaktivnost transkripcijskih dejavnikov, vse dokler rastlina ne zazna prisotnosti patogena. Najverjetneje so v aktivacijo poti vpleteni še post-translacijski mehanizmi. Znano je, da se ob indukciji s kemikalijo BTH, ki je analog SA, v rastlini začnejo kopičiti z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK). Te se aktivirajo po sekundarnem signalu, kot je stres, zato predvidevajo, da so proteini MAPK vpleteni tudi v odziv priminga (Conrath, 2011).

Verhage in sod. (2011) so ugotovili, da se pot JA deli na dve antagonistični veji. Prva veja se aktivira ob napadu herbivornih žuželk in je pod nadzorom transkripcijskega dejavnika MYC2. Aktivacija genov z MYC2 vodi v povečano izražanje gena VSP2 v *A. thaliana*. Druga veja vključuje obrambo rastline pred nekrotrofi in jo spremlja izražanje genov pod

nadzorom transkripcijskih dejavnikov iz družine ERF. V *A. thaliana* tovrstna aktivacija vodi v izražanje gena PDF1.2 (Verhage in sod., 2011).



Slika 5: Shematski prikaz prenosa signala, ki ga sprožijo hormoni SA, JA in ET v *Arabidopsis thaliana* (KEGG sly04075) (Kanehisa in Goto, 2000; Kanehisa in sod., 2014).

2.5.1.3 Vloga etilena v obrambnem odzivu rastlin

Etilen (ET) ni vpleten samo v obrambno pot JA/ET, ampak med drugim uravnava tudi kaljenje semen, rast korenin in izražanje koreninskih laskov, razvoj cvetov, zorenje sadežev, senescenco ter biotični in abiotični (npr. rane, hipoksija, pohladiitev) stres. Med napadom patogenov je sinteza ET uravnavana prek nadzora nad prepisom dveh genov, ki nosita zapis za ACC sintazo (ACS) in ACC oksidazo (ACO). Encim ACC sintaza (ACS) katalizira pretvorbo S-adenozil-L-metionin v aminociklopropan-1-karboksilno kislino (ACC), ki ga encim ACO oksidira v ET (Argueso in sod., 2007). Oba gena sta del velike multigenske družine, katerih člani se različno izražajo tako v času kot prostoru. Rastlina zazna ET prek etilenskih receptorjev (ETR). V paradižniku je najbolj znan receptor ETR3 ali *nr*, saj njegov okvarjen gen nosi genotip paradižnika *Never Ripe*. V odsotnosti ET delujeta receptorja ETR3 in ETR4 kot negativna regulatorja v signalni poti ET. Inducirata pa se ob okužbi s patogenimi organizmi (Tieman in sod., 2000; Ciardi in sod., 2001; Mantelin in sod., 2013). ET reagira tudi z indol očetno kislino (IAA) oz. avksinom. Avksin lahko zmanjša vpliv ET na zorenje in senescenco (Lin in sod., 2009). Po drugi strani pa lahko avksin poveča hitrost proizvodnje ET, saj v mnogih rastlinah avksin aktivira nekatere gene ACS (Arteca in Arteca, 2008).

2.5.1.4 Signalne poti SA in JA/ET so prepletene

Signalne poti obrambe v rastlinah so zapletene. Preplet različnih poti omogoča rastlini, da se odloči za najprimernejšo in najučinkovitejšo obrambo, ki jo v danem trenutku potrebuje. Lahko se aktivira zgolj ena signalna pot, ki utiša ostale poti, lahko pa se aktivira več signalnih poti in tako dodatno poveča obrambo rastline. Signalne poti SA, JA in ET so med sabo prepletene, pri čemer lahko na obrambni odziv delujejo kooperativno, sinergistično ali antagonistično (Pieterse in sod., 2001; Pieterse in Van Loon, 2004).

JA in ET navadno delujeta sinergistično, kadar mora rastlina aktivirati obrambne gene (Penninckx in sod., 1998). Lahko pa pride do antagonističnega učinka med JA in ET signalizacijsko potjo, kar se kaže tudi v odzivu rastline na poškodbe. Primer sinergističnega učinka je povečano izražanje gena za defenzin PDF1.2 v *A. thaliana* ob okužbi s patogeni, kjer morata biti obe poti aktivirani za izražanje gena PDF1.2 (Penninckx in sod., 1998). Za aktivacijo obeh poti se mora prepisati tudi gen za protein ERF1 (*ethylene-responsive factor 1*), ki nadzira številne gene pod nadzorom tako JA kot ET, in tako združi obe signalni poti (Lorenzo in sod., 2003). Primer antagonističnega delovanja je z ozonom (O₃) sprožena celična smrt, kjer ET spodbuja celično smrt, JA pa ščiti rastlinska tkiva. V zgodnjem odzivu na ozon se v rastlini poveča sinteza ET, ki zavre pot JA. Ob večji poškodbi tkiv pa se nakopiči JA in prekine proces celične smrti, ki ga posreduje ET (Tuominen in sod., 2004).

Pot signalizacije s SA deluje antagonistično na pot JA, in obratno. Ob aktivirani poti SA je močno zavrt obrambni odziv z JA (Van Wees in sod., 1999; Van Wees in sod., 2000). Na tak način rastlina izbere pot SA, ki je najbolj učinkovita proti določenemu tipu patogenov (npr. biotrofom), in hkrati zavre od JA odvisno obrambo, ki je učinkovita proti drugemu tipu patogenov (npr. nekrotrofom). Obe signalni poti sta med sabo povezani preko proteina NPR1 (ang. *non-expressor of pathogenesis-related genes*) (Sl. 4). Pri obrambi SAR deluje NPR1 kot transkripcijski koaktivator genov PR (Kinkema in sod., 2000) in hkrati nadzoruje več kot 95 % genov, ki se odzivajo na BTH (benzotiadiazol), analog hormona SA (Wang in sod., 2006). NPR1 nadzira tudi izražanje drugih transkripcijskih dejavnikov, kot so dejavniki iz družine WKRY (Wang in sod., 2006), ki vplivajo na prenos signala in tako nadzorujejo hitrost obrambnega odziva (Pajerowska-Mukhtar in sod., 2013). Na aktivnost NPR1 najverjetneje vpliva SA, saj se ta neposredno veže na protein (Wu in sod., 2012). Vezava SA sproži konformacijsko spremembo v strukturi proteina NPR1 in tako prepreči njegovo razgradnjo (Spoel in sod., 2009).

Ali ima NPR1 enako vlogo pri odzivu ISR za enkrat ni znano. Vemo, da je nujen za aktivacijo ISR pri *A. thaliana* po kolonizaciji korenin s številnimi ISR-inducirajočimi sevi, ter da ne aktivira izražanje proteinov PR. Čeprav sta poti SA in JA negativno regulirani druga z drugo, pa se lahko aktivirata sočasno, kar dodatno poveča obrambno pripravljenost

rastline. Vse kaže, da ima protein NPR1 vlogo v nadzoru in povezavi obeh različnih hormonskih obrambnih poti. Aktivna vloga NPR1 je omejena na jedro, kadar je pod nadzorom SA, ter na citosol, kadar sodeluje v JA/ET poti. Natančen mehanizem citosolnega NPR1 proteina še ni razvozan (Seyfferth in Tsuda, 2014). Povezovalci med SA in JA signalno potjo so tudi transkripcijski aktivatorji WRKY. V *A. thaliana* dejavnik WRKY70 deluje kot aktivator genov, ki se odzivajo na SA, ter represor genov, ki se izražajo v poti JA (Li in sod., 2004).

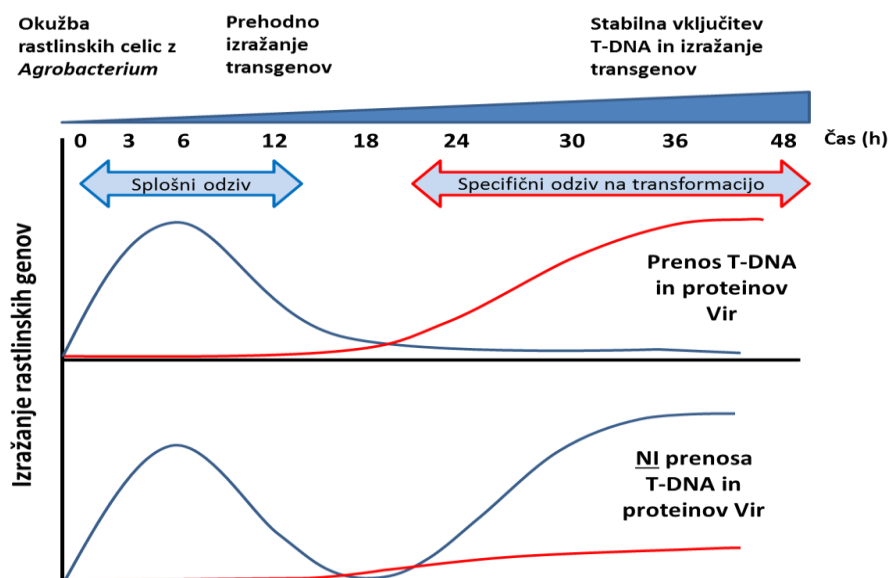
Z globalno analizo transkripcijskega profila je postalo jasno, da SA in JA določene gene skupaj aktivirata in druge skupaj represirata, kar je očiten znak prepletenosti obeh signalizacijskih poti (Glazebrook in sod., 2003). Pravzaprav naj bi bil antagonizem med SA in JA določen s koncentracijo obeh hormonov. Pri nižji koncentraciji obeh dveh je učinek sinergističen, medtem ko je ob višjih antagonističen (Mur in sod., 2006). Poleg tega pa aktivacija poti ET prepreči utišanje poti JA s SA (Leon-Reyes in sod., 2010). Katagiri in Tsuda (2010) sta predlagala model aktivacije imunosti v rastlinah, kjer rastline sprva aktivirajo vse tri poti (SA, JA in ET), vendar šibko. Če patogen vztraja, se rastlina naknadno odloči za povečano aktivacijo najučinkovitejše poti. Model še ni splošno sprejet, a če velja, potem vpliva na odziv rastline ob naknadnih okužbah z drugimi vrstami patogenih organizmov (Wondafraash in sod., 2013).

2.5.2 Obramba rastline proti agrobakterijam

Med napadom virulentnega patogena odpovejo v rastlini običajni mehanizmi obrambe, saj patogeni organizem zavre obrambne reakcije, ali se nasploh izogne aktivaciji obrambe, ali pa se uspešno izogiba učinkom aktivne obrambe. Če rastlini uspe aktivirati obrambo preden patogen vstopi vanjo, lahko zmanjša bolezenska znamenja. Rastline se na agrobakterije odzovejo podobno kot na ostale bakterijske rastlinske patogene (Veena in sod., 2003; Zipfel in sod., 2006, 2009). Agrobakterije so v veliki meri podobne simbiotskim rizobakterijam (*Rhizobium* spp.). Da lahko patogene agrobakterije transformirajo rastlino in povzročijo nastanek tumorjev morajo zamaskirati svoje delovanje v rastlini.

Rastlina prepozna prisotnost bakterij preko molekul MAMP, ki jih nosijo tudi agrobakterije. Vendar se rastlina na agrobakterije ne odzove s splošnim obrambnim odzivom značilnim ob prepoznavi mikrobov. *Agrobacterium* sp. spremeni izražanje gostiteljskih genov, zlasti genov vpletenih v obrambo rastline. Na celični kulturi *Ageratum conyzoides* okuženi z *Agrobacterium* sp. so z metodo cDNA-AFLP identificirali prepise RNA vpletene v obrambne reakcije (Ditt in sod., 2001). Kasneje so našli negativno povezavo med uspešnostjo transformacije in stopnjo izražanja obrambnih genov (Ditt in sod., 2005). Skupina Veena in sod. (2003) je na celični kulturi tobaka BY-2 s pomočjo DNA makromrež ločila odziv gostitelja na *Agrobacterium* sp. na dve fazi. V začetnih stopnjah okužbe se je v gostiteljskih celicah sprožil splošni obrambni odziv, ki se je

kasneje zmanjšal zaradi bakterijskega posredovanja. Splošna obramba gostitelja je vztrajala v kasnejših stopnjah le ob okužbi z nepatogenim sevom *Agrobacterium* sp. (Sl. 6) (Veena in sod., 2003).



Slika 6: Model odziva rastline na infekcijo z *Agrobacterium tumefaciens* (Veena in sod., 2003). Prvih 12 h po infekciji se aktivira splošni odziv rastline, vendar se le-ta močno utiša po uspešni transformaciji, kateri sledi izražanje bakterijskih genov. Če do transformacije ne pride, se po določenem času splošni odziv rastline zopet poveča.

V patogenezi agrobakterij se prepletajo učinki več rastlinskih hormonov. Agrobakterije tudi same sintetizirajo fitohormona avksin in citokinin, da preoblikujejo odziv rastline v svojo korist. Tretiranje rastlin z avksinom ali citokininom poveča učinkovitost prenosa T-DNA in stabilizira njegovo integracijo v genom (Chateau in sod., 2000) ter rast tumorja (Gafni in sod., 1995). Podatki iz mikromrež transkriptoma *A. thaliana* po inokulaciji seva *A. tumefaciens* C58 v steblo kažejo, da geni vpleteni v sintezo in signalizacijo s fitohormoni nimajo povečanega izražanja v času 3 h po inokulaciji (Lee in sod., 2009). V tem časovnem okviru agrobakterija še ni prenesla T-DNA v gostitelja. V začetnih fazah agrobakterije najverjetneje same sintetizirajo hormone, da vplivajo na transformacijo. Kasneje, ko se znotraj tumorja dvigne delež avksina ($>10 \mu\text{M}$) zaradi izražanja transformiranih genov, je rast agrobakterij in aktivacija virulenčnih genov zavrta (Liu in Nester, 2006; Gohlke in Deeken, 2014). Citokinin ima podobno vlogo (Hwang in sod., 2010), vendar pa povečana koncentracija citokinina pri vseh rastlinah ne vpliva na uspešnost transformacije. Agrobakterijski citokinin vpliva na izražanje gostiteljskih genov in na signalizacijsko pot citokinina v rastlini, saj stimulira izražanje receptorja At14a na površini rastlinske celice, na katerega se agrobakterije lahko pritrdijo (Sardesai in sod., 2013).

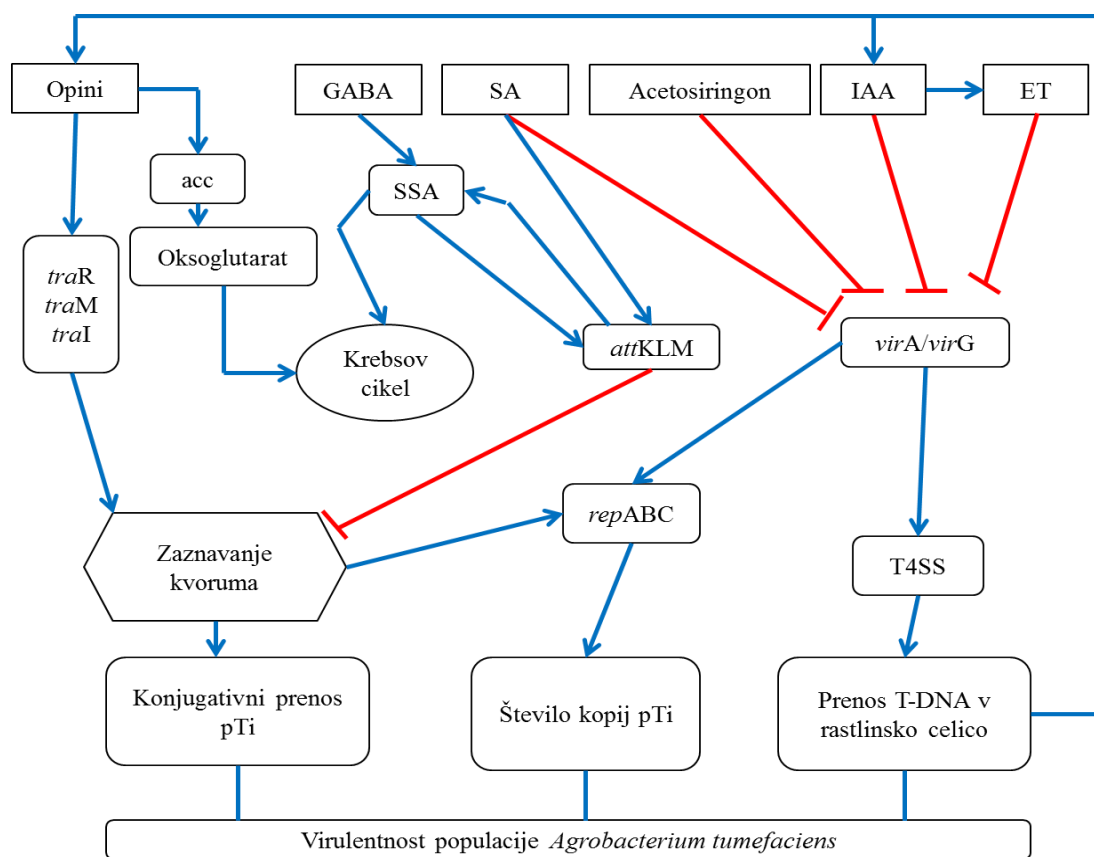
V tumorju (*A. thaliana*) so detektirali višje koncentracije SA in ET. JA nima očitnega vpliva na razvoj tumorjev, kot so to dokazali z uporabo genotipov z okvarjeno zaznavo JA (Lee in sod., 2009). Pomemben pa je ET. Visoke koncentracije bakterijskega avksina in citokinina stimulirajo sintezo in kopičenje ET v tumorjih (Aloni in sod., 1998). Markerski geni signalne poti SA (kot so proteini PR) v tumorju niso izraženi, verjetno zaradi visoke koncentracije avksina, ki inhibira SA in prepreči razvoj SAR (Robert-Seilanianantz in sod., 2011). Salicilna kislina vpliva posredno in neposredno na mikrobne povzročitelje bolezni. Znano je, da SA zmanjša vitalnost mikrobnih celic in proizvodnjo virulenčnih dejanikov v *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Prithiviraj in sod., 2005). V *A. tumefaciens* SA neposredno vpliva na zmanjšano izražanje virulenčnih genov, zmanjšano rast bakterij in njihovo pritrditev na gostiteljsko celico (Yuan in sod., 2007; Anand in sod., 2008). SA negativno vpliva na izražanje dvokomponentnega sistema *virA/G*, kar vodi v zmanjšano podvojevanje plazmida Ti. SA prav tako poveča izražanje genov v operonu *attKLM*, zaradi česar se poveča razgradnja bakterijske signalne molekule N-acilhomoserin laktona in omeji konjugacijo plazmida Ti (Sl. 7). Višje koncentracije SA zavirajo rast *A. tumefaciens*, vendar SA pri nižjih koncentracijah ovira vezavo na gostiteljsko površino in tvorbo biofilma (Yuan in sod., 2007). V poskusih na vrsti *Nicotiana benthamiana* so bile rastline, ki so jim dodali SA, bolj odporne proti okužbi z *A. tumefaciens*. Nasprotno pa so bile rastline z utišanimi geni za sintezo SA prekomerno občutljive za okužbo (Anand in sod., 2008).

Sistemiški odziv SAR lahko zmanjša občutljivost na bolezen raka koreninskega vratu. Odziv rastline na agrobakterije je najverjetneje odvisen od relativne in ne absolutne količine SA, ki se tvori po okužbi (Gaspar in sod., 2004). V *A. thaliana* se SAR aktivira ob prepoznavi molekul PAMP (Mishina in Zeier, 2007). Slab efektor odziva SAR je agrobakterijski flagelin, vendar bi lahko tudi elongacijski dejavnik EF-Tu aktiviral obrambo in omejil transformacijo (Zipfel in sod., 2006). Za odziv SAR je značilna povišana sinteza proteinov PR. Izražanje genov PR je odvisno od proteina NPR1. NPR1 pod vplivom SA aktivira transkripcijske dejavnike iz družine WRKY, ki povečajo izražanje genov PR. Predvideva se, da SA prepreči nastanek tumorjev po poti, ki je neodvisna od NPR1 (Yuan in sod., 2007).

Kljub prenosu bakterijskih proteinov v rastlinsko gostiteljsko celico, se v rastlini ne sproži hipersenzitivni odgovor (HR) z značilno nekrotizacijo tkiva, kateremu sledi aktivacija sistemske pridobljene imunosti (SAR). Pravzaprav je *A. tumefaciens* sposoben preprečiti aktivacijo odziva HR, ki ga inducira bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolus*, pri čemer imajo pomembno vlogo prav onkogeni za sintezo avksina na T-DNA (Robinette in Matthysse, 1990). Pred nastopom HR se v tkivu poveča količina vodikovega peroksida (H_2O_2). Peroksid deluje kot signalna molekula, ki sproži apoptozo, in aktivira gene za zaščito celice v sosednjih celicah (Levine in sod., 1994). Agrobakterije na kromosomu

nosijo gen za katalazo (Xu in Pan, 2000), da preprečijo kopičenje H_2O_2 v začetnih stopnjah infekcije, a se količina H_2O_2 z razvojem tumorja spet dvigne (Lee in sod., 2009).

V tumorju se močno izražajo geni gostitelja vpleteni v metabolizem in signalizacijo avksina in citokinina (Lee in sod., 2009). Skupaj z ET in abscizinsko kislino (ABA) ti hormoni uravnavajo razvoj tumorja in diferenciacijo celic v tumorju (Ullrich in Aloni, 2000). Z rastjo tumorja razpoka epidermalni sloj in z njim kutikula. Poškodovana površina je zaščitena s slojem suberina, ki polimerizira ob prisotnosti visokih koncentracij H_2O_2 . Suberinizacijo uravnavata ABA in ET ter vplivata na izražanje genov vpletenih v zaščito pred sušo (Veslov in sod., 2003; Efetova in sod., 2007). Znotraj tumorja nastaja tudi gama-aminobutirat (GABA) in vpliva na konjugacijo plazmida Ti (Sl. 7) (Yuan in sod., 2008a).



Slika 7. Model prenosa signalov med *Agrobacterium* in gostiteljsko rastlino (Yuan in sod., 2008a). Model prikazuje učinek rastlinskih signalov na virulenco bakterije in njeno zaznavanje kvoruma. Puščice nakazujejo aktivacijo in zaključene puščice inhibicijo. Acc – acc operon za razgradnjo opinov; SSA – sukcin semialdehid; T4SS – sekrecijski sistem tipa IV.

2.5.3 Odziv rastline na ogorčice koreninskih šišk

Ogorčice koreninskih šišk po vstopu v korenine gostiteljskih rastlin ostanejo v korenini dlje časa, zato so razvile mehanizme skrivanja pred obrambo rastline. Ob vstopu v korenino infektivne ličinke ne povzročijo večjih poškodb na tkivu. Rastlina zazna napad, a se nanj ne odzove burno. Eden od razlogov so levitve ličink. Od vstopa se ličinka levi še trikrat in vsakokrat spremeni svojo površino, da je rastlinski imunski sistem ne prepozna (Perry in Moens, 2011). Zgornja povrhnjica ličinke izloča molekule na površino kutikule in zato se površina nenehno spreminja in omogoča uspešno skrivanje ličinke pred obrambnimi mehanizmi gostiteljske rastline. Na površini kutikule se nahajajo tudi lektinom podobni proteini, ki lahko nase vežejo rastlinske ogljikove hidrate in zamaskirajo ličinko (Spiegel in McClure, 1995). Predvidevajo, da ličinke skozi hipodermis izločajo antioksidativne encime za zaščito pred oksidativnim izbruhom gostitelja, kot npr. v fitoparazitskih cistotvornih ogorčicah in humanih parazitskih glistah (Dubreuil in sod., 2011). V ličinkah *M. hapla* so odkrili efektorje podobne molekulam Nod, ki so značilni za simbiotske bakterije iz rodu *Rhizobium*. Predvidevajo, da so ti efektorji odgovorni za deformacije koreninskih laskov (Weerasinghe in sod., 2005). Na glavi ima ogorčica dve čutili imenovani amfidi za zaznavo okolja. Izločki amfid delujejo kot signalne molekule, ki sprožijo obrambni odziv v rastlini (Semblat in sod., 2001). Vendar, ogorčica skozi bodalo izloča različne efektorske molekule, ki zavrejo obrambo gostitelja in celo manipulirajo s signalnimi potmi v svojo korist. V izločkih bodala so identificirali že več kot 60 različnih proteinov (Jaubert in sod., 2005a). Večina je encimov, ki sodelujejo pri razgradnji celičnih sten, drugi vplivajo na obrambo gostitelja, tretja skupina pa spodbudi nastanek gigantskih celic (Davis in sod., 2004). Navkljub sistemom zamaskiranja svoje prisotnosti se v rastlini vključi imunski odziv kmalu po vstopu ličinke v korenino. Po vstopu ličink *M. incognita* se rastlina odzove s produkcijo peroksidaz, encimov za spreminjanje celične stene, aktivacijo genov LOX in s proteinaznimi inhibitorji (Gheysen in Fenoll, 2002). Med migracijo ličink cistotvornih ogorčic se rastlina odzove tudi s proizvodnjo ROS, nalaganjem kaloze in ojačanjem celičnih sten (Waetzig in sod., 1999).

Še danes ni jasno ali ogorčice sprožijo v rastlini odziv na poškodbe, ki je pod nadzorom hormona JA, ali odziv PTI ob prepoznavi molekul PAMP. Negostiteljske rastline se na cistotvorne ogorčice odzovejo z odzivom podobnim PTI. Kaloza se prične kopičiti v intercelularnem prostoru, celične stene se ojačajo in rastlina prične proizvajati reaktivne oblike kisika (Waetzig in sod., 1999). Oksidativni izbruh je hiter, a prehodne narave. Ogorčice koreninskih šišk izločajo encime, kot je glutation S-transferaza (v ličinkah *M. incognita*), ki detoksificirajo toksične radikale (Dubreuil in sod., 2007). V obsežni študiji so v gigantskih celicah z uporabo tehnologije mikromrež odkrili visoko število zavrtih obrambnih rastlinskih genov (Jammes in sod., 2005). Faringialne žleze ličink izločajo encim horizmat mutazo, homolog rastlinskemu encimu, ki sodeluje v poti šikimske kisline,

katere produkti so aromatske aminokisline, potrebne za sintezo avksina, flavonoidov, fitoaleksinov in SA.

Nekatere gostiteljske rastline prepoznajo efektorje ogorčic in sprožijo odziv ETI. To so odporni kultivarji gostiteljskih rastlin, ki nosijo gen *Mi*, katerega produkt (odpornostni protein R) prepozna efektor ogorčice (avirulenčni dejavnik) in sproži močan obrambni odziv s preobčutljivostno reakcijo (HR) in ustavi okužbo (Williamson, 1999). Eden prvih odkritih odpornostnih genov *R* je bil gen za receptorski protein *Mi-1.2*, ki posreduje odpornost paradižnika na *M. incognita* (Gleason in sod., 2008). *Mi-1.2* posredno prepozna protein ogorčice *Mi-Cg1* prek še neznanega efektorskega proteina. Rastline z genom *Mi-1.2* niso odporne le na *M. incognita*, ampak tudi na krompirjevo pršico *Macrosiphum euphorbiae*, paradižnikovo bolšico *Bactericera cockerelli* in belo muho *Bemisia tabaci* (Vos in sod., 1998; Nombela in sod., 2003; Casteel in sod., 2006). Po eni od domnev naj bi *Mi-1.2* ščitil rastlinski dejavnik, ki je tarča vseh štirih škodljivcev. Odziv ETI se na napad ogorčic zaključi s sprožitvijo celične smrti v celicah okoli prehranjevalnega mesta in odcepitvijo povezave z vaskularnim tkivom. Pri občutljivih rastlinah obramba rastline ne zaustavi ogorčic, vendar lahko obrambo ojačamo s foliarnim dodatkom jasmonatov, ki v rastlini spodbudijo tvorbo toksičnih spojin za ogorčice, in posledično zmanjšamo raven okužbe (Cooper in sod., 2005). Snovi, ki povečajo rastlinsko obrambo proti ogorčicam so jasmonati (Fujimoto in sod., 2011), SA (Nandi in sod., 2002; Naserinasab in sod., 2011), ET (Giazar in sod., 1983), arbuskularne glive (Diedhiou in sod., 2003; Vos in sod., 2013), nepatogene bakterije in rizobakterije (Hallmann in sod., 2001; Siddiqui in Shaukat, 2003, 2004; Siddiqui in sod., 2007; Shankar in sod., 2011; Aballay in sod., 2013), glivni endofiti (Keiwnick in Sikora, 2006; El-Fattah in sod., 2007; Martinuz in sod., 2013), deli bakterij (Ongena in sod., 2007) in nekatere kemikalije (Oka in sod., 2000).

Ogorčice koreninskih šišek so sedentarni organizmi. Ko se ogorčica ustali in si ustvari stalno mesto prehranjevanja, mora vzdrževati vitalnost in metabolno aktivnost gigantskih celic. Prav tako mora zaščititi sebe in celice pred okoliškimi vplivi. Ogorčice v gigantske celice izločajo kalretikulin (*Mi-CRT*), ki se kopiči ob celičnih stenah ob mestu vboda (Jaubert in sod., 2005b). Njegova vloga še ni raziskana, znano pa je, da v živalskih parazitih kalretikulin prilagaja imunski odziv gostitelja prek nadzora od Ca^{2+} odvisne signalizacijske poti in celičnega cikla (Ghiran in sod., 2003). Ogorčice v gostiteljsko citoplazmo sproščajo tudi snovi, ki delujejo kot analogi rastlinskih proteinov. Najbolj raziskani so proteini iz družine CLE. Do sedaj še niso našli homologov rastlinskih proteinov CLE v nobenem drugem kraljestvu, razen v rastlinsko parazitskih ogorčicah. Proteini CLE sodelujejo v procesu delitve matičnih celic iz rastnih poganjkov, apikalnih meristemov ter iz prevodnih snopičev. V izločkih subventralnih žlez ličink J2 so identificirali peptid 16D10, ki ga sestavlja 13 aminokislin in domena podobna CLE (Davis in sod., 2008). Ta peptid stimulira rast korenin in lateralno razraščanje korenin. Interagira

tudi s transkripcijskimi dejavniki podobni SCARECROW (Huang in sod., 2006), katerih vloga še ni jasna.

Z različnimi metodami genske ekspresije, so odkrili izrazite spremembe v izražanju rastlinskih genov v parazitiranih celicah korenin. Metode, ki so bile uporabljene, obsegajo: cDNA subtrakcijo, diferencialni prikaz, ekspresijsko analizo kandidatnih genov s fuzijami promoter-GUS (beta-glukoronidaza) reporterji, *in situ* hibridizacijo, RT-PCR, strategijo lovljenja promotorjev, idr.. Z uporabo teh metod je postalo jasno, da ogorčica vpreže različne funkcije rastline, da se lahko razvija in razmnožuje. Geni, ki so najpogostejše diferencialno izraženi so (a) geni celičnega cikla in nadzora nad organizacijo citoskeleta, (b) geni za modifikacijo celične stene, (c) geni hormonskih signalnih poti in obrambe, ter (č) geni splošnega metabolizma (Escobar in sod., 2011).

Novejše metode nam omogočajo vpogled v dogajanje na ravni transkriptoma znotraj same gale ali celo v dogajanje v posameznih gigantskih celicah. Ena prvih takih študij je bila narejena na starejših galah paradižnika (1 – 2 meseca), ki so bile s korenin izrezane ročno (Wilson in sod., 1994). Danes lahko osamimo posamezne rastlinske celice ali celične tipe z uporabo laserske mikrodisekcije in mikroaspiracije (Ramsay in sod., 2006; Barcala in sod., 2010; Escobar in sod., 2011). Tehnologija DNA mikromrež pa nam dovoljuje sočasno analizo izražanja večjega števila genov različnih gostiteljskih rastlin, običajno sta to navadni repnjakovec (*A. thaliana*) in paradižnik (*S. lycopersicum*). Že kmalu je postalo jasno, da se profil izražanja genov v gigantskih celicah razlikuje od profila v galah. V aspiriranih galah paradižnika (25 dpi) so Wang in sod. (2003) z metodo qPCR našli prepise RNA lastne gigantskim celicam in prepise RNA lastne galam. Z lasersko mikrodisekcijo so analizirali izražanje genov v zgodnjih fazah nastanka gale (48 – 92 hpi) (Ramsay in sod., 2004; Portillo in sod., 2009). Študija Barcala in sod. (2010) je zaznala spremenjeno izražanje genov v gigantskih celicah, a sočasno teh prepisov niso odkrili v transkriptomu celotne gale na *A. thaliana*. Podobno velja tudi za gale paradižnika (Portillo in sod., 2009). V galah *A. thaliana* so v gigantskih celicah odkrili večje število genov z zmanjšanim izražanjem, medtem ko so imeli taisti geni v preostalem tkivu gal povečano izražanje. Predvidevajo, da so geni vpleteni v pot fenilpropanoida zavrti v gigantskih celicah zaradi delovanja ogorčic, vendar močno aktivirani zunaj njih, kjer je rastlinska obramba še aktivna (Barcala in sod., 2010).

Največ študij o spremenjenem izražanju genov je bilo narejenih na gostiteljski rastlini *Arabidopsis thaliana*. Ob interakciji med *A. thaliana* in *M. incognita* so našli 3373 genov s povečanim oz. zmanjšanim izražanjem v napadenih celicah. Delež genov z zmanjšanim izražanjem je bil enak deležu genov s povečanim izražanjem, kar kaže na pomembnost zavrtja nekaterih genov v patogenezi ogorčice. Tudi na paradižniku je bila narejena študija izražanja genov, in sicer na mikromrežah paradižnika z 12500 fragmenti cDNA (Bar-or in sod., 2005). V kompatibilni interakciji med paradižnikom in ogorčicami koreninskih šišk

so zaznali močno izražanje genov vpletenih v oksidativni izbruh (12 h po okužbi), a ta je najverjetneje prehodne narave, saj ga v času 2 dpi, ko so gigantske celice že nastajale, niso zaznali v celicah (Melillo in sod. 2006). V *A. thaliana* je kar 70 % genov, pod nadzorom izločkov ogorčic, ki ima zmanjšano izražanje 14 in 21 dpi. V to skupino spadajo tudi geni, za katere je bilo dokazano povečano izražanje ob napadu rastlinskega patogena. Med geni z zmanjšanim izražanjem so odkrili tudi gene vpletene v pot JA in ET (EIN3, ERF1, PR4). V študijah lokalnega odziva rastline so imeli geni vpleteni v pot SA nespremenjeno izražanje (ICS1, SID1, NPR1, WHY1 in PR5). Znotraj gal pa je imelo kar 17 od 21 genov WRKY, ki spadajo v družino transkripcijskih dejavnikov, zmanjšano izražanje (Jammes in sod., 2005). Zmanjšano izražanje gostiteljskih genov je pravzaprav običajen pojav v kompatibilnih interakcijah (Escobar in sod., 2011).

Številne študije o izražanju genov ob napadu fitoparazitskih ogorčic so bile usmerjene v lokalno izražanje genov na prehranjevalnem mestu, kjer se ogorčice koreninskih šišek ustalijo. Manjše število študij pa se je usmerilo v sistemski odziv rastline na napad. Z analizo mikromrež so ovrednotili sistemski odziv *A. thaliana* na parazitiranje cistotvornih ogorčic *Heterodera schachtii* (Puthoff in sod., 2003). Ugotovili so, da se 3 dni po vstopu ogorčic v korenine poveča izražanje gena *VSP2*, ki je markerski gen signalne pot JA in je pod nadzorom transkripcijskih dejavnikov MYC2. Analizo so naredili na celokupnih koreninah v času, ko si je večina ličink že pričela ustvarjati mesto prehranjevanja. Tudi na transkriptomu soje (*Glycine max*) okužene z sojino cistotvorno ogorčico *Heterodera glycines* so v času trajanja poskusa (6 h do 10 dni) ugotovili povečano izražanje genov vpletenih v signalizacijsko pot SA (Alkharouf in sod., 2006; Ithal in sod., 2007a; Ithal in sod., 2007b). Lokalno, v galah, so bili vsi ti geni utišani (Ithal in sod., 2007b).

Kyndt in sod. (2012) so primerjali sistemski odziv riža na napad migratorne ogorčice *Hirschmanniella oryzae* in ogorčice koreninskih šišek *Meloidogyne graminicola*. V času 3 dpi je *H. oryzae* aktivirala pot JA/ET in zavrla pot SA. Kasneje, 7 dpi, je bila tudi pot JA/ET utišana. Ob napadu *M. graminicola* sta se v rastlini aktivirali poti SA in JA, pot ET je bila zavrtta. Po sedmih dneh je bila tudi pot JA utišana. Medtem so bile vse tri poti utišane v listih (3 dpi). Foliarni dodatek SA, JA, ET in uporaba različnih genotipov riža je pokazala, da je aktivacija obrambe z JA in ET najuspešnejša proti vrsti *M. graminicola* (Nahar in sod., 2011). Foliarno škropljenje paradižnika z metil jasmonatom je prav tako zmanjšalo razmnoževanje *M. incognita* (Fujimoto in sod., 2011).

2.6 ODNOSI MED BAKTERIJAMI IN OGORČICAMI KORENINSKIH ŠIŠK

Interakcije med ogorčicami koreninskih šišk in mikroorganizmi so znane. Bakterije lahko na delovanje ogorčic delujejo stimulatивно ali antagonistično. Rizobakterije s pozitivnim delovanjem na rast rastlin (PGPR) običajno delujejo antagonistično proti ogorčicam koreninskih šišk (Lamovšek in sod., 2013). Mehanizem antagonističnega delovanja v večini primerov temelji na aktivaciji imunskega odziva gostiteljske rastline. Ob okužbi s PGPR se vključi pot JA/ET, ki pripravi rastlino na hitrejši odziv ob napadu ogorčic koreninskih šišk. Podoben učinek izzove tudi kolonizacija korenin z arbuskularnimi mikorizami (Zhang in sod., 2008). Obstajajo številni zapisi o sinergističnem delovanju patogene glive *Fusarium oxysporum* in *Meloidogyne* sp. (El-Sherif in Elwakil, 1991; France in Abawi, 1994; Shokoohi in sod., 2004). Na paradižniku oba patogena izzoveta močnejše simptome bolezni in privedeta do hitrejšega propada gostitelja kot samostojno.

Medsebojni odnos med agrobakterijami in vrstami rodu *Meloidogyne* je bil v preteklosti opisan kot stimulativen in antagonističen. Zajedanje korenin s strani ogorčic iz rodu *Meloidogyne* in bakterijska bolezen raka koreninskega vratu (*Agrobacterium* spp.) povzročata na gostiteljskih rastlinah podobne bolezenske znake. *Agrobacterium* sp. povzroči nastanek tumorjev bodisi na koreninah ali na koreninskem vratu, ogorčice rodu *Meloidogyne* pa povzročijo nastanek tumorjem-podobnih tvorbo na koreninah. Te tvorbe imenujemo šiške oz. gale. V šestdesetih in sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so se začeli pojavljati prvi opisi odnosa med *Meloidogyne* spp. in boleznijo raka koreninskega vratu. Povzetek opisov je zbran v Preglednici 1. Vsi omenjeni avtorji poročajo o povečani pojavnosti raka koreninskega vratu ob prisotnosti ogorčic koreninskih šišk v tleh. Večina poročil je temeljila na opazovanju bolezenskih znakov na gostiteljskih rastlinah na testnih poljih ter v nasadih.

Dhanvantari in sod. (1975) so ugotovili, da ogorčice pospešijo nastanek tumorjev, a tudi v odsotnosti ogorčic rastlina razvije tumorje, vendar je čas razvoja tumorjev daljši. Zutra in Orion (1982) sicer pravita, da je vstop bakterij v korenine bombaža neodvisen od prisotnosti ogorčic, saj je bila pojavnost tumorjev enaka v vseh obravnavanjih, vendar hkrati opazita vpliv ogorčic na povečanje tumorjev. Kot sama domnevata, bi na velikost tumorjev lahko vplivale ogorčice neposredno, ali pa so fumiganti, ki so jih dodali v prst za zatiranje ogorčic, delovali tudi na bakterije in zmanjšali njihov infekcijski potencial.

Preglednica 1: Povzetek objav o medsebojnem odnosu ogorčic koreninskih šišk in agrobakterij na gostiteljskih rastlinah.

Table 1: Summary of interaction studies between root-knot nematodes and agrobacteria on host plants.

Vrsta agrobakterije	Vrsta ogorčice	Gostiteljska rastlina	Vloga ogorčic pri bolezni	Reference
<i>A. tumefaciens</i>	<i>M. javanica</i>	breskev	Ogorčice povečajo pojavnost raka koreninskega vratu	Nigh, 1966
<i>A. tumefaciens</i>	<i>M. hapla</i>	maline	Rak koreninskega vratu se pojavi ob prisotnosti ogorčic	Griffin in sod., 1968
<i>A. tumefaciens</i>	<i>M. javanica</i>	mandelj	Povečana pojavnost raka ob prisotnosti ogorčic	Orion in Zutra, 1971
<i>A. tumefaciens</i>	<i>M. incognita</i>	bombaž	Izrazitost bolezni raka koreninskega vratu se je povečala ob prisotnosti ogorčic	Zutra in Orion, 1982
<i>A. tumefaciens</i>	<i>M. incognita</i>	paradižnik	Sistemska spodbuda bakterije k povečanemu razmnoževanju ogorčic	El-Sherif in Elwakil, 1991
<i>A. vitis</i>	<i>M. hapla</i>	vinska trta	Povečana pojavnost raka ob prisotnosti ogorčic	Süle in sod., 1995
<i>A. tumefaciens</i>	<i>M. javanica</i>	paradižnik	Bakterija zmanjša razmnoževanje ogorčic	Fakhouri in sod., 1996
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Meloidogyne</i> spp.	lovorikovec (<i>Prunus cerasifera</i>)	Gale in tumorji prisotni ob visokem inokulacijskem pritisku ogorčic	Rubio-Cabetas in sod., 2001
<i>A. tumefaciens</i>	<i>M. incognita</i>	jajčevce	Bakterija spodbudi ogorčico k povečanemu izleganju ličink	Elwakil in sod., 2003
<i>A. tumefaciens</i> in <i>A. vitis</i>	<i>M. incognita</i>	vinska trta	Bakterije zmanjšajo število gal, število sedentarnih samic v korenini in končno število jajčec	El-Beltagi in sod., 2011

Agrobakterije lahko vstopajo v korenine *A. thaliana* skozi rane, ki jih povzročijo ogorčice (Karimi in sod., 2000). Bakterije *A. tumefaciens* se pritrdijo na povrhnjico ličink *M. incognita* in vstopijo v korenino sočasno z ličinkami (Karimi in sod., 2000). Še več, prisotnost *M. incognita* je povečala frekvenco transformacije rastlinskih celic s T-DNA. *Agrobacterium tumefaciens* naj bi tudi stimuliral razmnoževanje *M. incognita* v koreninah paradižnika (El-Sherif in Elwakil, 1991). Število gal je bilo po 45-ih dneh 1,5 do 2-krat večje, če so bile na drugi strani prisotne bakterije *A. tumefaciens*. Predvidevala sta, da je

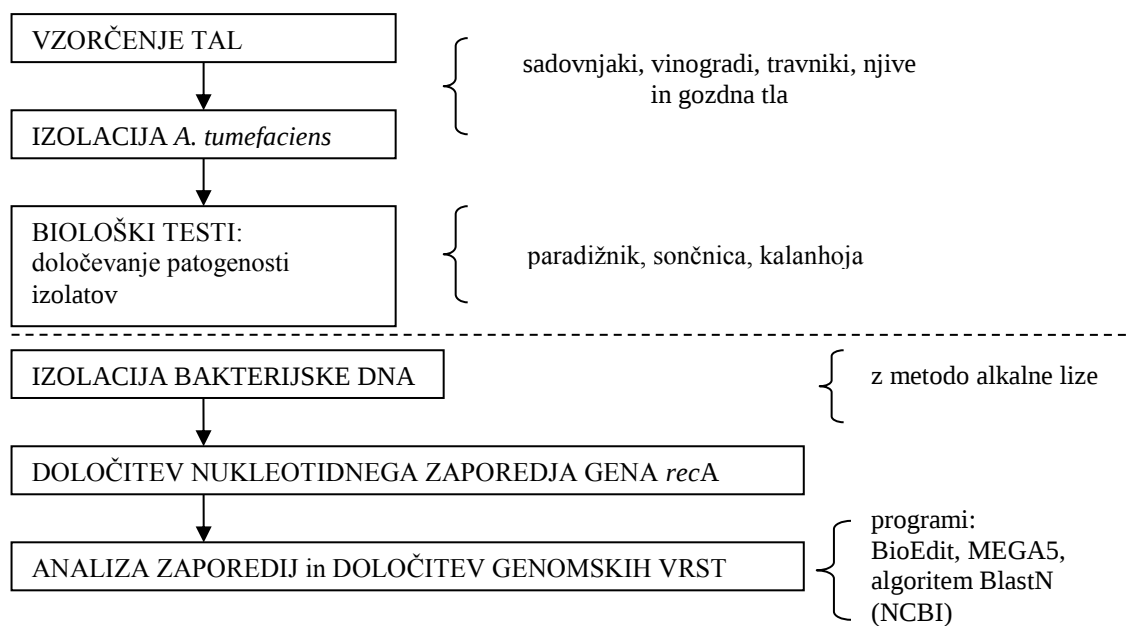
pozitiven vpliv na razmnoževanje posreden, prek rastlinskega imunskega odziva in ne zaradi neposredne prisotnosti bakterij, kar sta dokazala na ločenih koreninah paradižnika (El-Sherif in Elwakil, 1991). Iz njunih rezultatov je razvidno, da je prisotnost *A. tumefaciens* zmanjšala hitrost dozorevanja ličink v samice in zmanjšala število jajčnih vrečk, kjer so uporabili visok inokulum *M. incognita* (2000 ličink na ločene korenine) (El-Sherif in Elwakil, 1991). Rastlinski imunski odziv naj bi *A. tumefaciens* preoblikoval prek sinteze IAA, ki ima stimulativen učinek na razmnoževanje *M. incognita* na koreninah jajčevca, saj poveča število izleženih jajčec na samico (Elwakil in sod., 2003).

Odziv rastline na agrobakterije in ogorčice *Meloidogyne* naj bi bil podoben. Skupina Rubio-Cabetas in sod. (2001) poroča o zaščitnem vplivu odpornostnega gena *Ma*, ki poleg zaščite pred ogorčicami koreninskih šišek, zmanjša pojavnost raka koreninskega vratu na lovorikovcu (*Prunus cerasifera*). V poskusu so uporabili sadike, ki so bile latentno okužene z *A. tumefaciens* in opazili pojav tumorjev le ob prisotnosti ogorčic ali ob mehanski poškodbi (Rubio-Cabetas in sod., 2001).

Fakhouri in sod. (1996) so na koreninah paradižnika zabeležili antagonistični vpliv *A. tumefaciens* na razmnoževanje *M. javanica*. Antagonistični vpliv agrobakterij so opazili tudi Süle in sod. (1995) na koreninah vinske trte, kjer je prisotnost *A. vitis* zmanjšala število gal *M. hapla*. Nasprotujoči si rezultati so najverjetneje posledica drugačne zasnove poskusa, uporabe različnih kultivarjev gostiteljskih rastlin, različnih sevov *A. tumefaciens* in različnih vrst ogorčic koreninskih šišek (*Meloidogyne* spp.).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ŠTUDIJA RAZNOLIKOSTI TALNIH IZOLATOV *Agrobacterium tumefaciens* S KMETIJSKIH POVRŠIN NA PODLAGI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA *recA*



Slika 8: Shematični prikaz študije raznolikosti genov *recA* pri talnih izolatih *A. tumefaciens* na slovenskih kmetijskih površinah.

Figure 8: Flow chart of gene *recA* diversity study on isolates of *A. tumefaciens* collected from Slovenian agricultural soils.

3.1.1 Vzorčenje tal

Tla smo vzorčili v oktobru 2010 na 66-ih lokacijah v Podravju, Savinjski dolini, Spodnjem Posavju in na Gorenjskem. Iz območja osrednje Slovenije in iz Dolenjske smo odvzeli samo po en vzorec. Analizirali smo 72 vzorcev tal iz 53-ih nasadov sadnega drevja (jablane, breskve, hruške ali češplje), sedmih travnikov, petih njiv, treh vinogradov in štirih gozdov. Tla smo vzorčili s sondo na globini 10 – 15 cm. Na vsaki lokaciji smo naključno izbrali površino približne velikosti 20 × 20 m in vzorce tal odvzeli z 10-ih točk in jih združili v en vzorec. Po vsakem vzorčenju smo sondo sprali z vodo in površinsko sterilizirali s 70 % etanolom. Vzorce smo prenesli v laboratorij v hladilnih posodah ter jih shranili na 10 °C do obdelave. Simptomov raka koreninskega vratu nismo opazili na nobeni gostiteljski rastlini na vzorčenih lokacijah.

3.1.2 Izolacija in identifikacija izolatov *A. tumefaciens*

Agrobakterije smo izolirali iz tal s standardnimi mikrobiološkimi tehnikami. Največ en teden po vzorčenju smo izvedli izolacijo. Deset gramov dobro premešanega vzorca tal smo natehtali v sterilno erlenmajerico ter dodali 90 ml sterilne deionizirane vode. Mešanico smo stresali na laboratorijskem mešalcu 30 min pri 300 rpm. Ko so se večji talni delci posedli, smo pripravili desetkratne redčitve v sterilni deionizirani vodi in nacepili na selektivno trdno gojišče 1A (Brisbane in Kerr, 1983). Tri do štiri dni po inkubaciji na 27 °C smo preverili prisotnost kolonij s specifično vijolično obarvanostjo in gladko svetlečo površino značilno za *A. tumefaciens* (Lippincott in sod., 1983). Tipične kolonije smo prešteli za oceno približne koncentracije agrobakterij na gram talnega vzorca. Z vsake selektivne plošče smo naključno odbrali eno do dve koloniji. Vrsto smo določili z nadaljnjimi postopki identifikacije. Izbrane kolonije smo precepili na splošno gojišče King's B (KB) do čistih kultur, ki smo jih shranili v gojišču za trajne kulture na – 80 °C.

Sestava gojišča 1A (Brisbane in Kerr, 1983):

3,04 g L-arabitol

0,16 g NH_4NO_3

0,54 g KH_2PO_4

1,37 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$

0,29 g Natrijev tauroholat

0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

15,0 g agar (BioLife)

Kristal vijolično, 0,1 % vodna raztopina

Cikloheksimid, 1 %

Natrijev selenit (Na_2SeO_3), 1 %

Deionizirana voda

V 500 ml tople deionizirane vode raztopimo L-arabitol, soli, natrijev tauroholat, ter dodamo 2 ml kristal vijolične raztopine. Dodamo agar in dolijemo vodo do 1 litra. Avtoklaviramo in ohladimo na 50 °C. Sterilno dodamo 2 ml raztopine cikloheksimida in 6,6 ml raztopine natrijevega selenita. Premešamo in razlijemo v petrijevke.

Sestava gojišča King's B (KB):

20,0 g mesni pepton

15,0 ml glicerol

1,96 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$

1,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

15,0 g agar

Deionizirana voda

Vse sestavine raztopimo v deionizirani vodi in nastavimo na pH 7,2. Avtoklaviramo in aseptično razlijemo v petrijevke.

Identifikacijo izolatov smo naredili po postopku Pulawske in sod. (2006) z metodo multipleks PCR za določanje vrst *A. tumefaciens*, *A. vitis* in *Rhizobium rhizogenes*. Reakcijo PCR smo izvedli v 20 µl na aparaturi Verity 96 Well Thermal Cycler (Life Technologies, ZDA). Protokol smo prilagodili za hitrejše pomnoževanje. V reakcijo PCR smo dodali GeneAmp Fast PCR Master Mix (2 ×) (Life Technologies, ZDA) ter 1 µM vsakega oligonukleotidnega začetnika (UF, B1r, B2r in Avr).

Pogoji za pomnoževanje:

1 cikel	95 °C, 1 min
35 ciklov:	95 °C, 15 s
	67 °C, 15 s
	72 °C, 30 s
1 cikel:	72 °C, 10 min.

Uspešnost reakcije smo preverili na 2 % agaroznem gelu pod UV lučjo. Vse izolate, kjer smo na gelu določili specifično velikost fragmenta 184 bp, smo uvrstili v vrsto *A. tumefaciens* biovar 1.

3.1.3 Patogenost sevov *A. tumefaciens*

Biološke teste za odkrivanje patogenosti sevov *A. tumefaciens* smo izvedli na mladih, štiritedenskih sadikah paradižnika sorte Saint Pierre (*Solanum lycopersicum* L., Semenarna Ljubljana), sončnic (*Helianthus annuus*, Semenarna Ljubljana) in kalanhoj (*Kalanchoe daigremontiana*, KIS). Vsaki testni rastlini smo med nodiji na steblu naredili tri vbode. Za okuževanje smo uporabili entomološko iglo, ki smo jo prevlekli s 24-urno kulturo bakterij s KB gojišča. Za vsak izolat smo uporabili po tri rastline iste vrste. Okužene rastline smo vzdrževali v rastlinjaku pri 20 do 30 °C ob naravni osvetlitvi. V obdobju od treh do šestih tednov po okuževanju smo rastline tedensko pregledovali. Izolat je patogen, če v tem obdobju spodbudi nastanek značilne tumorske tvorbe na mestu okužbe. V testu smo uporabljali kontrole: sev C58 (*A. tumefaciens*, INRA, Francija) za pozitivno in sterilno vodo za negativno kontrolo.

3.1.4 Pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *recA* in njegova analiza

Vse izolate identificirane kot *A. tumefaciens* biovar 1 v reakciji multipleks PCR smo izbrali za nadaljnjo uvrstitev v genomske vrste na podlagi gena za rekombinazo *recA* po protokolu Costechareyre in sod. (2010). Bakterijsko DNA smo izolirali iz ene kolonije po standardnem postopku alkalne lize (Sambrook in sod., 1989). Bakterijske seve smo predhodno namnožili na gojišču KB pri 27 °C, 24 h. Tisočkratne razredčitve DNA smo pripravili v sterilnem TE pufru (pH 8,0). Po protokolu Costechareyre in sod. (2010) smo za pomnožitev gena *recA* uporabili reverzni oligonukleotidni začetnik F2899 s T3 repom in začetnik FwdrecA2, ki smo ga oblikovali na podlagi nukleotidnega zaporedja gena *recA* iz

referenčnega seva C58 (akc. št. L07902.1). Reakcije PCR so potekale v 50 µl volumnih na aparaturi Verity 96 Well Thermal Cycler (Life Technologies, ZDA). Reakcijska mešanica je vsebovala komercialni pufer GoTaq PCR buffer (Promega, ZDA), 0,7 mM MgCl₂ (Promega, ZDA), 125 µM vsakega dNTP-ja, 1 µM vsakega oligonukleotidnega začetnika (FwdrecA2 in F2899) in 2,5 U GoTaq DNA polimeraze (Promega, ZDA) ter 2,5 µl redčene bakterijske DNA (1:1000).

Sestava uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov:

FwdrecA2	5'-ATG CTG GCT SMG CCT TGC GA-3'	(načrtovani v tej študiji)
F2899	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAT GCA GGA AGC GGT CGG CRA TSA-3'	(Costechareyre in sod., 2010)

Pogoji za pomnoževanje gena *recA*:

1 cikel	94 °C, 5 min
35 ciklov:	94 °C, 45 s 55 °C, 45 s 72 °C, 2 min
1 cikel:	72 °C, 7 min.

Pomnožene fragmente smo pogledali na 1 % agaroznem gelu pod UV lučjo.

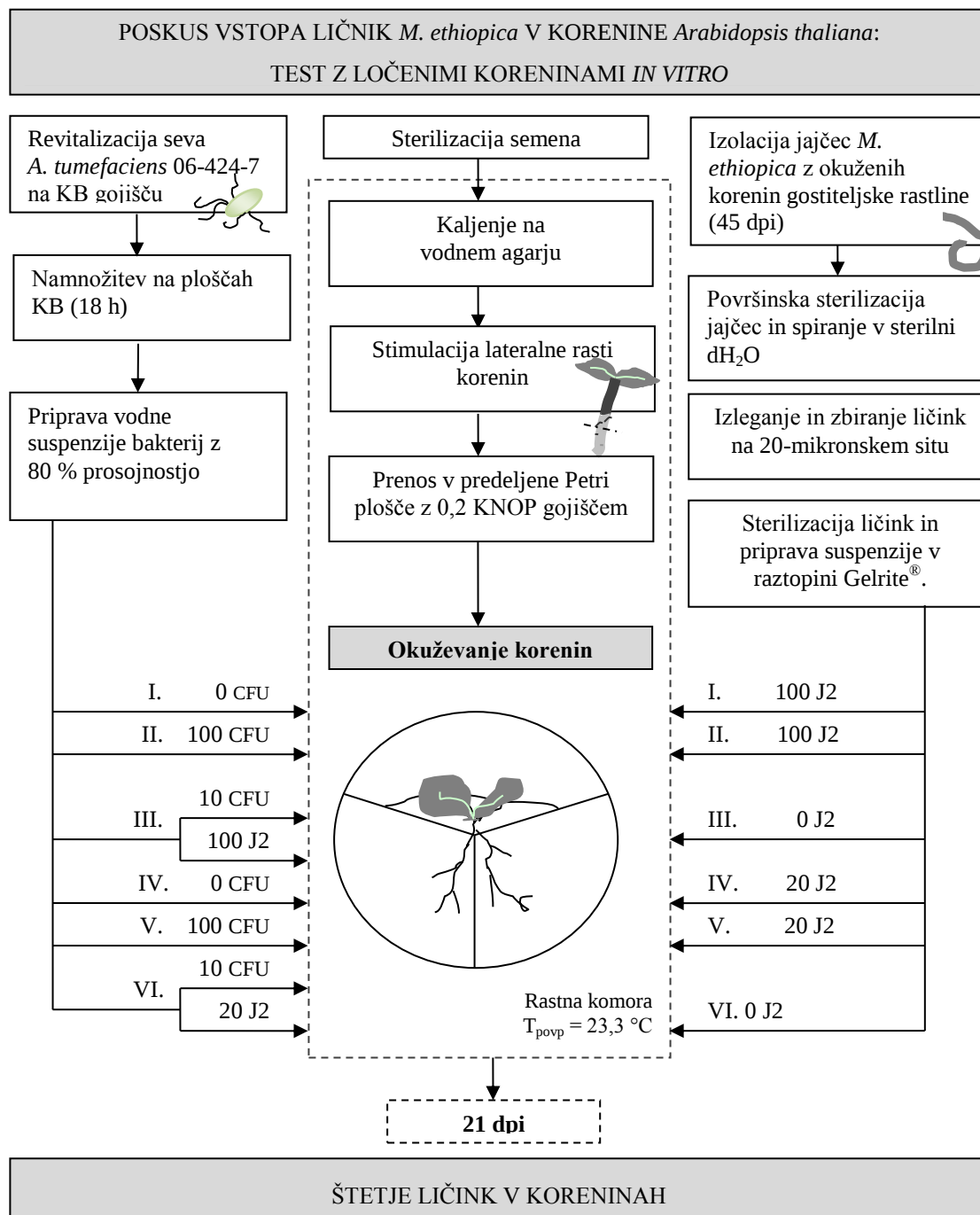
Podjetje Macrogen (Koreja) je pomnoženim fragmentom določilo nukleotidno zaporedje z uporabo oligonukleotidnih začetnikov FwdrecA2 in univerzalnega začetnika T3. Računalniški program BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) smo uporabili za sestavo zaporedij DNA, njihovo poravnavo, za izračun matrike identičnosti ter za *in silico* prevod v proteinska zaporedja. Podobnost *recA* zaporedij dolžine 969 bp z vsemi podobnimi zaporedji v bazi podatkov smo določili z uporabo algoritma BlastN na serverju NCBI (Altschul in sod., 1990). Polimorfizem zaporedij smo analizirali s programom DnaSP v.5.10.01 (Librado in Rozas, 2009).

3.1.5 Morfologija kolonij na različnih temperaturah gojenja izolatov

Morfologijo kolonij vseh sevov *A. tumefaciens* smo opazovali na gojišču KB četrtri dan inkubacije na 27 °C. Nato smo naključno izbrali sedem sevov, ki smo jih na podlagi zaporedja gena *recA* uvrstili v genomsko skupino G1 (sevi 3-2, 10-1, 11-1, 24-1, 30-1, 52-1 in 72-3) ter dva iz skupine G4 (seva 29-1 in 44-1), ter opazovali njihovo morfologijo na gojišču 1A na 27 °C (4. dan) in na gojišču KB pri temperaturah 21 °C (4. dan) in 12 °C (8. dan).

3.2 TEST *IN VITRO* NA *Arabidopsis thaliana*

Za ovrednotenje sistemskega vpliva prisotnosti bakterij *A. tumefaciens* na vstop ličink *M. ethiopica* v korenine navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) smo uporabili tehniko ločenih korenin *in vitro*.



Slika 9: Shematični prikaz poteka poskusa vrednotenja vstopa ličink *M. ethiopica* v korenine *A. thaliana* ob prisotnosti patogenega seva *A. tumefaciens*.

Figure 9: Diagram of *in vitro* trial for evaluating penetration of *M. ethiopica* juveniles into the roots of *A. thaliana* infected with pathogenic strain of *A. tumefaciens*.

3.2.1 Priprava rastlin

Semena navadnega repnjakovca *Arabidopsis thaliana* (genotip Columbia, KIS) smo najprej površinsko sterilizirali po metodi Sijmons in sod. (1991). Sterilizacijo smo naredili v 2 ml sterilnih mikrocentrifugirkah in shranili v manjših plastičnih petrijevkah zatesnjenih s Parafilmom.

K semenom dodamo 1 ml 70 % etanola s kapljico detergenta Tween 20 in inkubiramo 2 min ob občasnem stresanju. Ko se semena posedejo na dno, previdno odpipetiramo etanol in dodamo 1 ml 1,8 % raztopine varekine (NaOCl). Ob nenehnem obračanju mikrocentrifugirke inkubiramo semena 10 min. Na koncu odpipetiramo varekino in semena speremo tri do petkrat v sterilni vodi. Nekaj vode pustimo in semena stresemo na sterilni filter papir ter posušimo v brezprašni komori.

Sterilna semena položimo na 0,7 % vodni agar in inkubiramo v temi 3 - 4 dni v vodoravnem položaju. Plošče nato prestavimo na svetlobo v rastno komoro in jih postavimo navpično pod kot 60 °. Ko je glavna korenina vidna, aseptično odrežemo koreninski vršiček, da stimuliramo lateralno rast korenin.

Po 1 do 2 tednih rastlino prestavimo v trojno predeljene petrijevke z 0,2 KNOP gojiščem (Sijmons in sod., 1991), tako da sta oba dela korenine v stiku z gojiščem (Sl. 9). Rastline so pripravljene na okuževanje po 1 do 2 tednih.

Sestava gojišča 0,2 KNOP (Sijmons in sod., 1991)

Saharoza	20,0	g/l
Daishin Agar	8,0	g/l
Gamborgova raztopina vitaminov B5	1,0	ml/l
Založna raztopina I	2,0	ml/l
Založna raztopina II	2,0	ml/l
Založna raztopina III	2,0	ml/l
Založna raztopina IV	0,4	ml/l
Založna raztopina V	0,2	ml/l
pH 6,4 (uravnamo z 1M KOH)		

Sestava Založnih raztopin I- V :

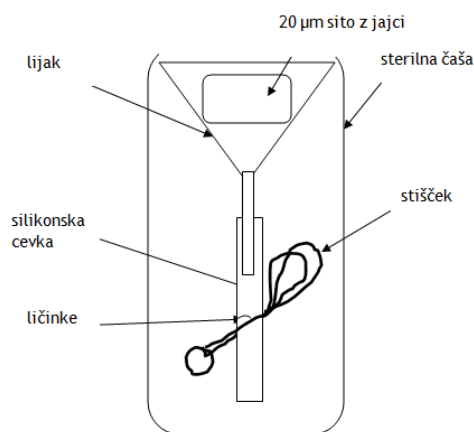
Založna raztopina I:	KNO ₃	123,32	g/l
	MgSO ₄	19,71	g/l
Založna raztopina II:	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	120,00	g/l
Založna raztopina III:	KH ₂ PO ₄	27,22	g/l
Založna raztopina IV:	FeNaEDTA	7,34	g/l

Založna raztopina V:	H ₃ BO ₃	2,860 g/l
	MnCl ₂	1,810 g/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,073 g/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,360 g/l
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,030 g/l
	H ₂ MoO ₄	0,052 g/l
	NaCl ₂	2,000 g/l

3.2.2 Priprava ličink *M. ethiopica* za test na koreninah *A. thaliana* *in vitro*

Izleganje ličink ogorčic

Ličinke ogorčic *M. ethiopica* pridobimo s pripomočkom za izleganje jajčec (Hoffman J., BOKU, Dunaj, osebno), ki je prirejen po po Baermanovem sistemu, kot to prikazuje Sl. 10. Na 20-mikronsko sito nalijemo raztopino s površinsko steriliziranimi jajčeci ogorčic in previdno dotočimo avtoklavirano vodo iz pipe. Tekočina sme le delno prekrivati jajčeca, da zagotovimo dovolj kisika za ogorčice. Čašo prekrijemo z aluminijasto folijo in dodatno ovijemo s Parafilmom. Inkubiramo v temi pri 20 do 25 °C. Po 24-ih urah odtočimo vse izležene ličinke, ki se zberejo na dnu cevke ob stiščeku. Tako odstranimo vse ličinke, ki so bile prisotne že med jajčeci in si tako zagotovimo enotno starost izleženih ličink v populaciji.



Slika 10: Priprava za pridobivanje ličink ogorčic.

Figure 10: A hatching device for collecting nematode juveniles.

Ličinke po 3 - 4 dneh zberemo na 20-mikronsko sterilno sito in jih površinsko steriliziramo natanko 3 min v 0,5 % HgCl₂. Ličinke trikrat speremo v sterilni vodi in jih zberemo v čim manjšem volumnu (okoli 1 ml) ter jih prenesemo v sterilno posodico. K ličinkam dodamo sterilno raztopino Gelrite®, da preprečimo usedanje ličink na dno. Ličinke v 25 µl veliki kapljici preštejemo pod lupo. Po potrebi uravnamo koncentracijo z raztopino Gelrite na 20 – 50 ličink v 25 µl. V inokulumu so vedno prisotne tudi mrtve ličinke, ki so umrle med

postopkom površinske sterilizacije, zato med preštevanjem ličink v inokulumu štejemo samo gibljive, žive ličinke. Ličinke aseptično inokuliramo ob vršičke korenin *A. thaliana*.

3.2.3 Priprava bakterijske suspenzije *A. tumefaciens* za *in vitro* test

Patogeni bakterijski sev 06-424-7 (*A. tumefaciens*, KIS) namnožimo na ploščah KB in iz sveže kulture pripravimo suspenzijo z 80 % prosojnostjo (glej 3.3.3). Z dodatkom raztopine Gelrite® redčimo suspenzijo do zelene koncentracije. Bakterije inokuliramo na korenine ob rastnih vršičkih.

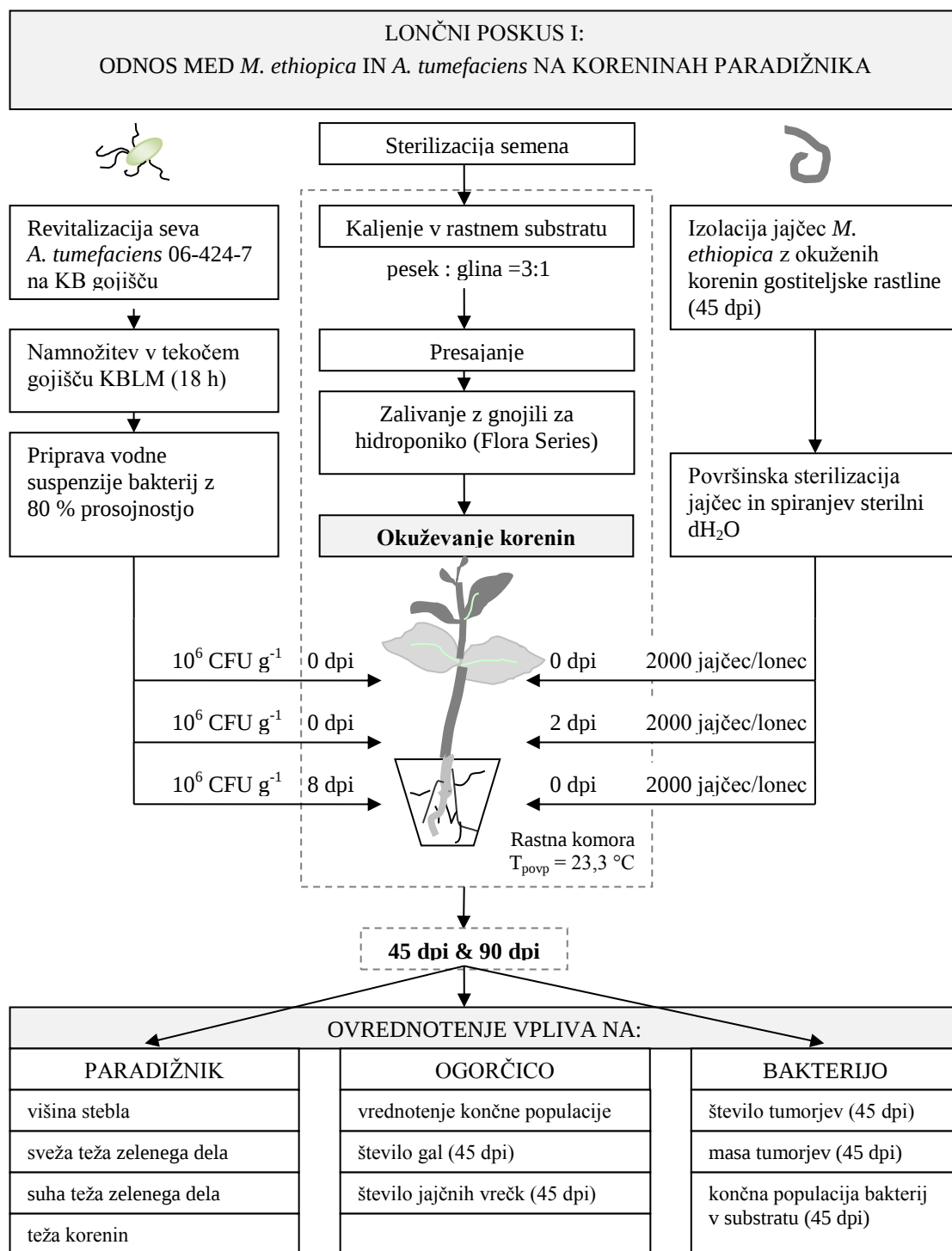
3.2.4 Vrednotenje poskusa vstopa ličink

Vstop ličink v korenino smo spremljali pod lupo, saj so korenine *A. thaliana* dovolj prosojne, da lahko opazujemo ličinko v korenini od tretjega dne po vstopu v korenino. Vstopna mesta prepoznamo po značilni odebelitvi korenine zaradi nastanka večjedrnih celic. Vstop smo spremljali tedensko, dokler se ni število gal ustalilo, t.j. po 21 dneh.

3.3 LONČNI POSKUSI NA PARADIŽNIKU

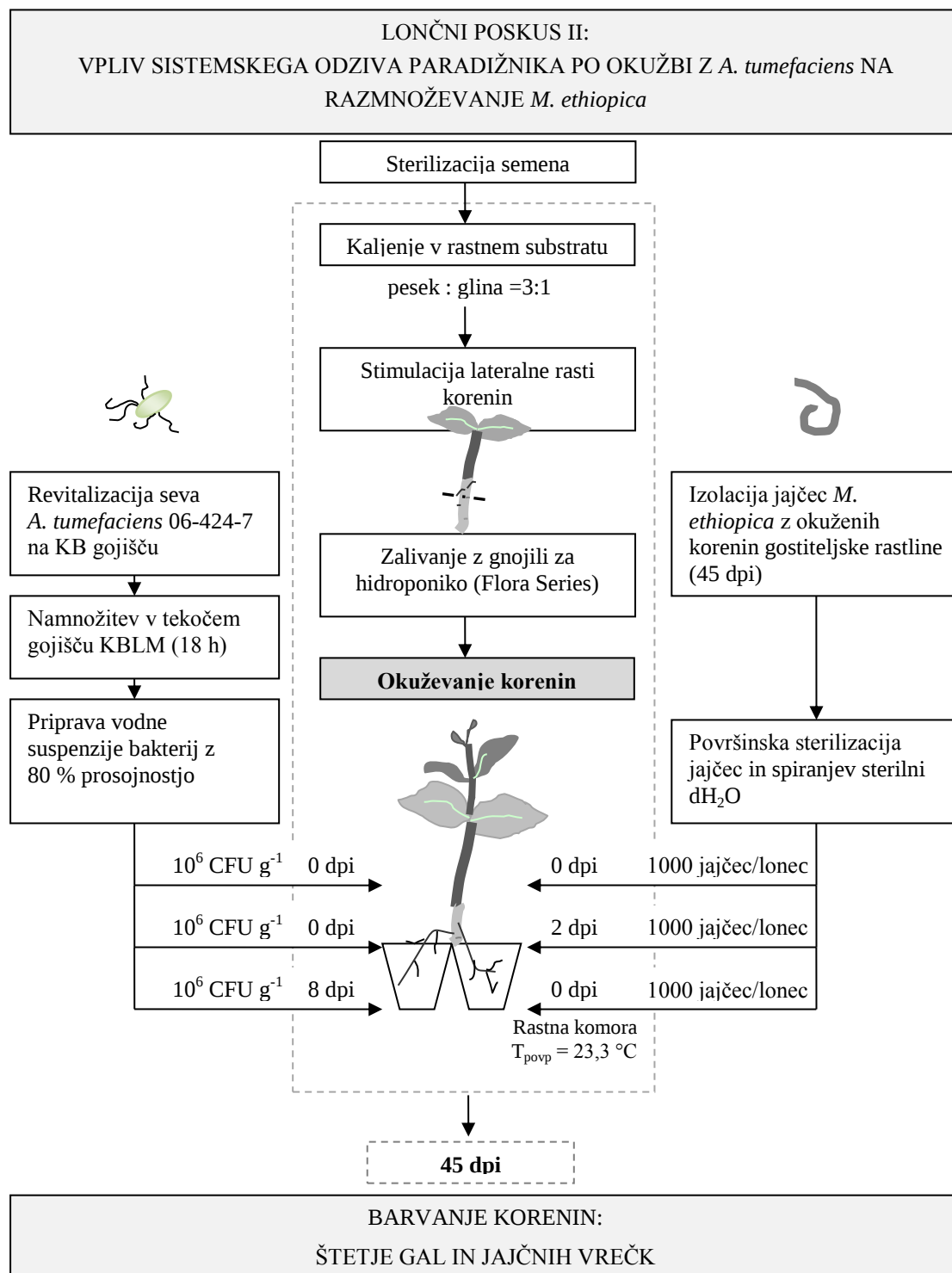
Lončne poskuse na paradižniku smo zasnovali za ugotavljanje vpliva:

- (1) ogorčic in bakterij na rast gostiteljske rastline (Poskus I, Sl. 11);
- (2) bakterij na razmnoževanje ogorčic (Poskus I, II; Sl. 11 in 12);
- (3) bakterij na vstop infektivnih ličink ogorčic v korenine gostitelja (Poskus III, Sl. 13);
- (4) ogorčic na pojav raka koreninskega vratu (Poskus I, Sl. 11).



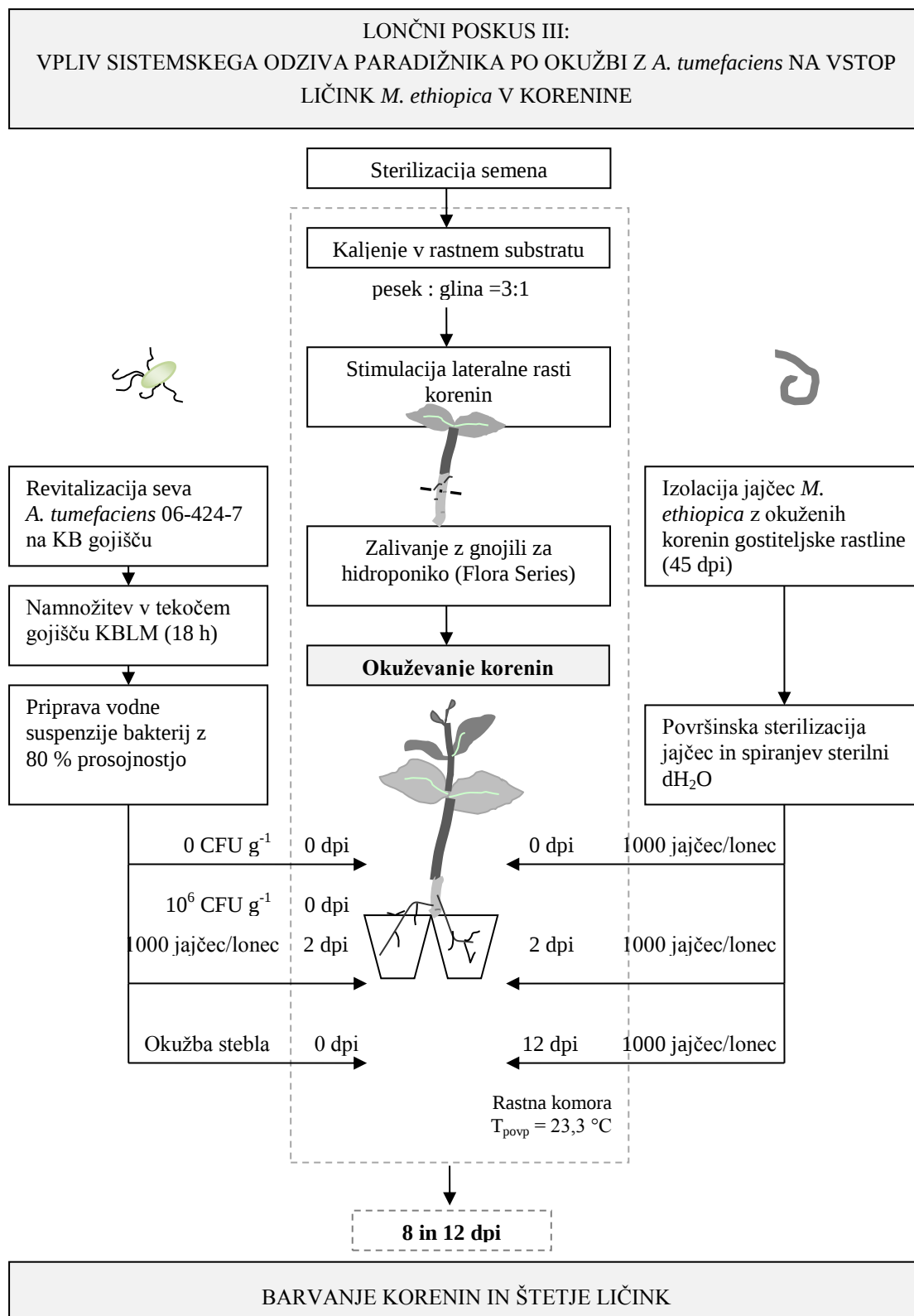
Slika 11: Shematični prikaz lončnih poskusov za vrednotenje odnosov med paradižnikom, ogorčico *M. ethiopica*, bakterijo *A. tumefaciens* po enem (45 dpi) in drugem (90 dpi) zaključenem razmnoževalnem krogu ogorčice *M. ethiopica*.

Figure 11: Diagram for pot trial set-up to evaluate the interaction between tomato host plant, *M. ethiopica* nematode and *A. tumefaciens* bacteria after the first (45 dpi) and second (90 dpi) completed *M. ethiopica* nematode reproduction cycle.



Slika 12: Shematični prikaz poskusa vrednotenja sistemskega odziva paradižnika na okužbo z *A. tumefaciens* na razmnoževanje ogorčic *M. ethiopica* na ločeni strani korenin po zaključenem prvem razmnoževalnem krogu ogorčice.

Figure 12: Diagram for split-root trial set-up to evaluate the systemic response of tomato to *A. tumefaciens* infection that affects *M. ethiopica* reproduction after its first completed reproduction cycle.



Slika 13: Shematični prikaz poskusa za vrednotenje vpliva bakterij *A. tumefaciens* na vstop ličink *M. ethiopica* v korenine paradižnika.

Figure 13: Diagram for split-root trial set-up to evaluate the effect of *A. tumefaciens* on *M. ethiopica* juvenile penetration into the roots of tomato.

3.3.1 Priprava sadik paradižnika na poskus

Sterilizacija semen paradižnika

V večjo sterilno čašo smo stresli semena paradižnika hibridne sorte Arawak F1 (Syngenta) in jih prelili s 70 % etanolom ter stresali 15 min. Po inkubaciji smo odlili etanol, prelili semena z varekino do koncentracije 1,8 % NaOCl in dodali kapljico detergenta Tween 20. Semena smo inkubirali 25 min in občasno premešali. Semena so se medtem posvetlila. Po odlitju varekine smo semena trikrat spirali v sterilni deionizirani vodi, pri čemer je vsako spiranje trajalo 10 min. Sterilna semena smo stresli na sterilni filter papir in sušili v prižgani brezprašni komori vsaj dve uri. Popolnoma suha semena smo spravili v petrijevke in dobro zatesnili s Parafilmom. Tako sterilizirana semena so primerna za shranjevanje v hladilniku.

Sterilnost semen smo dodatno preverili s kaljenjem na bakterijskem gojišču KB (za sestavo glej poglavje 3.1.2).

Kaljenje in presajanje v rastni substrat

Sterilna semena smo posadili v sterilno mešanico kremenčevega peska (granulacija 0,25–1,0 mm; Termit, Moravče) in glinenih granul (granulacija 1 – 4 mm) v razmerju 3 : 1 (v/v). Semena smo kalili v kalitvenih posodah v rastni komori pri povprečni dnevi temperaturi 23,3 °C in 12-urnim dnevnim krogom. Dva tedna po vzniku smo sadike presadili v večje lončke s 500 g sterilnega rastnega substrata in jih vzdrževali pri povprečni dnevni temperaturi 23,3 °C in 14-urnim dnevnim ciklom. Sadike so bile pripravljene na okuževanje dva tedna po presajanju (t.j. 4 tedne po vzniku).

Priprava sadik s stimulacijo lateralne rasti korenin

Deset dni po vzniku smo sadikam paradižnika odščipnili vrh glavne korenine, da smo stimulirali lateralno rast korenin. Sadike s preščipnjenim koreninskim vrhom smo presadili v drugo kalilno posodo s sterilnim rastnim substratom. Nadaljnja dva tedna smo rastline vzdrževali na 12-urnem dnevnem krogu (23,3 °C), medtem so se korenine razrasle. Ko so bile rastline dovolj velike, smo jih presadili in vzdrževali do konca poskusa ob nespremenjeni temperaturi ter 14-urnem dnevnem krogu. Posamezne sadike smo presadili v dva manjša lončka, ki smo zlepili drug ob drugega in ju napolnili z 250 g sterilnega rastnega substrata. Korenine vsake sadike smo ločili na dva dela, nato pa vsak del posebej posadili v rahlo vlažen rastni substrat. Steblo sadike smo privezali ob oporo. Tako pripravljene sadike so bile primerne za okuževanje dva tedna po presajanju (t.j. 5 tednov po vzniku).

Hranilna raztopina za zalivanje sadik

Hranilno raztopino za zalivanje rastlin (Flora Series, General Hydroponics, ZDA) smo pripravljali v avtoklavirani deionizirani vodi s pH 5,3 – 5,5 po priporočilih proizvajalca. Glede na rastni stadij rastline smo prilagajali količino hranil.

3.3.2 Pridobivanje inokuluma *Meloidogyne ethiopica*

Jajčeca ogorčice *M. ethiopica* smo pridobivali z gostiteljskih korenin po metodi Hussey in Barker (1973). Na kratko, okužene korenine paradižnika (*Solanum lycopersicum* L.) smo zmleli s paličnim mešalnikom v 1 % raztopini NaOCl, da so se jajčne vrečke razkrojile in jajčeca sprostila. Po 4 min inkubacije z mešanjem smo prelili vsebino preko treh sit (850, 250 ter 32 µm) položenih drug na vrh drugega. Vsako sito smo obilno spirali z vodo. Na zadnje, 32-mikronsko sito, so se sprala jajčeca ogorčic skupaj z drobnimi ostanki koreninskega tkiva. Jajčeca smo zbrali v 50-mililitrsko centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 1500 rpm.

Jajčeca smo pred okuževanjem očistili ostankov primesi s centrifugiranjem v 60 % (w/v) sladkorni raztopini (navadni trsni sladkor) (McClure in sod., 1973). Pelet z jajčeci smo redčili s 40 ml sladkorne raztopine ter centrifugirali 1 min pri 1000 rpm. Supernatant z jajčeci smo prelili na 32-mikronsko sito in sprali sladkor s 300 ml vode. Jajčeca smo zbrali v 50 ml centrifugirke in shranili na 10 °C do naslednjega dne.

Površinska sterilizacija jajčec *M. ethiopica*

Suspenzijo jajčec *M. ethiopica* smo aseptično prelili preko 25-mikronskega sita ter sito preložili v sterilno čašo in ga prelili z raztopino za površinsko sterilizacijo (0,5 % HgCl₂). Inkubirali smo natanko 4 min in spirali dvakrat z avtoklavirano vodo.

3.3.3 Priprava bakterijskih suspenzij

Pred pričetkom lončnih poskusov smo si izdelali umeritveno krivuljo za določanje koncentracije bakterij v vodni suspenziji (Priloga B1) ter preverili učinkovitost izolacije bakterij iz rastnega substrata z 20 % vlažnostjo (Priloga B2).

Priprava umeritvene krivulje za določanje koncentracije bakterij v suspenziji

Z merjenjem transmitance oz. prosojnosti bakterijske suspenzije lahko določimo število kolonijskih enot (CFU) v suspenziji. Uporabili smo turbidimeter BioLog[®], s katerim lahko pripravimo suspenzije s točno določeno prosojnostjo. Na podlagi petih različnih prosojnosti bakterijskih suspenzij s sevom 06-424-7 (*A. tumefaciens*, KIS) smo pripravili umeritveno krivuljo, ki je služila za pripravo inokuluma v lončnih poskusih (Priloga B1).

Odstopanje umeritvenih krivulj ostalih bakterijskih sevov od krivulje *A. tumefaciens* je bilo zanemarljivo. Veljavnost umeritvene krivulje je bila potrjena tudi po dveh letih.

Pripravili smo pet bakterijskih suspenzij s prosojnostmi 100 % (samo deionizirana voda za umerjanje aparature), 80 %, 60 %, 52 %, 26 % in 10 %. Suspenzije smo pripravili v epruvetah z navojem (BioLog[®]), ki so prilagojene za uporabo turbidimetra BioLog. V epruveto z vodo smo na vatirani palčki prenesli enodnevno kulturo bakterijskega seva in dobro premešali, da ni bilo vidnih večjih kosov kulture v vodi. Prosojnost smo prilagajali z dodajanjem vode oz. kulture. Vsako suspenzijo z določeno prosojnostjo smo serijsko redčili z vodo do 1 : 10⁹. Vsako redčitev smo razmazali na gojišče KB v petih ponovitvah. Plošče smo inkubirali dva dni na 27 °C. Pri štetju kolonij smo upoštevali pravilo števnih plošč (30 – 300 kolonij na ploščo). Ostale plošče smo označili za neštevne.

Koncentracijo bakterij (CFU / ml) za posamezno redčitev smo izračunali iz produkta med povprečnim CFU (na ploščo z določeno redčitvijo) in faktorjem redčitve.

Učinkovitost izolacije bakterij iz peska

Za vrednotenje velikosti populacije agrobakterij v lončnih poskusih moramo poznati učinkovitost metode za izolacijo bakterij. Testne paradižnike smo gojili v pesku zaradi lažjega preučevanja sprememb na koreninah, zato smo preverili učinkovitost metode zasnovane za izolacijo bakterij iz tal na pesku z 20 % vlažnostjo.

V postopku izolacije agrobakterij iz tal smo zamešali 10 g sterilnega peska (20 % vlažnost) z 90 ml sterilne deionizirane vode. Mešanico smo 30 min stresali, počakali, da se je pesek sesedel na dno in iz vrhnje suspenzije pripravili redčitve. Redčitve smo razmazali na selektivno gojišče 1A v triplicatih in plošče inkubirali 2 - 4 dni na 27 °C. Uporabili smo 5 različnih koncentracij (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ in 10⁷ CFU g⁻¹).

Učinkovitost izolacije bakterij iz peska smo izračunali iz enačbe 1.

$$\text{učinkovitost izolacije (\%)} = \frac{\frac{\overline{CFU}}{ml} \times 100 \text{ ml}}{\frac{10 \text{ g}}{\text{realni CFU/g}}} \times 100 \quad \dots (1)$$

Priprava bakterijskega inokuluma z 80 % prosojnostjo

Svežo, 24-urno bakterijsko kulturo smo aseptično nacepili v tekoče gojišče in gojili 18 h pri 27 °C in 150 rpm. Vse seve *A. tumefaciens* smo gojili v KBLM gojišču (tekoče gojišče KB), le sev *E. coli* v LB bujonu (gojišče Luria Bertani pripravljeno po navodilih

proizvajalca). Namnoženo bakterijsko kulturo smo prelili v sterilno 50 ml centrifugirko in centrifugirali 15 min pri 2000 rpm. Dobljeni pelet smo trikrat sprali s sterilno vodo ob centrifugiranju (10 min, 2000 rpm). Suspenzijo smo redčili do 80 % prosojnosti in pripravili inokulum s koncentracijo $1,2 \times 10^8$ CFU ml⁻¹.

Priprava suspenzije bakterijskih celic obdelanih s toplotnim šokom

Suspenzijo z mrtvimi bakterijami smo pripravili iz bakterijske suspenzije s 80 % prosojnostjo in jo avtoklavirali.

Preglednica 2: Seznam bakterijskih sevov uporabljenih v nalogi.
Table 2: A list of bacterial strains used in our study.

Sev (vrsta, vir)	Opis
06-424-7 (<i>A. tumefaciens</i> , KIS)	Izolat pridobljen iz tumorja vrtnice, identificiran z multipleks PCR (Pulawska in sod., 2006) kot <i>A. tumefaciens</i> biovar 1ter biokemijsko s sistemom BioLog. Patogenost potrjena na paradižniku, sončnici in kalanhoji. Po <i>recA</i> analizi spada v genomsko skupino G1.
51-1 (<i>A. tumefaciens</i> , KIS)	Izolat iz tal in identificiran z multipleks PCR (Pulawska in sod., 2006). Nepatogen. Uvrščen v genomsko skupino G1.
C58 (<i>A. tumefaciens</i> , INRA, Francija)	Referenčni patogeni sev. Patogenost potrjena na paradižniku, sončnici in kalanhoji. Spada v genomsko skupino G8.
C58C1(<i>A. tumefaciens</i> , INRA, Francija)	Sev C58 brez plazmida Ti (nepatogen).
JM109 (<i>E. coli</i> , Promega)	Komercialni sev <i>E. coli</i> za kloniranje (Promega, ZDA)

3.3.4 Način okuževanja in obravnavanja v lončnem poskusu I

Vsako sadiko paradižnika smo previdno potegnili iz lonca in tretjino rastnega substrata pustili v loncu. Pesek smo navlažili s sterilno vodo in nanj položili sadiko. Na tej stopnji smo korenine neposredno okužili bodisi z jajčeci ogorčic (2000 jajčec / rastlino) bodisi z bakterijami (10^6 CFU g⁻¹) ali obojim hkrati. S preostalim peskom smo prekrili korenine. V obravnavanjih N2B1 in N2npB1 smo ogorčice h koreninam dodali 2 dni po inokulaciji z bakterijami, in sicer v 3 - 4 luknje globoke približno 2 cm, ki smo jih naredili v substratu okoli stebela in tako omogočili dodatek ogorčic neposredno na korenine (Speijer in sod., 1997). V obravnavanju N1B2 smo 8. dan po inokulaciji ogorčic v substrat prav tako naredili luknje, kamor smo odpipetirali bakterijsko vodno suspenzijo. Prvih nekaj dni smo zalivali manj, da smo omogočili boljše pogoje za izleganje in vstop ličinkam *M. ethiopica*. Rastline smo naključno razporedili po rastni komori in jih med potekom poskusa večkrat prerazporedili, da bi zagotovili čim bolj enakomerne rastne pogoje.

Preglednica 3: Obravnavanja v lončnem poskusu I.
Table 3: Treatments in pot trial I.

Obravnavanja	1. Okuževanje (0 dpi)	2. Okuževanje	
	organizem (količina)	dpi	organizem (količina)
K	voda	/	/
N	<i>M. ethiopica</i>	/	/
NB	<i>M. ethiopica</i> + <i>A. tumefaciens</i> sev 06-424-7	/	/
N1B2	<i>M. ethiopica</i>	8	<i>A. tumefaciens</i> sev 06-424-7
N2B1	<i>A. tumefaciens</i> sev 06-424-7	2	<i>M. ethiopica</i>
N2npB1	<i>A. tumefaciens</i> sev 51-1	2	<i>M. ethiopica</i>

3.3.5 Način okuževanja in obravnavanja v lončnem poskusu II

Po pripravi rastlin paradižnika z ločenimi koreninami smo korenine paradižnika okuževali tik ob meji med stblom z rastnim substratom. Prve dni smo zalivali manj, da smo omogočili boljše izleganje in vstop ličinkam *M. ethiopica*. Lonce smo naključno razporedili po rastni komori in jih med potekom poskusa tedensko prerazporedili, da bi zagotovili čimbolj enakomerne rastne pogoje. Obravnavanja so opisana v Preglednici 4.

Preglednica 4: Obravnavanja v lončnem poskusu II.
Table 4: Treatments in pot trial II.

Obr.	1. del korenin		2. del korenin	
	dpi	organizem (količina)	dpi	organizem (količina)
N	0	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	/	/
N1B2	0	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	8	<i>A. tumefaciens</i> 06-424-7 (10^6 CFU g ⁻¹)
NB	0	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	0	<i>A. tumefaciens</i> 06-424-7 (10^6 CFU g ⁻¹)
N2B1	2	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	0	<i>A. tumefaciens</i> 06-424-7 (10^6 CFU g ⁻¹)
N2hkB1	0	mrtve celice seva 06-424-7	2	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)
N2Ec1	0	<i>E. coli</i> JM109 (10^6 CFU g ⁻¹)	2	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)

3.3.6 Način okuževanja in obravnavanja v lončnem poskusu III

Po pripravi rastlin paradižnika z ločenimi koreninami smo korenine paradižnika okuževali tik ob meji med stblom z rastnim substratom. Prve dni smo zalivali manj, da smo omogočili boljše izleganje in vstop ličinkam *M. ethiopica*. Steblo paradižnika smo ranili ob prvem nodiju s sterilnim zobotrebcom (velikost rane približno 5 mm) in v rano nanесли 24-urno kulturo patogenega seva 06-424-7. Po 8-ih in 12-ih dneh smo korenine obarvali (glej 3.3.7) in pod binokularjem prešteli ličinke, ki so vstopile. Obravnavanja so opisana v Preglednici 5.

Preglednica 5: Obravnavanja v lončnem poskusu III.
Table 5: Treatments in pot trial III.

Obr.	1. del korenin	2. del korenin
	organizem (količina)	organizem (količina)
N	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)
N_nb	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec) + sev 06-424-7 (10 ⁶ CFU g ⁻¹)
NB_n	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec) + sev 06-424-7 (10 ⁶ CFU g ⁻¹)	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)
Tumor na stebli	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)

3.3.7 Vrednotenje lončnega poskusa

Izračun dolžine razvojnega kroga *M. ethiopica*

Lončni poskus smo zaključili, ko se je zaključil prvi razvojni krog *M. ethiopica*. Izračun dolžine kroga je odvisen od povprečne temperature (Strajnar in sod., 2011) in traja pri povprečni temperaturi 23,3 °C 45 dni.

$$\ln(y) = 5,2115 - 0,01892 \times T_{povp} \ln(T_{povp}) \quad \dots (2)$$

T_{povp} = povprečna dnevna temperatura

y = dolžina razvojnega kroga

Vpliv ogorčic *M. ethiopica* in bakterij *A. tumefaciens* na indekse rasti paradižnika

Ob končanem poskusu smo odrezali stebila paradižnikov, izmerili njihovo dolžino in jih stehali. Zeleni del smo sušili pri 65 °C 3 dni oz. dokler masa suhe snovi ni več nihala. Stehtali smo tudi korenine, potem ko smo z njih sprali rastni substrat. Celotni koreninski sistem smo razrezali na 1 - 2 cm široke trakove, jih popivnali s suhim papirnatim robčkom in stehali (Speijer in sod., 1997). Kjer je bilo predvideno, smo odvzeli podvzorec mase 1 g in opravili nadaljnje analize (npr. štetje gal in jajčnih vrečk).

Barvanje jajčnih vrečk

Korenine smo namočili v raztopino barvila Phloxine B (0,15 g/l) za 15 – 20 min in roza obravane jajčne vrečke prešteli pod binokularjem (Speijer in sod., 1997).

Vpliv bakterij na razmnoževanje ogorčic

Za vrednotenje vpliva bakterij na razmnoževanje ogorčic smo ob koncu poskusa iz števila pridobljeni jajčec *M. ethiopica* izračunali reprodukcijski faktor (Rf). Faktor Rf smo izračunali iz razmerja med končnim številom jajčec *M. ethiopica* (Pf), pridobljenih po že opisanem postopku pridobivanja jajčec (glej 3.3.2), in dodano začetno količino jajčec na korenine paradižnika (Pi).

$$Rf = \left(\frac{Pf}{Pi}\right) \quad \dots (3)$$

Vpliv bakterij na vstop ličink ogorčice v korenine paradižnika

Štetje ličink v koreninah paradižnika ali navadnega repnjakovca smo opravili po barvanju ličink (Byrd in sod., 1983). Korenine smo previdno sprali pod vodo in večje korenine razrezali na 2-centimetrske trakove. En gram korenin smo prekrili z 1% raztopino NaOCl in inkubirali 4 min. Vsebino smo prelili iz čaše na sito (100-mikronsko za korenine *A. thaliana*; 250-mikronsko za korenine paradižnika) in spirali pod tekočo vodo 15 min ter 20 min namakali korenine v vodi. Po odlitju vode smo h koreninam prilili 30 ml vode ter 1 ml raztopine za barvanje, ki vsebuje barvilo fuksin. Čašo smo postavili v mikrovalovno pečico in segrevali do vretja (okoli 30 s). Čašo smo ohladili na sobni temperaturi (30 – 45 min) in zatem barvilo sprali s korenin. Sprane korenine smo prekrili z glicerolom in segrevali v mikrovalovni pečici dokler korenine niso porumenele. Čašo smo takoj postavili v hladno vodo, da smo preprečili izhajanje barvila iz ličink. Koreninske dele smo položili na petrijevko in prekrili s svežim glicerolom ter s stekelcem za lažje opazovanje pod binokularjem. Ličinke v korenini lahko preštevamo isti dan ali pa plošče zavijemo v plastično vrečko in shranimo v hladilniku do enega tedna ali dlje.

Sestava raztopine za barvanje:

Kisli fuksin	3,5 g
Ocetna kislina	250 ml
Voda	750 ml

Sestavine raztopimo v vodi in shranimo v temi.

3.4 IZLEGANJE LIČINK OGORČIC IN VITRO

S 4-tedenskih sadik paradižnika Arawak F1 smo s korenin sprali rastni substrat. Rastline smo prenesli v sterilno pollitrsko steklenico, kateri smo dodali 250 ml vodne raztopine. Uporabili smo dva vira vode: (1) sterilno deionizirano vodo; (2) sterilno deionizirano vodo, v katero smo dodali suspenzijo patogenega seva C58 *A. tumefaciens* v koncentraciji 10^6

CFU/ml. Sadike paradižnika smo fiksirali ob vrat steklenice s sterilno staničevino in steklenico ovili z aluminjasto folijo. Rastline smo prenesli v rastno komoro in jih ob nadzorovanih pogojih ($T_{\text{povp}} = 23,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$) vzdrževali 7 dni. Po sedmih dneh smo rastline odstranili in suspenzijo prefiltrirali skozi 0,20-mikronski filter. Vodni filtrat smo uporabili v testu izleganja ličink *M. ethiopica*.

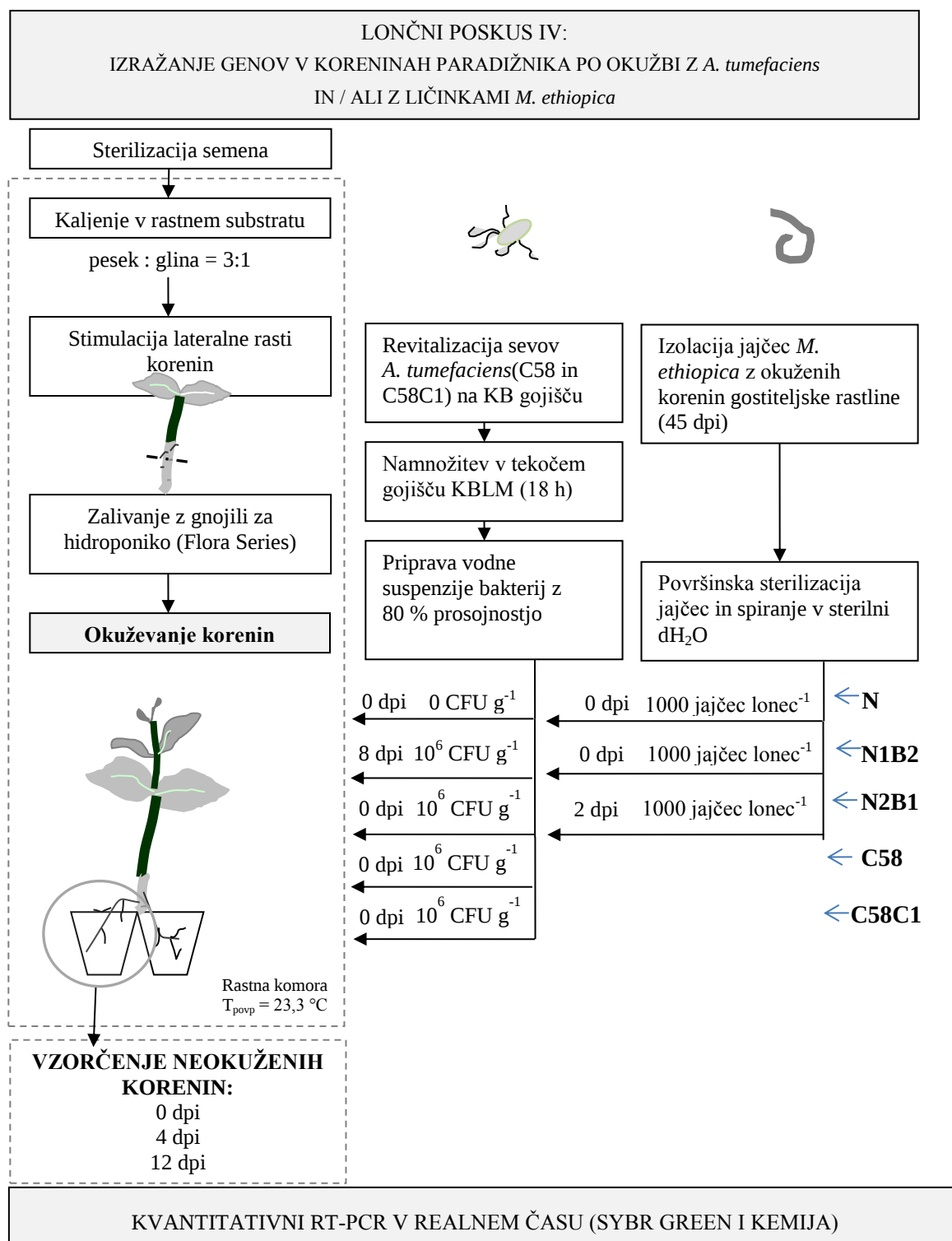
Pripravili smo površinsko sterilizirana jajčeca *M. ethiopica* pridobljena s korenin paradižnika. Koncentracijo jajčec smo umerili na 65 ± 5 jajčec v 100 μl sterilne deionizirane vode. V vsako luknjico na mikrotitrski ploščici s 24-imi luknjicami smo dodali 100 μl suspenzije jajčec in 300 μl vodne raztopine. Določili smo tri obravnavanja po 32 luknjic:

- (1) deionizirana voda,
- (2) filtrat deionizirane vode, v kateri so se namakale korenine paradižnika,
- (3) filtrat deionizirane vode, v kateri so se namakale korenine paradižnika okužene s suspenzijo patogenega seva *A. tumefaciens* C58.

Mikrotitrške ploščice smo pokrili s pokrovi in postavili v temo na temperaturo $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Preštevanje izleženih ličink smo opravili 3., 6. in 10. dan po začetku poskusa.

Rezultate smo analizirali v programu R z enosmernim testom ANOVA in skupine med seboj primerjali s Tukeyjevim HSD testom. Histogram smo narisali ob uporabi paketa ggplot2 (v.1.0).

3.5 METODA IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO METODO RT-PCR V REALNEM ČASU



Slika 14: Shematični prikaz poskusa za vrednotenje izražanja izbranih genov paradižnika kot odgovor na okužbo z ogorčicami *M. ethiopica* in bakterijami *A. tumefaciens*.

Figure 14: Gene expression study diagram for evaluating the effect of nematode *M. ethiopica* infestation and bacteria *A. tumefaciens* root infection on gene expression of targeted tomato genes.

Z metodo kvantitativnega RT-PCR v realnem času (qRT-PCR) smo kvantificirali raven izražanja prepisov RNA desetih genov paradižnika (Pregl. 6). Po izolaciji celokupne RNA s korenin paradižnika in obratni transkripciji RNA v cDNA smo spremenjeno izražanje tarčnih genov ocenili po metodi De Neve in sod. (2013), ki je nadgradnja neparametričnega testa Wilcoxon-Mann-Whitney. Stabilnost izražanja referenčnih genov smo ocenili po metodi Vandesompele in sod. (2002). Obe analizi smo izvedli v statističnem programu R s paketoma uWMWqPCR (De Neve in Meys, 2014) in SLqPCR (Kohl, 2007).

3.5.1 Obravnavanja v poskusu spremljanja sistemskega odziva paradižnika

Za zaznavanje sistemskega odziva paradižnika Arawak F1 na okužbo bodisi s patogenim sevom *A. tumefaciens* C58 bodisi na okužbo z ogorčicami *M. ethiopica*, smo postavili poskus z ločenimi koreninami. Vzorčili smo del korenin, ki ni bil v stiku z dodanimi organizmi, da smo se izognili izolaciji genskega materiala iz tkiva nastajajočih tumorjev ali nastajajočih gal. V vsakem od treh časovnih terminov pobiranja vzorcev (0, 4 in 12 dpi) smo med obravnavanjem imeli tudi neokužene paradižnike, ki so služili za kontrolo. Prvo vzorčenje (0 dpi) smo izvedli največ 15 min po dodatku bakterij oz. jajčec ogorčic. V obravnavanjih N2B1 in N1B2 smo dodajali preučevane organizme v različnih časovnih presledkih (Sl. 14, pregl. 6).

Preglednica 6: Oznake obravnavanj v poskusu spremljanja izražanja tarčnih genov.
Table 6: Treatments in gene expression study of target genes.

Obravnavanje	1. Okuževanje (0 dpi)		2. Okuževanje		3. Vzorčenje
	organizem (količina)	dpi	organizem (količina)		Dpi
K	voda	/	/		0, 4, 12
Me	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	/	/		0, 4, 12
C58	C58 (10^6 CFU/g)	/	/		0, 4, 12
C58C1	C58C1 (10^6 CFU/g)	/	/		0, 4, 12
N2B1	C58 (10^6 CFU/g)	2	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)		4, 12
N1B2	<i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec)	8	C58 (10^6 CFU/g)		12

3.5.2 Materiali in aparature

Vse PCR reakcije smo izvedli na aparaturi 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, ZDA) s kitom Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, ZDA) v 20 µl reakciji in s 40 cikli pri temperaturi naleganja začetnih oligonukleotidov 60 °C.

Material in kiti	Proizvajalec
Agilent RNA 6000 Nano Chips	Agilent Technologies, Nemčija
Eukaryotic 18S rRNA endogenous control (VIC®/MGB probe, primer limited)	Life Technologies, ZDA
High capacity archive reverse transcription kit	Life Technologies, ZDA
Power SYBR Green PCR Master Mix	Life Technologies, ZDA
RNase Inhibitor	Life Technologies, ZDA
Rneasy Plant Mini Kit	Qiagen, ZDA
TURBO DNase free kit	Life Technologies, ZDA

Aparature	Proizvajalec
Agilent SureCycler 8800	Agilent Technologies, Nemčija
7500 Fast Real-time PCR System	Life Technologies, ZDA
Centrifuga MPS 1000	Labnet International, Inc.
Razkrojevalec tkiv - TissueLyser	Retch GmbH, Qiagen, ZDA
Bioanalizator – Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Nemčija

3.5.3 Izolacija RNA s kitom Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Rastline paradižnika smo prenesli iz rastne komore v delovni prostor. Rastlini smo previdno odstranili oba lončka, da se je čim manj korenin pretrgalo. Neokužen del korenin smo spirali pod tekočo vodo, dokler nismo popolnoma sprali vseh peščenih in glinenih delcev. Tik preden smo korenine zmleli v tekočem dušiku, smo odrezali zeleni del od korenin. Terilnice in pestila smo predhodno sterilizirali in še dodatno toplotno sterilizirali na 180 °C 24 ur. Eno uro pred pričetkom mletja smo terilnice in pestila hladili na suhem ledu. Korenine smo zmleli v prah v tekočem dušiku in pripravili mikrocentrifugirke s primerno količino za izolacijo z Rneasy Plant Mini Kitom (Qiagen, Nemčija) ter jih shranili na – 80 °C do izolacije.

Koncentracijo in kakovost izolirane RNA smo preverili na aparaturi Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Nemčija) po priporočenem protokolu. Uporabili smo čipe (Agilent RNA 6000 Nano Chips) namenjene za analizo vzorcev RNA. Pred in po analizi smo elektrode očistili z RNase Away (Life Technologies, ZDA) in z RNaze prosto vodo.

3.5.4 Razgradnja genomske DNA

Po protokolu proizvajalca kita TURBO DNase free kit (Life Technologies, ZDA) smo v vzorcih RNA razgradili genomsko DNA. Genomsko DNA smo razgradili v 25 µl reakciji, ki je vsebovala 2 µg RNA. Vzorce smo shranili na -80 °C.

Uspešnost razgradnje smo preverili s pomnoževanjem 18S ribosomalne DNA v PCR reakciji v realnem času. Uporabili smo endogeno kontrolo v kitu Eukaryotic 18S rRNA endogenous control (VIC®/MGB probe, primer limited) po navodilih proizvajalca (Life Technologies, ZDA).

3.5.5 Obratno prepisovanje celokupne RNA v DNA

Prepis RNA v komplementarno DNA (cDNA) smo izvedli po navodilih proizvajalca kita High capacity archive reverse transcription kit (Life Technologies, ZDA). Sintezo smo izvedli v triplicatih v volumnu 20 µl. Po končani reakciji smo enake vzorce združili in shranili na -20 °C.

3.5.6 Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov

Iz virov literature smo izbrali 10 rastlinskih genov, za katere nas je zanimalo diferencialno izražanje genov v koreninah paradižnika glede na obravnavanje. Osredotočili smo se na signalizacijsko pot rastlinskih hormonov JA in ET. V evropski bazi nukleotidov (ENA), katere skrbnik je organizacija EMBL-EBI, smo poiskali zaporedja izbranih genov (*ACO1*, *ACS6*, *COI1*, *ERF5*, *JA3*, *SIWRKY11*, *PR-1*, *NIM1*, *SIWRKY72*, *DEA1*) in s pomočjo spletnega orodja Primer3 izbrali oligonukleotidne pare za izbrane gene z optimalno temperaturo naleganja 60 °C ter dolžino 20 do 22 bp. Specifičnost naleganja smo preverili z algoritmom Primer-BLAST (NCBI) na vseh nukleotidnih zaporedjih paradižnika (*Solanum lycopersicum*) dostopnih v bazi podatkov.

3.5.7 Optimizacija in validacija kvantitativne reakcije pomnoževanja DNA v realnem času

PCR reakcije na vseh 10 tarčnih in štirih referenčnih genih smo optimizirali na primerno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov ter izračunali učinkovitost pomnoževanja pri optimalni koncentraciji začetnikov. Reakcije smo optimizirali pri treh koncentracijah (300, 600 in 900 nM) na dveh različnih vzorcih v duplikatih. Nekatere reakcije smo dodatno optimizirali v območju 70 – 200 nM. Za vsako kombinacijo smo dodali negativno kontrolo z vodo (NTC). Po reakciji smo ocenili specifičnost reakcije na podlagi disociacijske krivulje ter dodatno preverili specifičnost pomnoževanja z 2 % agarozno elektroforezo. Izbrali smo tiste koncentracije, pri katerih je bila vrednost ΔR_n največja in vrednost C_q najmanjša (Nolan, 2006). Za vsak gen smo pripravili standardne krivulje na osnovi petih redčitev cDNA iz mešanih vzorcev v razmerju 1:5. Reakcijo smo izvedli v triplicatih. Učinkovitost pomnoževanja smo izračunali s programom 7500 Software v.2.0.6 (Life Technologies, ZDA) iz naklona linearne regresijske premice med vrednostmi C_q in logaritmirano koncentracijo DNA po standardni enačbi (Rutledge in Cote, 2003):

$$E_k = \left[10^{\left(-\frac{1}{k}\right)} - 1 \right], \quad \dots (4)$$

kjer je E_k učinkovitost pomnoževanja gena v reakciji PCR in k naklon premice.

3.5.8 Analiza diferencialne ekspresije po metodi razširjenega testa Wilcoxon-Mann-Whitney

S klasičnim načinom analize diferencialnega izražanja, t.j. relativno kvantifikacijo, med sabo primerjamo spremembe v ravneh mRNA dveh ali več genov v ravnovesnih pogojih. Ob tem mora biti eden od genov referenčni gen. Da po primerjavi različnih vzorcev med sabo dobimo n -kratno razliko v izražanju genov, moramo v analizo vključiti še kalibratorske vzorce. To so vzorci, kjer je razlika v izražanju tarčnega gena in referenčnega gena konstantna. Rezultat primerjave med različnimi vzorci je torej razmerje med razliko izražanja tarčnega gena in referenčnega gena v enem vzorcu in isto razliko v kalibratorskem vzorcu.

Splošna formula za izračun diferencialnega izražanja (Pfaffl, 2001), kjer je E učinkovitost pomnoževanja gena, ΔCq pa razlika v kvantifikacijskem ciklu med dvema vzorcema:

$$R = \frac{(E_{tarčni})^{\Delta Cq_{tarčni(kontrola-vzorec)}}}{(E_{ref})^{\Delta Cq_{ref(kontrola-vzorec)}}} \quad \dots (5)$$

Model qBase (Hellemans in sod., 2007) predvideva, da je učinkovitost pomnoževanja (E) v reakciji PCR odvisna od testa in neodvisna od vzorcev. Rezultat qPCR so vrednosti Cq za vsak posamezen vzorec testiran na izražanje določenega gena. Vrednosti Cq so obratno sorazmerne količini tarčnega zaporedja. Večja kot je količina pomnožka, hitreje narašča fluorescenca in manjša je vrednost Cq .

Rezultati qPCR so podvrženi variacijam, do katerih prihaja med poskusom. Te variacije niso nujno enake v vseh primerjanih obravnavanjih. Med omenjene variacije prištevamo npr. napake v kvantifikaciji fluorescence (Lalam, 2007), razlike v količini začetnega materiala ter od učinkovitosti encimov (Vandesompele in sod., 2002). Vse to vpliva na položaj in rep porazdelitve gostote. De Neve in sod. (2013) predlagajo, da bi moral test za oceno diferencialnega izražanja upoštevati tudi variacije med poskusi s t.i. normalizacijsko konstanto, upoštevati položaj in učinke na obliko repov gostote z mero velikosti učinka, ter biti robusten na prisotnost osamelcev. Prav tako bi se morala negotovost, ki je povezana z normalizacijo, upoštevati v končnem statističnem povzetku analize.

Preglednica 7: Seznam tarčnih in referenčnih genov s pripadajočimi oligonukleotidnimi začetniki, ki smo jih uporabili v študiji.

Table 7: A list of target and reference genes with primer pair sequences used in this study.

Simbol gena	Ime gena	Par oligonukleotidnih začetnikov (5' – 3')	Dolžina pomnožka (bp)	Akc. št. zaporedja
PR-1	S patogenezo povezan protein 1	TGTCCGAGAGGCCAAGCTATAAC AATGAACCACCATCCGTTGTTGC	143	DQ159948 (Song in sod., 2011)
NIM1	Neinducibilna imunost 1 (sin. NPR1)	GCTTTTTCGGATTCCAATGA GATGCACCGGAATTCCTTA	202	NM_001247629.1
ERF5	Etilen odzivni dejavnik 5	TGGAGCAACCGATTTCTAGC AACTTACGCACCCTCAATGC	247	AY600439.1
ACO1	1-amino-ciklopropan-1-karboksilat (ACC) oksidaza	TGAGTTGGTGAACCATGGAA AGTAGGAAGATGGCGCAAGA	190	NM_001247095.1
ACS6	ACC sintaza 6	CAACCGCGTTTAGTCAACCT GACAACGGCATCATTGTACG	164	NM_001247235.1
JA3	Jasmonska kislina 3	CAGTTTTGCCTTCTTCGGGC TTCGCTGGCTTTCTACCTCG	154	XM_004245847.1
COI1	Koronatin neodzivni protein 1	GGCTGCTGTTTCAGTGAACG GCTGGATGCTCCGAGACTAC	212	NM_001247535.1
S/WRKY11	Transkripcijski dejavnik 11 iz družine WRKY	ATCCGGTTCGTTTCATTTCA GGATTTGTCAACGGCGATAG	200	XM_004244436.1
S/WRKY72	Transkripcijski dejavnik 72 iz družine WRKY	AGCCCAGTAATGATCCAAGC GTTGGGTAAATCGCACTTGGT	154	XM_004233876.1
DEA1	Induciran z arahidonsko kislino	TGTTCTTGGAATTTGCTTGG TAGGGCATTGAAAGCCAGAT	215	NM_001246895.1
BTUB	Beta-tubulin (referenčni gen)	AACCTCCATTCAGGAGATGTTT TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT	180	DQ205342 (Løvdal in Lillo, 2009)
UBI	Ubikvitin (referenčni gen)	ACCAAGCCAAAGAAGATCAAGC GTGAGCCCACACTTACCACAGT	200	X58253 (Fernández in sod., 2014)
EF1L	Elongacijski dejavnik 1 alfa (referenčni gen)	CTCCGTCTTCCACTTCAGG TCAGTTGTCAAACCAGTAGGG	128	X14449 (Fowler in sod., 2009)
RPL2	Ribosomalni protein L2 (referenčni gen)	GTCATCCTTTTCAGGTACAAGCA CGTTACAAACAACAGCTCCTTC	156	X64562 (Løvdal in Lillo, 2009)

De Neve in sod. (2013) so v ta namen razširili test Wilcoxon-Mann-Whitney (uWMW), tako da so v test vključili še normalizacijo. Obe meri, normalizacijska konstanta in učinek velikosti, sta definirani v smislu verjetnosti $P(Y \leq Y') := P(Y < Y') + 0,5 P(Y = Y')$, pri čemer Y in Y' označujeta Cq vrednosti dveh neodvisnih obravnavanj. To verjetnost pojmuje kot

probabilistični indeks (PI). Test uWMW je test rangiranja, kjer testiramo ničelno hipotezo, da imata Y in Y' sovpadajočo porazdelitev, v nasprotju z alternativno hipotezo, ki pravi $P(Y \leq Y') \neq 0,5$. Test WMW je v osnovi neparametričen. Razširjena različica De Neve in sod. (2013) pa uporablja polparametrični okvir testa WMW za ovrednotenje diferencialnega izražanja, hkrati pa podatke tudi normalizira. Test je primeren za analizo podatkov kvantitativnega PCR, kjer je povezava med številom molekul in ciklom kvantifikacije (Cq) odvisna od učinkovitosti reakcije PCR, katerih vrednosti v vsakem vzorcu ne poznamo.

Algoritmi razširjenega testa WMW (ang. *Unified WMW test*) so prosto dostopni v R paketu *unifiedWMWqPCR* na spletni strani Bioconductor (Bioconductor, 2015).

3.5.9 Ovrednotenje stabilnosti izražanja referenčnih genov

Stabilnost izražanja referenčnih genov za beta tubulin (BTUB), ubikvitin (UBI), elongacijski dejavnik 1 alfa (EF1L) ter ribosomalni protein (RPL2) smo ovrednotili po metodi Vandesompele in sod. (2002) z R paketom SLqPCR (Kohl, 2007).

Vrednostim Cq posameznih genov najprej odštejemo aritmetično sredino Cq vrednosti vseh vzorcev testiranih na preučevani referenčni gen in to število imenujemo kalibratorska vrednost kvantifikacijskega cikla (Enačba 6).

$$\overline{Cq}_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^n Cq_{ijk}}{n} \quad \dots (6)$$

Povprečne vrednosti Cq pretvorimo v relativno količino (RQ) (Enačbe 7 do 9).

$$Cq_{referenčni,j} = \overline{Cq}_j = \frac{\sum_{k=1}^s Cq_{jk}}{s} \quad \dots (7)$$

$$\Delta Cq_{jk} = Cq_{referenčni,j} - Cq_{jk} \quad \dots (8)$$

$$RQ_{jk} = E_j^{\Delta Cq_{jk}} \quad \dots (9)$$

Parameter M , ki je mera za stabilnost izražanja, je izražen kot aritmetična sredina vrednosti M za vsak referenčni gen, ki jo izračunamo iz vseh parnih variacij med referenčnimi geni ($V_{gen1/gen2}$). Najprej izračunamo matriko A^{gena} velikosti $s \times 1$, kjer za vsak vzorec izračunamo log2-razmerje med relativnima količinama dveh referenčnih genov (Enačba 10).

$$(\forall p, p' \in [1, f], p \neq p') : A_{pp'}^{gena} = \log_2 \left(\frac{RQ_{kp}}{RQ_{kp'}} \right) \quad \dots (10)$$

Sledi izračun povprečnega log2-razmerja in standardne deviacije V^{gena} za vse vzorce k in vse kombinacije referenčnih genov (p, p'). Parameter V^{gena} je geNorm variacija med paroma referenčnih genov.

$$A_{pp'}^{gena} = \frac{\sum_{k=1}^s A_{pp'k}^{gena}}{s} \quad \dots (11)$$

$$V_{pp'}^{gena} = SD(A_{pp'}^{gena}) = \sqrt{\frac{1}{s-1} \sum_{k=1}^s (A_{pp'k}^{gena} - \overline{A_{pp'}^{gena}})^2} \quad \dots (12)$$

$$M_p^{gena} = \frac{\sum_{p'=1}^f V_{pp'}^{gena}}{f-1} \quad \dots (13)$$

Iz vseh vrednosti M za posamezen referenčni gen izračunamo povprečno stabilnost za vse referenčne gene.

$$\overline{M^{gena}} = \frac{\sum_{p=1}^f M_p^{gena}}{f} \quad \dots (14)$$

Za ovrednotenje stabilnosti referenčnega gena uporabljamo koeficient variacije (CV, %) (Enačbe 15 do 18) ter vrednost M (Enačbi 13 in 14).

$$\overline{NRQ_p} = \frac{\sum_{k=1}^s NRQ_{pk}}{s} \quad \dots (15)$$

$$SE(NRQ_p) = \sqrt{\frac{1}{s-1} \sum_{k=1}^s (NRQ_{pk} - \overline{NRQ_p})^2} \quad \dots (16)$$

$$CV_p = \frac{SE(NRQ_p)}{\overline{NRQ_p}} \quad \dots (17)$$

$$\overline{CV} = \frac{\sum_{p=1}^f CV_p}{f} \quad \dots (18)$$

3.5.10 Inter-reakcijska kalibracija

Teoretično je učinkovitost pomnoževanja gena enaka v vseh reakcijah, vendar v praksi prihaja do zamika v vrednostih C_q zaradi različnih vzrokov kot npr. korekcija bazne linije in postavitev mejnih vrednosti. Tehnično variacijo v vrednostih C_q smo zmanjšali z vključitvijo treh vzorcev IRC na vsako ploščico. IRC je inter-reakcijski kalibratorski vzorec. Variacije v vrednostih C_q za isti gen poenotimo tako, da izračunamo povprečno razliko v vrednostih C_q med vsemi tremi vzorci IRC na obeh reakcijskih ploščicah in nato vsem vzorcem na ploščici z višjimi vrednostmi C_q odštejemo izračunano razliko C_q .

3.6 STATISTIČNE METODE

Za statistično analizo rezultatov lončnega poskusa smo uporabili statistični program *R* (v. 3.1.0) (R Development Core Team, 2008) s paketi *Rcmdr* (v. 1.9-6), *agricolae*, *ggplot2* ter *plyr*. Homogenost varianc med obravnavanji smo ugotavljali z Levenovim testom,

obravnavanja med sabo primerjali z enosmerno analizo varianc (ANOVA, $p \leq 0,05$) ter iskali statistično značilne razlike med obravnavanji s Tukeyjevim HSD testom.

Pri lončnem poskusu I, ki je bil vrednoten 45 dpi in ponavljan dvakrat, smo podatke združili, ker je bila varianca v obeh poskusih enaka. Kjer je bilo potrebno, smo podatke transformirali (transformacija $\log(x+1)$), da smo zagotovili normalno porazdelitev varianc.

Za statistično analizo rezultatov kvantitativnega PCR smo uporabili statistični program *R* (v. 3.1.0) s paketi *Rcmdr* (v. 1.9-6), *SLqPCR* (v. 2.14) ter *uWMWqPCR* z vključeno normalizacijo (v. 2.14). Grafikoni verjetnosti izražanja genov so bili narejeni z grafičnim programom Microsoft Excel.

4 REZULTATI

4.1 ŠTUDIJA RAZNOLIKOSTI TALNIH IZOLATOV *Agrobacterium tumefaciens* S KMETIJSKIH POVRŠIN NA PODLAGI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA *recA*

4.1.1 Ugotavljanje prisotnosti izolatov *A. tumefaciens* v tleh in testiranje patogenosti sevov

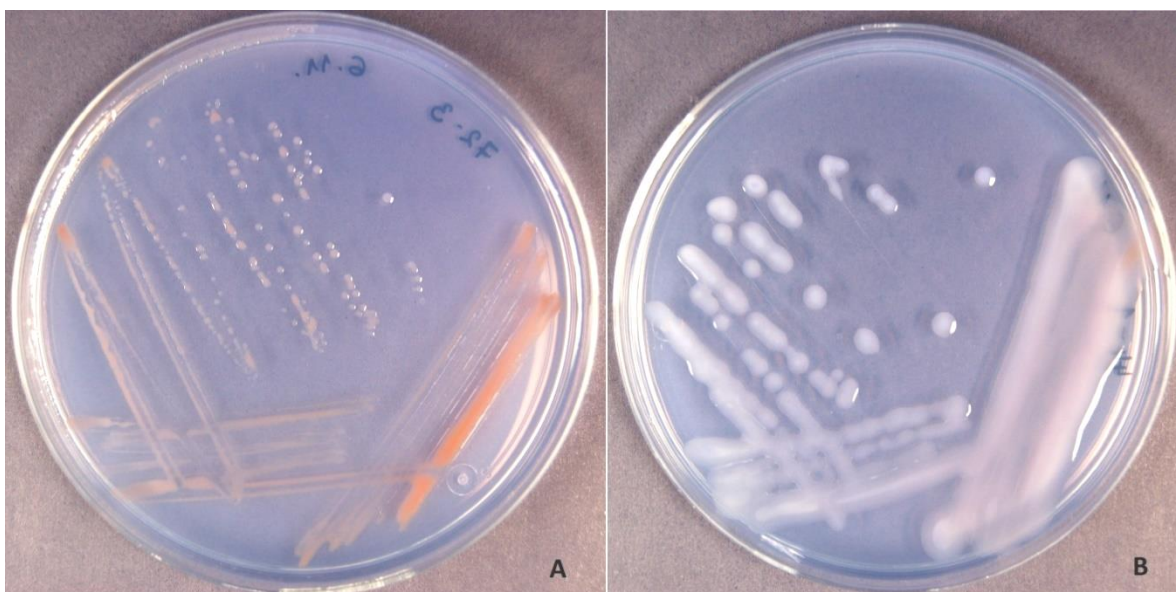
Na selektivnem gojišču 1A smo izolirali 63 sevov *A. tumefaciens* iz 72 vzorcev tal (88 %). Iz gozdnih tal nam ni uspeli izolirati nobenega. Gostoto populacije izolatov *A. tumefaciens* biovar 1 v tleh smo ocenili po metodi neposrednega štetja s plošč 1A. Populacija se je gibala med 5×10^2 do 3×10^6 CFU/g. Povprečna populacijska gostota v vseh vzorcih tal je bila med 10^3 in 10^4 CFU/g. Vsi izolati so se izkazali za nepatogene, saj niso spodbudili tvorbe tumorjev na okuženih testnih gostiteljskih rastlinah.

Na podlagi vizualnega opazovanja smo opazili oranžnorjavo pigmentacijo vseh sevov iz genomske vrste G1 na gojišču 1A po 4 dneh na 27 °C (Sl. 15A). Vsi sevi G4 pa so na 1A gojišču tvorili svetlovijolične kolonije (Sl. 15B). Morfologija kolonij sevov G1 je bila izbočena, svetleča in okrogla. Sevi iz vrste G4 pa so na gojišču tvorili več sluzi. Razlike v morfologiji kolonij smo opazili tudi na gojišču KB pri 27 in 21 °C. Vse kolonije sevov G1 so imele na gojišču KB robat in zguban center, medtem ko so kolonije sevov G4 tvorile več sluzi, kar jim je dajalo videz svetleče in gladke površine. Hrapav videz kolonij G1 je izginil pri 12 °C, kar smo opazili na sedmih naključno izbranih sevih G1 (Sl. 16). Pri temperaturi 12 °C je morfologija kolonij G4 ostala enaka kot pri 21 °C.

4.1.2 Raznolikost zaporedja alelov gena *recA*

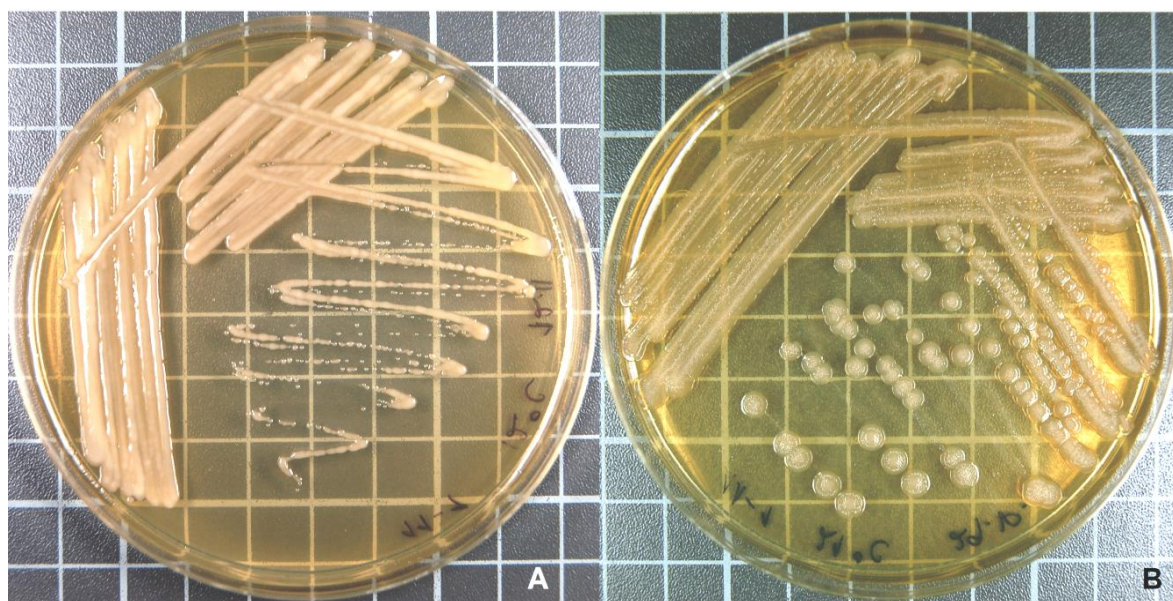
Vsa zaporedja gena *recA*, ki smo jih določili, smo oddali v zbirko GenBank (Aks. št. KC291939 - KC292007).

Po pomnoževanju gena *recA* s parom oligonukleotidnih začetnikov FwdrecA2 - F2899 smo dobili 1138 bp dolg pomnožek. Po določitvi zaporedjih smo razvrstili vseh 69 zaporedij gena *recA* v 25 skupin z identičnimi zaporedji glede na izračune matrike identičnosti. Teh 25 skupin predstavlja 25 različnih *recA* alelov (Pregl. 8).



Slika 15: Morfologija kolonij sevov *Agrobacterium tumefaciens* iz genomske vrste G1 in G4 na 1A gojišču. Kulture smo inkubirali 4 dni pri 27 °C. (A) Oranžnorjava pigmentacija seva 72-3 iz genomske vrste G1. (B) Svetlo vijolična pigmentacija in sluzavost kolonij seva 44-1 iz genomske vrste G4.

Figure 15: Colony morphologies of *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G1 and G4 on 1A medium. Cultures were incubated at 27 °C for 4 days. (A) Orange-brown pigmentation of genomic species G1 (strain 72-3). (B) Lavender pigmentation and mucoid phenotype of genomic species G4 (strain 44-1).



Slika 16: Morfologija kolonij med sevi G1 (prikazan sev 11-1) se je razlikovala pri gojenju na 12 oz. 21 °C na gojišču KB. (A) Gladke kolonije pri 12 °C po 1 tednu. (B) Hrapave kolonije pri 21 °C po 4 dneh.

Figure 16: Colony morphologies of G1 strains (11-1) differed at 12 or 21°C on KB medium. (A) Smooth colonies at 12°C after 1 week. (B) Rough colonies at 21°C after 4 days.

Preglednica 8: Raznolikost in pogostost alelov *recA* v talnih sevih *A. tumefaciens* biovar 1 izoliranih iz tal kmetijskih površin v Sloveniji.

Table 8: The diversity and frequency of *recA* alleles of the *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 soil populations from agricultural habitats in Slovenia.

Genomska vrsta	Status alelov	Št. alelov	Koda alela	Št. izoliranih sevov
G1	Znan	1	<i>recA-G1-1</i>	2
		2	<i>recA-G1-2</i>	5
		3	<i>recA-G1-6</i>	7
			<i>recA-G1-6*</i>	1
		4	<i>recA-G1-7</i>	3
			<i>recA-G1-7*</i>	1
		5	<i>recA-G1-10</i>	1
	Nov	6	<i>recA-G1-12</i>	2
		7	<i>recA-G1-14</i>	4
		8	<i>recA-G1-15</i>	8
		9	<i>recA-G1-16</i>	3
		10	<i>recA-G1-17</i>	2
		11	<i>recA-G1-18</i>	1
		12	<i>recA-G1-19</i>	1
		10	<i>recA-G1-20</i>	1
		11	<i>recA-G1-21</i>	1
		Skupno G1		43 sevov
G4	Znan	1	<i>recA-G4-1</i>	1
		2	<i>recA-G4-2*</i>	10
		3	<i>recA-G4-5</i>	4
	Nov	4	<i>recA-G4-7</i>	1
		5	<i>recA-G4-8</i>	5
		6	<i>recA-G4-9</i>	3
		7	<i>recA-G4-10</i>	2
		Skupaj G4		26 sevov
		Skupaj G1+ G4		69 sevov

Glede na podobnost z ostalimi zaporedji *recA* smo z algoritmom BlastN (NCBI) razvrstili seve s pripadajočimi aleli *recA* v genomske vrste. Od skupno 25 alelnih skupin smo 11 skupin opredelili kot genomsko vrsto G1 in 7 skupin v genomsko vrsto G4 (*A. radiobacter*). Devetinštirideset naših zaporedij *recA* je ustrezalo že znanim alelom. Preostalih 28 zaporedij pa je imelo 4 do 12 zamenjav v baznem zaporedju in 99 % podobnost z enim od že znanih zaporedij gena *recA* (E -vrednost = 0,0). Vsakemu na novo določenemu zaporedju *recA* smo dali novo številko. Zaporedja, ki so se od znanih

zaporedij razlikovala samo v eni zamenjani bazi smo označili z zvezdico (*), saj le-ti ne predstavljajo novih alelov (Pregl. 8).

V sevih *A. tumefaciens* iz vzorcev slovenskih tal sta prevladovala dva *recA* alela, in sicer *recA*-G1-15 iz vrste G1 in *recA*-G4-2* iz vrste G4 (Pregl. 8). Alel *recA*-G1-15 ima veliko podobnost z zaporedjem alela *recA*-G1-4 (*A. tumefaciens* sev CFBP 5622, akc. št. FM164291.1), vendar se od njega razlikuje v desetih bazah. Alel *recA*-G4-2* je pravzaprav že znan alel *recA*-G4-2 (*A. tumefaciens* sev ATCC 4718, akc. št. FM164308.1) z eno zamenjano bazo.

Čeprav smo odkrili veliko število novih *recA* alelov, pa dajo vsi aleli G1 identično proteinsko zaporedje, če jih prevedemo *in silico*. Pri alelih G4 smo odkrili večjo raznolikost tudi v proteinskih zaporednjih. Zaporedja G4 so se od G1 proteinskih zaporedij razlikovalav petih aminokislinah (I/V₄₀, N/G₁₁₃, I/V₁₄₀, M/T₃₁₅ in S/N₃₁₇). Izjemo med aleli G1 nosi sev 51-1, ki se od preostalih proteinskih zaporedij alelov G1 razlikuje v eni aminokislini (S/N₃₁₇).

Preverili smo tudi selekcijski pritisk na lokus *recA*. Stopnjo selekcije smo ocenili z izračunom razmerja med nesinonimnimi in sinonimnimi zamenjavami baz (razmerje d_N/d_S). Razmerje d_N/d_S gena *recA* naših sevov je bilo pod 1, kar kaže na odsotnost močnega pozitivnega selekcijskega pritiska na *recA* lokus (Pregl. 9).

Preglednica 9: Analiza zaporedja gena *recA* med slovenskimi talnimi sevi *A. tumefaciens* biovar 1.
Table 9: Analysis of the *recA* gene fragment in the *A. tumefaciens* biovar 1 soil isolates.

Genomska vrsta	Velikost pomnožka (bp)	Št. alelov	Št. polimorfnihi mest	d_N/d_S
G1	969	11	40	0,022
G4	969	7	22	0,024
G1+G4	969	18	109	0,023

Genomski vrsti G1 in G4 smo našli na vseh vzorčenih kmetijskih površinah, razen v gozdnih tleh. Porazdeljenost vrst med pokrajinami je bila skoraj enaka na Savinjskem (G1/G4 = 19/13), Spodnjeposavskem (G1/G4 = 4/6) in v Podravju (G1/G4 = 6/4). Na Gorenjskem pa je prevladovala vrsta G1. V tleh sadnih nasadov smo našli 32 sevov od 53 (60 %), ki smo jih uvrstili v vrsto G1. Iz nekaterih vzorcev tal (n = 3) smo izolirali predstavnike obeh vrst. Na splošno pa nismo zaznali neke očitne povezave med porazdelitvijo *recA* alelov in kmetijskimi površinami. Iz šestih vzorcev tal smo celo izolirali seve z različnimi *recA* aleli iz iste genomske vrste.

4.2 VSTOP LIČINK *M. ethiopica* V KORENINE *A. thaliana* IN VITRO

Vstop infektivnih ličink J2 *M. ethiopica* v korenine *A. thaliana* smo vrednotili tri tedne po inokulaciji od 20 do 100 izleženih ličink J2 neposredno ob korenine 14 dni stare kulture *A. thaliana* *in vitro*. Test je bil narejen pred lončnimi poskusi na paradižniku za ocenitev posrednega vpliva bakterij na vstop ličink ogorčic v korenine.



Slika 17: Prikaz tehnike ločenih korenin *in vitro* za vrednotenje sistemskega odziva rastline *A. thaliana* ob prisotnosti ličink ogorčic in bakterij na ločenih straneh korenine.

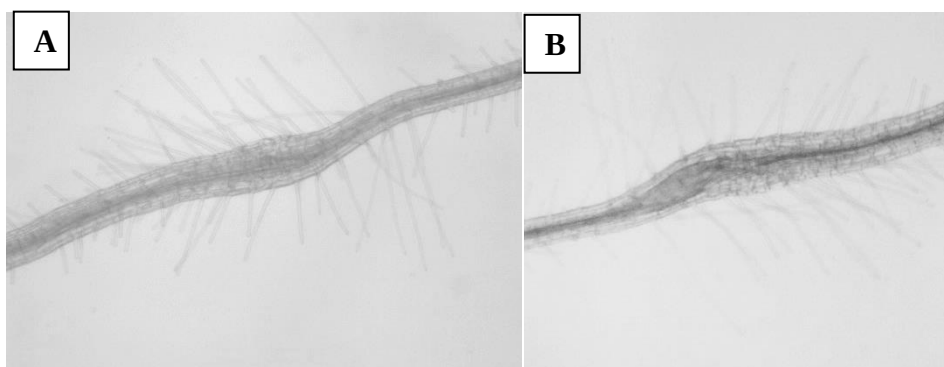
Figure 17: *In vitro* split-root technique for evaluating *A. thaliana* systemic response to nematode and presence of bacteria on splitted roots.

Korenine *A. thaliana* so tanke in prosojne, in kot take primerne za opazovanje vstopa ličink ogorčic. Vstop ličinke v korenino je viden že tretji dan po inokulaciji kot zadebelitev na mestu, kjer si ogorčica ustvari prehranjevalno mesto (gigantska celica). Po enem tednu ličinka ni več vidna zaradi hipertrofije tkiva. Število ogorčic v korenini po tretjem dnevu in po treh tednih se ni razlikovalo (podatki niso prikazani). Z barvanjem smo se prepričali, da je v vsaki gali le ena ličinka *M. ethiopica*, četudi so se gale po velikosti razlikovale.



Slika 18: Infektivni ličinki *M. ethiopica* se pripravljata na vstop v korenine *A. thaliana* *in vitro*.

Figure 18: Infective juveniles of *M. ethiopica* preparing to enter *A. thaliana* roots *in vitro*.



Slika 19: Ustvarjanje mesta prehranjevanja (A) 3 dni in (B) 4 dni po vstopu ličinke *M. ethiopica* v korenine *A. thaliana* *in vitro*.

Figure 19: Feeding site initiation (A) 3 days and (B) 4 days upon *M. ethiopica* J2 penetration into *A. thaliana* roots *in vitro*.

Preglednica 10: Vstop ličink *M. ethiopica* v korenine *A. thaliana* *in vitro* ob posredni in neposredni prisotnosti bakterij *A. tumefaciens* na koreninah.

Table 10: Penetration of *M. ethiopica* J2 into *A. thaliana* roots *in vitro* affected by direct and indirect presence of *A. tumefaciens* on the roots.

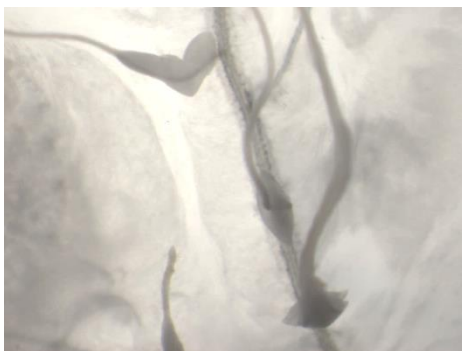
Oznaka obravnavanja	Okuževanje		Št. J2 v korenini	Delež J2 v korenini (%)
	1. predelek	2. predelek		
I	100 J2	/	$3,0 \pm 0,8$ b	$3,0 \pm 0,8$ bc
II	100 J2	100 CFU <i>A. tumefaciens</i>	$2,8 \pm 0,8$ b	$2,8 \pm 0,8$ bc
III	100 J2 +10 CFU <i>A. tumefaciens</i>	/	$0,0 \pm 0,0$ a	$0,0 \pm 0,0$ c
IV	20 J2	/	$2,8 \pm 0,7$ b	$13,8 \pm 3,5$ a
V	20 J2	100 CFU <i>A. tumefaciens</i>	$2,8 \pm 1,3$ b	$14,2 \pm 6,6$ a
VI	20 J2 + 10 CFU <i>A. tumefaciens</i>	/	$1,6 \pm 0,6$ b	$8,0 \pm 2,7$ ab

Črke za številom in deležem ličink (a-c) v stolpcih prikazujejo statistično značilne razlike med obravnavanji (LSD test, $p \leq 0,05$). Enake črke pripadajo obravnavanjem, med katerimi ni statistično značilnih razlik.

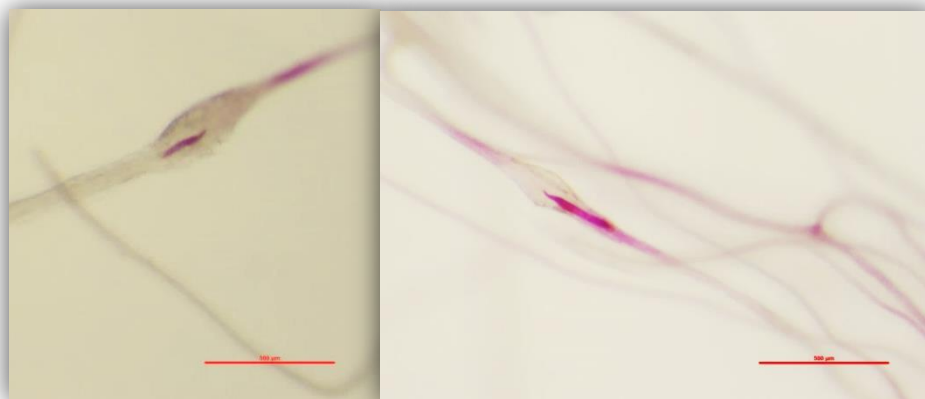
Izkazalo se je, da je 100 ličink nanosenih na polovico korenin preveč, kar se kaže v majhnem deležu ličink, ki vstopijo v korenino ob visokem inokulumu ličink. Ob večjem inokulumu ličink smo opazili tudi več raztrganih koreninskih vršičkov, najverjetneje kot posledico tekmovanja med ličinkami. Prisotnost bakterij na koreninah ni vplivala na vstop ličink *M. ethiopica*, kadar organizma nista bila v neposrednem stiku (Pregl. 10, obravnavanji II in V).

Bakterijski sev *A. tumefaciens* 06-424-7 povzroča tumorje na gostiteljskih rastlinah, vendar tumorjev v našem *in vitro* poskusu nismo opazili. Čeprav je bila dodana koncentracija bakterij sprva nizka (Pregl. 10), se je gostota hitro dvignila zaradi rasti bakterij na gojišču. Po enem tednu so bakterije v celoti poselile korenino. Sev po treh tednih na koreninah ni izgubil patogenosti, saj je po izolaciji s korenin in inokulaciji na testne rastline (paradižnik, sončnica in kalanhoja) zopet povzročil nastanek tumorjev. Čeprav sta bila gostota bakterij in čas prisotnosti ugodna za nastanek tumorjev, pa so morda drugi pogoji v *in vitro* sistemu onemogočili nastanek tumorjev.

V obravnavanju III, kjer sta bili bakterija in ličinka v neposrednem stiku nismo našli nobene gale. Bakterija je s svojo rastjo in tvorbo sluzaste prevleke na korenini preprečila ličinki vstop v korenino.



Slika 20: Tvorba bakterijskega biofilma na koreninah *A. thaliana* v sistemu *in vitro*.
Figure 20: Bacterial biofilm formation on *A. thaliana* roots *in vitro*.



Slika 21: Obarvani ličinki *M. ethiopica* v galah na korenini *A. thaliana* 3 dpi *in vitro*. Enota velikosti na sliki predstavlja 500 µm.
Figure 21: Stained *M. ethiopica* juveniles inside the *A. thaliana* root galls 3 dpi *in vitro*. Size unit represents 500 µm.

4.3 LONČNI POSKUSI NA PARADIŽNIKU

Poskuse študije o medsebojnem odnosu med ogorčico *M. ethiopica* in patogeno bakterijo *A. tumefaciens* smo izvedli na hibridni sorti paradižnika Arawak F1, ki je občutljiva za napad z ogorčicami koreninskih šišek. Vsi lončni poskusi so potekali v rastni komori ob nadzorovanih pogojih. Posamezna obravnavanja so označena s kraticami, ki so razložene v spodnji preglednici.

Preglednica 11: Obravnavanja v lončnih poskusih za ugotavljanje medsebojnega odnosa med ogorčico in bakterijo na koreninah paradižnika.

Table 11: Treatments in the pot trial study to evaluate interaction between the nematode and bacteria on roots of tomato.

Obravnavanja	Opis
Kontrola	Neokužena rastlina
N	Rastlina okužena samo z jajčeci ogorčice <i>M. ethiopica</i>
B	Rastlina okužena s patogenim sevom <i>A. tumefaciens</i>
NB	Sočasna okužba korenin z jajčeci ogorčic in suspenzijo bakterij
N1B2	Prvo okužimo korenine z jajčeci ogorčic, čez 1 teden sledi okužba s suspenzijo bakterij
N2B1	Prvo okužimo korenine s suspenzijo bakterij, čez 2 dni dodamo jajčeca ogorčic
N2npB1	Prvo okužimo korenine s suspenzijo nepatogenih bakterij, čez 2 dni dodamo jajčeca ogorčic

4.3.1 Vpliv ogorčice in bakterije na rast paradižnika

Okužba korenin paradižnika z ogorčico ali z bakterijo ni imela statistično značilnega vpliva na težo korenin ter na svežo in suho težo poganjka 45 dpi. Statistično značilen vpliv pa se je pokazal na višino rastlin. Kontrolne rastline so bile v povprečju za 35 mm višje od okuženih (Pregl. 12).

Po 90-ih dneh so se pokazale večje razlike. Teža okuženih korenin se je povečala v primerjavi s kontrolo ($p < 0,001$), vendar se je hkrati zmanjšala sveža in suha teža poganjka ($p < 0,05$). Višina poganjkov je bila v vseh obravnavanjih enaka. Največji upad v sveži teži so doživele rastline okužene samo z ogorčico, ki so bile v povprečju 15 g lažje od sveže teže kontrolnih rastlin. Njihova suha teža pa je bila v povprečju 1,8 g manjša od kontrolne. Enako smo ugotovili za rastline v obravnavanju N1B2 (Pregl. 13). Vizualni pregled korenin je pokazal na prisotnost večjega števila nekrotičnih korenin na okuženih koreninah, zlasti v obravnavanju N1B2, ko smo k ogorčicam kasneje dodali še agrobakterije.

Preglednica 12: Indeksi rasti paradižnika Arawak F1 okuženega z jajčeci *M. ethiopica* in bakterijo *A. tumefaciens* (45 dpi).

Table 12: Growth indices of tomato Arawak F1 infected with *M. ethiopica* eggs and *A. tumefaciens* bacteria (45 dpi).

Obravnavanje	Teža korenin (g)	Sveža teža nadzemnega dela (g)	Suha teža nadzemnega dela (g)	Višina rastline (mm)
Kontrola	4,9 ± 0,3	17,8 ± 1,4	1,8 ± 0,2	292,5 ± 7,2 b
N	5,1 ± 0,3	15,6 ± 1,1	1,6 ± 0,2	261,6 ± 4,1 a
B	5,0 ± 0,3	16,8 ± 1,0	1,6 ± 0,2	260,5 ± 4,2 a
NB	5,8 ± 0,3	16,2 ± 1,3	1,6 ± 0,2	254,8 ± 5,9 a
N1B2	5,7 ± 0,3	15,8 ± 1,0	1,8 ± 0,2	260,3 ± 7,0 a
N2B1	5,7 ± 0,2	16,7 ± 1,3	1,8 ± 0,2	245,1 ± 5,0 a
N2npB1 ^a	5,3 ± 0,2	17,7 ± 1,3	2,1 ± 0,1	260,4 ± 6,3 a
<i>p</i> (obravnavanje)	n.s.	n.s.	n.s.	< 0,001

Podatki so prikazani kot povprečna vrednost ± standardna napaka (n = 11). Vrednosti, ki jim sledijo različne črke, so statistično značilne ($p \leq 0,05$) glede na enosmerno analizo ANOVA in Tukeyev HSD test (a-b).

^aObravnavanje N2npB1 smo ponovili samo enkrat (n = 5). n.s. – statistično neznačilno.

Preglednica 13: Indeksi rasti paradižnika Arawak F1 okuženega z jajčeci *M. ethiopica* in bakterijo *A. tumefaciens* (90 dpi).

Table 13: Growth indices of tomato Arawak F1 infected with *M. ethiopica* eggs and *A. tumefaciens* bacteria (90 dpi).

Obravnavanje	Teža korenin (g)	^a Sveža teža nadzemnega dela (g)	^a Suha teža nadzemnega dela (g)	Višina rastline (mm)
Kontrola	5,4 ± 0,4 a	33,6 ± 1,4 b	4,5 ± 0,4 b	486,2 ± 42,7
N	13,9 ± 0,9 b	24,4 ± 1,3 a	2,7 ± 0,3 a	461,0 ± 35,4
N1B2	12,9 ± 0,7 b	28,1 ± 1,1 ab	3,1 ± 0,2 a	454,6 ± 14,7
N2B1	13,2 ± 0,8 b	28,9 ± 2,5 ab	3,3 ± 0,3 ab	451,6 ± 12,7
<i>p</i> (obravnavanje)	< 0,001	0,012	0,006	n.s.

Podatki so prikazani kot povprečna vrednost ± standardna napaka (n = 5). Vrednosti, ki jim sledijo različne črke so statistično značilne ($p \leq 0,05$) glede na enosmerno analizo ANOVA in Tukeyev HSD test (a-b).

^aStatistično analizo smo izvedli na log-transformiranih podatkih. n.s. – statistično neznačilno.

4.3.2 Vpliv prisotnosti bakterije na razmnoževanje *M. ethiopica*

Razmnoževanje ogorčic smo ovrednotili s pomočjo reprodukcijskega faktorja (Rf), ki predstavlja razmerje med končno in začetno populacijo števila jajčec. V obravnavanjih, kjer smo bakterije dodali k ogorčicam sočasno (obravnavanje NB) ali 8. dan po dodatku ogorčic (obravnavanje N1B2), dodatek patogenega bakterijskega seva 06-424-7 vrste *A. tumefaciens* ni imel statistično značilnega vpliva na razmnoževanje ogorčic 45 dpi (Pregl. 14). Statistično značilen vpliv bakterije na razmnoževanje ogorčic smo zabeležili v

obravnavanju N2B1, torej ob inokulaciji ogorčic na že okužene korenine paradižnika. Razmnoževalni faktor v obravnavanju N2B1 je bil 2,4-krat nižji od kontrolnega obravnavanja (N). Jajčeca ogorčic so bila v obravnavanju N2B1 dodana 2 dni kasneje, vendar to bistveno ne vpliva na faktor Rf, saj se število jajčec ogorčic ustali okoli 40. dne po inokulaciji jajčec na korenine, ko večina samic sprosti jajčne vrečke na površino korenine (Širca in sod., 2014). Podoben učinek smo dosegli tudi ob dodatku nepatogenega seva *A. tumefaciens* 51-1 (Pregl. 14).

Preglednica 14: Uspešnost razmnoževanja ogorčic *M. ethiopica* na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih 45 dni po inokulaciji.

Table 14: Reproduction factor of *M. ethiopica* on roots of tomato Arawak F1 in different treatments after 45 dpi.

Obravnavanje	Rf (Pf/Pi)
N	29,7 ± 5,7 b
NB	30,9 ± 4,9 b
N1B2	24,7 ± 2,6 b
N2B1	12,2 ± 1,8 a
N2npB1 ^a	9,4 ± 1,0 a
p (obravnavanje)	< 0,001

Podatki so prikazani kot povprečna vrednost ± standardna napaka (n = 11). Vrednosti, ki jim sledijo različne črke, so statistično značilne ($p \leq 0,05$) glede na enosmerno analizo ANOVA in Tukeyev HSD test (a-b).

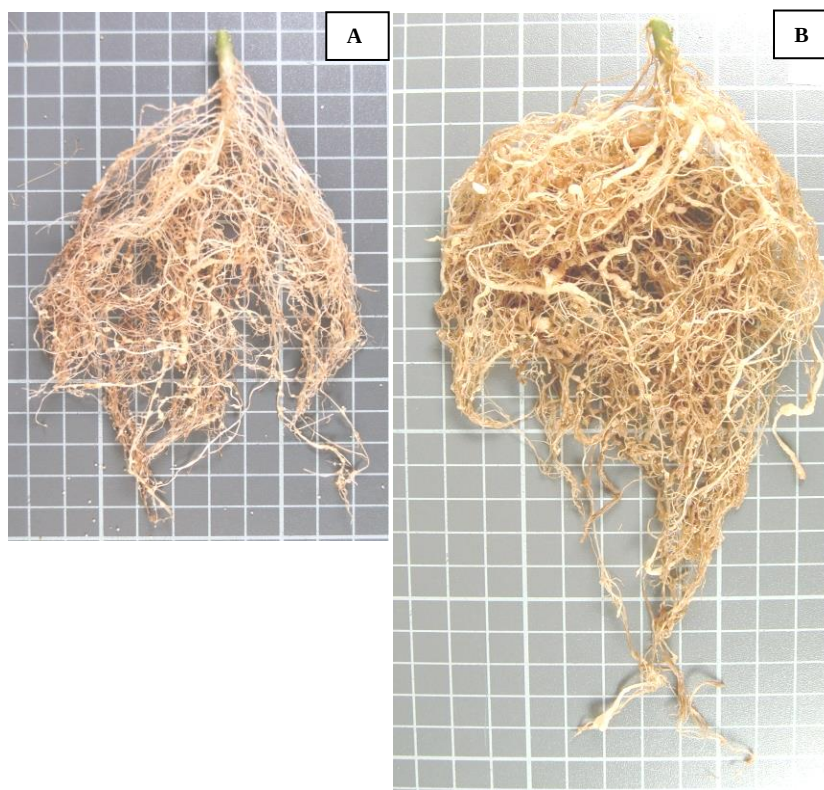
Statistično analizo smo izvedli na log-transformiranih podatkih vrednosti Rf. Poskus smo ponovili dvakrat, in sicer v šestih in petih ponovitvah. ^a Obravnavanje N2npB1 smo ponovili samo enkrat (n = 5). Pf – skupno število jajčec na koreninski sitem, Pi – začetno število jajčec (2000 jajčec/obravnavanje), n.s. – statistično neznačilno.

Preglednica 15: Uspešnost razmnoževanja ogorčic *M. ethiopica* na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih 90 dni po inokulaciji.

Table 15: Reproduction factor of *M. ethiopica* on roots of tomato Arawak F1 in different treatments after 90 dpi.

Obravnavanje	Rf (Pf/Pi)
N	148,6 ± 8,8 ab
N1B2	227,2 ± 71,7 b
N2B1	82,5 ± 14,4 a
p (obravnavanje)	0,016

Podatki so prikazani kot povprečna vrednost ± standardna napaka (n = 5). Vrednosti, ki jim sledijo različne črke, so statistično značilne ($p \leq 0,05$) glede na enosmerno analizo ANOVA in Tukeyev HSD test (a-b). Statistično analizo smo izvedli na log-transformiranih podatkih vrednosti Rf. Poskus smo ponovili enkrat. Pf – skupno število jajčec na koreninski sitem, Pi – začetno število jajčec (2000 jajčec/obravnavanje), n.s. – statistično neznačilno.



Slika 22: Korenine paradižnika Arawak F1 z (A) manjšimi galami po 45-ih dneh in (B) večjimi galami po 90-ih dneh od inokulacije z jajčeci *M. ethiopica* (obravnavanje N).

Figure 22: Roots of tomato Arawak F1 showing (A) smaller root galls after 45 days and (B) larger root galls after 90 days post infection with *M. ethiopica* eggs (treatment N).

Podobne rezultate smo dobili v poskusu ovrednotenem ob zaključku drugega razvojnega kroga ogorčice (90 dpi). Ogorčica *M. ethiopica* se je slabše razmnoževala na koreninah, ki smo jih predhodno okužili s patogenimi bakterijami (obravnavanje N2B1, Pregl. 15). V primerjavi s kontrolo (N) je bil faktor Rf 1,8-krat nižji. Po primerjavi relativnega števila jajčec se je ogorčica *M. ethiopica* najbolje razmnoževala v obravnavanju N1B2. Kontrolno obravnavanje se je mejno statistično razlikovalo od N1B2.

Manjše število gal ali manj izleženih jajčec?

Ovrednotili smo število gal in jajčnih vrečk v poskusih vrednotenih 45 in 90 dpi, da bi ugotovili ali je zmanjšanje razmnoževanja ogorčic posledica manjšega števila gal na koreninah ali posledica manjšega števila izleženih jajčec.

Po prvem zaključenem razvojnem krogu ogorčice (45 dpi) smo v obravnavanjih N2B1 in N2npB1 prešteli manjše število gal na gram korenin kot v ostalih obravnavanjih (Pregl. 16). V povprečju smo na gram korenin v obravnavanju N2B1 prešteli 2,2-krat manj gal kot v kontrolnem obravnavanju. Podoben rezultat smo dobili po vrednotenju obravnavanja N2npB1 (2,8-krat).

V povprečju je vsaka gala v vseh obravnavanjih imela na površini eno jajčno vrečko. Po številu jajčnih vrečk ni bilo statistično značilnih razlik med N2B1 in N1B2. Najmanj jajčnih vrečk smo prešteli v obravnavanju N2npB1. Iz števila gal in števila jajčnih vrečk na gram korenin in števila jajčec na celoten koreninski sistem smo izračunali število jajčec na galo oz. število jajčec na jajčno vrečko. Razlike med obravnavanji so bile statistično neznačilne. Na podlagi tega smo zaključili, da je za zmanjšano razmnoževanje ogorčice odgovorno manjše število gal na koreninskem sistemu.

Preglednica 16: Indeksi uspešnosti razmnoževanja ogorčic *M. ethiopica* na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih po 45-ih dneh.

Table 16: *M. ethiopica* reproduction indices on roots of tomato Arawak F1 in different treatments after 45 dpi.

Obravnavanja	Št. gal na g korenin	Št. jajčnih vrečk na g korenin	Št. jajčec na galo	Št. jajčec v jajčni vrečki
N	54,8 ± 11,7 b	51,2 ± 10,4 b	89,7 ± 22,5	94,1 ± 22,3
NB	48,0 ± 5,4 ab	44,4 ± 6,6 b	163,1 ± 17,4	179,7 ± 19,7
N1B2	37,2 ± 5,7 ab	30,4 ± 4,8 ab	209,5 ± 53,6	252,1 ± 56,4
N2B1	24,4 ± 5,2 a	24,4 ± 5,0 ab	107,3 ± 30,8	109,0 ± 30,5
N2npB1	19,2 ± 3,8 a	16,0 ± 3,8 a	238,3 ± 98,6	232,4 ± 155,2
<i>p</i> (obravnavanje)	0,007	0,007	n.s.	n.s.

Podatki so prikazani kot povprečna vrednost ± standardna napaka ($n = 5$). Vrednosti, ki jim sledijo različne črke so statistično značilne ($p \leq 0,05$) glede na enosmerno analizo ANOVA in Tukeyev HSD test (a-b). Poskus smo ponovili enkrat. n.s. – statistično neznačilno.

Vrednotenje smo opravili tudi v poskusu 90 dpi. Za razliko od rezultatov iz poskusa 45 dpi, tukaj ni bilo statistično značilnih razlik v številu gal na gram korenin. Razlike pa so bile v številu jajčnih vrečk na gram korenin. Najmanj jajčnih vrečk smo prešteli v obravnavanju N2B1 in največ v kontrolnem obravnavanju (N) (Pregl. 17). V povprečju smo prešteli v N2B1 1,3-krat več jajčnih vrečk kot v enakem obravnavanju 45 dpi, medtem kot je bilo to število v kontrolnem obravnavanju (N) večje za 1,7-krat.

Po vrednotenju števila jajčec na galo smo ocenili najmanjše število jajčec na galo v obravnavanju N2B1 in največje v N1B2. V povprečju se je število jajčec na galo v obravnavanju N2B1 zmanjšalo za 1,4-krat v primerjavi s številom iz poskusa 45 dpi v enakem obravnavanju. V obravnavanju N1B2 pa je število jajčec na galo ostalo približno enako v obeh poskusih. Število jajčec v jajčnih vrečkah je bilo manjše v kontrolnem obravnavanju, a le mejno statistično značilno ($p = 0,0576$).

Preglednica 17: Indeksi uspešnosti razmnoževanja ogorčic *M. ethiopica* na koreninah paradižnika Arawak F1 v različnih obravnavanjih po 90-ih dneh.

Table 17: *M. ethiopica* reproduction indices on roots of tomato Arawak F1 in different treatments after 90 dpi.

Obravnavanje	Št. gal na g korenin	Št. jajčnih vrečk na g korenin	Št. jajčec na galo	Št. jajčec v jajčni vrečki
N	178,8 ± 13,1	86,4 ± 4,5 c	126,4 ± 18,3 ab	254,1 ± 24,7
N1B2	150,0 ± 7,6	52,0 ± 2,3 b	231,4 ± 61,8 b	464,6 ± 149,8
N2B1	174,8 ± 10,4	31,6 ± 6,7 a	73,6 ± 14,6 a	438,5 ± 92,6
<i>p</i> (obravnavanje)	n.s.	< 0,001	0,036	0,0576 (n.s.)

Podatki so prikazani kot povprečna vrednost ± standardna napaka (n = 5). Vrednosti, ki jim sledijo različne črke, so statistično značilne ($p \leq 0,05$) glede na enosmerno analizo ANOVA in Tukeyev HSD test (a-b). Poskus smo ponovili enkrat. n.s. – statistično neznačilno.



Slika 23: Korenine paradižnika Arawak F1 90 dpi v obravnavanjih (A) N1B2 in (B) N2B1.

Figure 23: Roots of tomato Arawak F1 in 90 dpi treatments (A) N1B2 and (B) N2B1.

Posredni ali neposredni vpliv bakterij na razmnoževanje *M. ethiopica*

Zmanjšanje razmnoževanja ogorčic smo ovrednotili v obravnavanju N2B1 v obeh poskusih 45 in 90 dpi. Z naslednjim poskusom smo ovrednotili zmanjšano število gal na gram korenin, kar je najverjetnejši razlog za zmanjšan faktor Rf. Posledično nas je zanimalo, ali je vpliv dodanih bakterij v obravnavanju N2B1 neposreden ali posreden. V ta namen smo zasnovali lončni poskus s tehniko ločenih korenin, kjer smo bakterije dodali na drugo stran korenin, ločeno od ogorčic (Pregl. 18).



Slika 24: Razvoj korenin paradižnika po uporabi tehnike ločenih korenin.
Figure 24: Root development in tomato when using split-root technique.

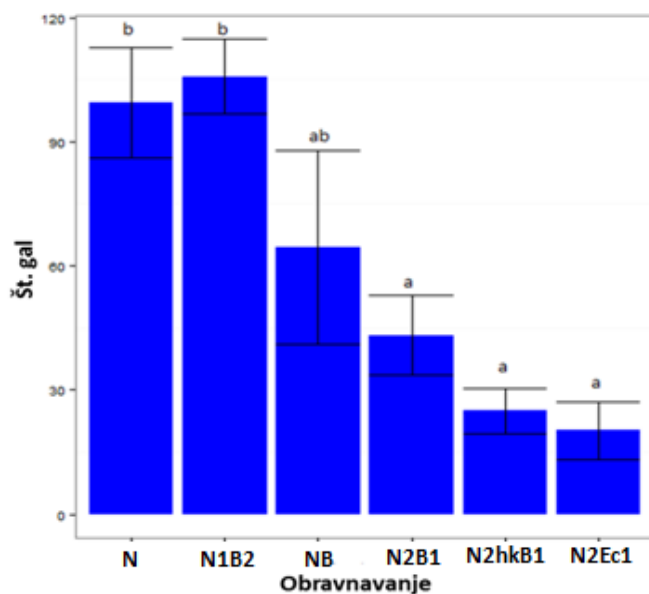
Preglednica 18: Obravnavanja v lončnih poskusih za ugotavljanje sistemskega vpliva bakterij na razmnoževanje ogorčic *M. ethiopica*.

Table 18: Treatments in pot trials for evaluating systemic effect of bacteria on reproduction of *M. ethiopica* on roots of tomato.

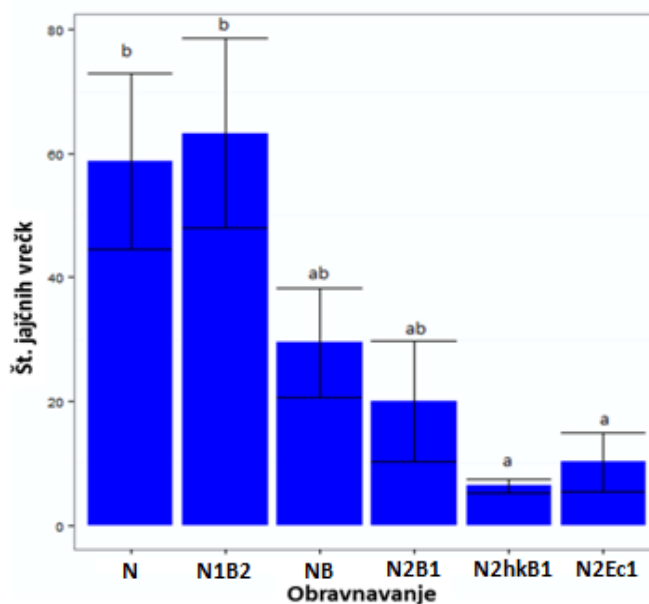
Obravnavanje	Opis
N	Okužba polovice korenine z jajčeci ogorčice <i>M. ethiopica</i> (1000 jajčec/polovico korenine)
N1B2	Okužba polovice korenine z jajčeci ogorčic, čez 8 dni sledi okužba s suspenzijo bakterij seva <i>A. tumefaciens</i> 06-424-7 na drugi strani korenin
NB	Sočasna okužba ene polovice korenin z jajčeci ogorčic in druge polovice s suspenzijo bakterij seva 06-724-7
N2B1	Okužba ene polovice korenin s suspenzijo bakterij seva 06-424-7, čez 2 dni dodamo jajčeca ogorčic na drugo stran korenin
N2hkB1	Okužba ene polovice korenin s suspenzijo mrtvih celic bakterij seva 06-424-7, čez 2 dni dodamo jajčeca ogorčic na drugo stran korenin
N2Ec1	Okužba ene polovice korenin s suspenzijo nepatogenega seva <i>E. coli</i> JM109, čez 2 dni dodamo jajčeca ogorčic na drugo stran korenin

Vrednotili smo število gal in število jajčnih vrečk v obravnavanjih iz Preglednice 18. Rezultati so prikazani na Sliki 25. Število gal in jajčnih vrečk je bilo statistično neznačilno v obravnavanju N1B2, kjer smo bakterije dodali 8. dan po dodatku jajčec ogorčic, v primerjavi s kontrolo. Najmanj gal smo prešteli na koreninah, kjer smo bakterije, bodisi žive ali mrtve, dodali pred ogorčicami (obravnavanja N2B1, N2hkB1, N2Ec1). Po številu jajčnih vrečk se obravnavanji NB in N2B1 nista razlikovali in bili hkrati mejno statistično značilno različni od ostalih obravnavanj. Najmanj jajčnih vrečk smo prešteli, ko smo dodali mrtve celice patogenih agrobakterij ali nepatogeno bakterijo *E. coli*.

A



B



Slika 25: Vrednotenje sistemskega odziva rastlin paradižnika Arawak F1 na razmnoževanje ogorčic *M.ethiopica* v različnih obravnavanjih z bakterijami: (A) celokupno število gal 45 dpi; (B) celokupno število jajčnih vrečk 45 dpi.

Figure 25: Evaluating systemic response of tomato Arawak F1 on reproduction of *M. ethiopica* in different treatments with bacteria: (A) total root gall number 45 dpi; (B) total egg masses 45 dpi.

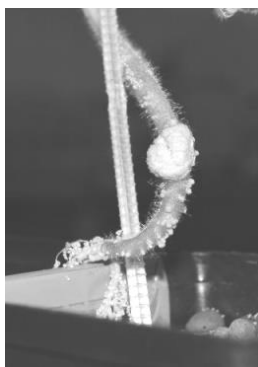
Sistemiški vpliv bakterij na vstop infektivnih ličink *M. ethiopica* v korenino

Po ovrednotenju sistemskega odziva rastline na razmnoževanje ogorčic, smo izvedli lončni poskus z ločenimi koreninami za ovrednotenje vpliva bakterij na vstop ličink v korenino. Iz Preglednice 18 je razvidno, da bakterija ni imela statistično značilnega vpliva na vstop infektivnih ličink v korenino. Niti posredna (N_nb) niti neposredna (NB_n) prisotnost agrobakterij ni vplivala na vstop ličink v korenine, kot tudi ne prisotnost prisotnost razvijajočega se tumorja na stebelu paradižnika.

Preglednica 19: Vstop ličink *M. ethiopica* v korenine paradižnika v različnih obravnavanjih po 8. in 12. dneh.
Table 19: *M. ethiopica* juveniles penetration into roots of tomato in different treatments after 8 and 12 dpi.

Obravnavanje	Št. ličink 8 dpi	Št. ličink 12 dpi
N	20,0 ± 3,14	38,7 ± 4,13
N_nb	30,2 ± 7,73	36,5 ± 5,88
NB_n	18,2 ± 6,01	33,3 ± 3,68
Tumor na stebelu	/	34,0 ± 6,52
<i>p</i> (obravnavanje)	0,333 (n.s.)	0,880 (n.s.)

Podatki so prikazani kot povprečno število ličink v korenini ± standardna napaka ($n = 6$). Oznake obravnavanj: N – korenina okužena samo z jajčeci ogorčic; N_nb – posredni vpliv prisotnosti *A. tumefaciens* na vstop ličink v korenino; NB_n – neposredni vpliv bakterij na vstop ličink v korenino; Okužba na stebelu – vstop ličink ogorčic v korenine rastlin z izrazitim tumorjem na stebelu; n.s. – statistično neznačilno.



Slika 26: Razvoj tumorja na stebelu paradižnika 10 dni po mehanski inokulaciji seva *A. tumefaciens* 06-424-7.
Figure 26: Development of stem tumour on tomato 10 days after mechanical inoculation of *A. tumefaciens* 06-424-7 strain.

4.3.3 Vpliv ogorčic *M. ethiopica* na nastanek tumorjev

Vpliv ogorčice na pojavnost tumorjev smo vrednotili 45 dpi. Tumorji so se pojavili na koreninskem sistemu in ne na koreninskem vratu, kot je značilno za bolezen raka koreninskega vratu. Tumor se je od gale ločil predvsem po zunanji morfologiji, ki je bila nagubana in ne gladka kot pri galah. Vrednotenja ob 90 dpi nismo mogli izvesti, ker so bile gale prevelike, samice ogorčic pa smo našli tudi v tumorju-podobnih tvorbah na koreninah.

Pojavnost tumorjev v kontroli (B) ni bila 100 %. Tumorji so se pojavili na 72,7 % okuženih rastlin. Dodatek jajčec ogorčic k okuženim koreninam paradižnika ni imel vpliva na pojavnost tumorjev (Pregl. 20). Vendar, dodatek bakterij na korenine napadene z ogorčicami (N1B2) je bakterijam onemogočil tvorbo tumorjev.

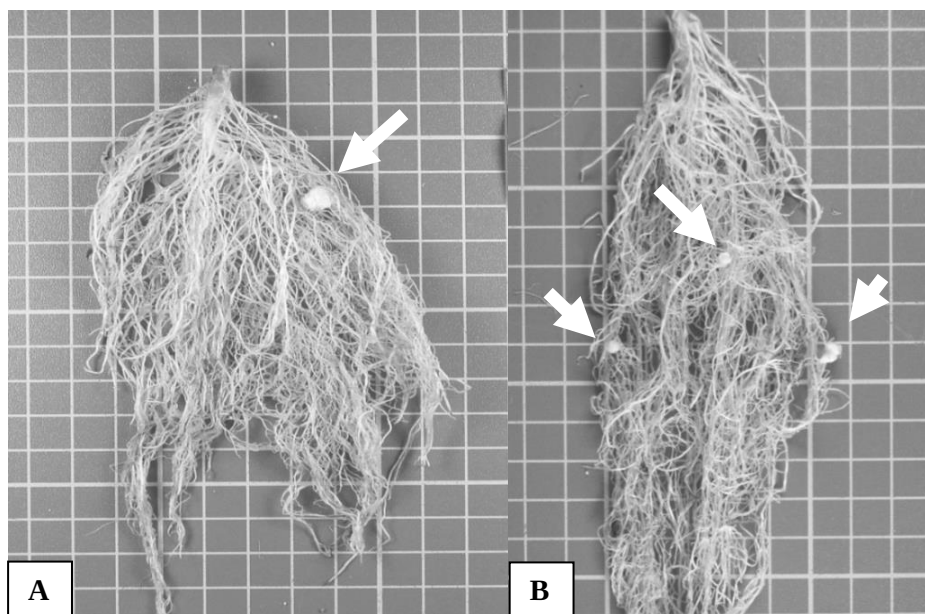
Povprečna teža tumorjev je bila najmanjša v kontrolnem obravnavanju (B), navkljub višji pojavnosti. Ob prisotnosti ogorčic so bili tumorji relativno težji. Pojavnost tumorjev pa ni vplivala na gostoto populacije bakterij v rastnem substratu, saj je bila ta v vseh obravnavanjih enaka po končanem poskusu.

Preglednica 20: Pojav tumorjev na koreninah paradižnika 45 dpi v različnih obravnavanjih z ogorčico *M. ethiopica*.

Table 20: Incidence of tumours on roots of tomato 45 dpi in different treatments with *M. ethiopica* nematodes.

Obravnavanje	Pojavnost koreninskih tumorjev (%)		Teža tumorjev (mg)	Končna konc. bakterij (logCFU)
B	72,7	(8/11)	59,5 ± 19,7	5,78 ± 0,08
NB	54,5	(6/11)	129,5 ± 40,4	5,50 ± 0,09
N1B2	0	(0/11)	/	5,58 ± 0,10
N2B1	54,5	(6/11)	102,7 ± 49,2	5,47 ± 0,11

Povprečne vrednosti teže tumorjev in logaritem CFU so prikazane kot povprečna vrednost ± standardna napaka. Poskus smo ponovili dvakrat, in sicer v šestih in petih ponovitvah.



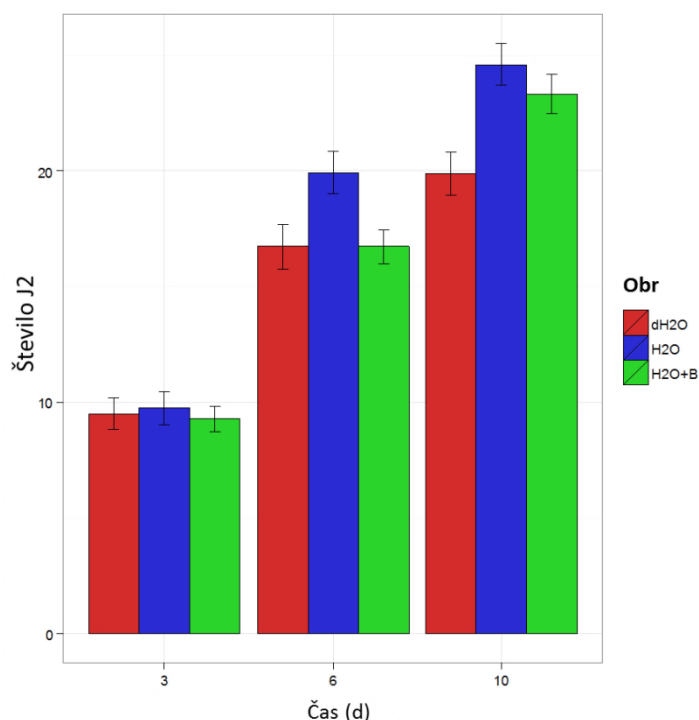
Slika 27: Pojav tumorjev na koreninah paradižnika okuženega s patogenim sevom *A. tumefaciens* 45 dpi. (A) Razvoj enega večjega tumorja in (B) razvoj treh manjših tumorjev v enakem obravnavanju.

Figure 27: Tumour development on roots of tomato infected with pathogenic strain of *A. tumefaciens* 45 dpi. (A) Development of one large tumour and (B) three smaller ones in the same treatment.

4.4 IZLEGANJE LIČINK OGORČIC *IN VITRO*

Ličinke *M. ethiopica* so se po treh dneh inkubacije v treh različnih vodnih raztopinah izlegale enako hitro ($p = 0,807$). Po šestih dneh se je 16 % več jajčec izvalilo v filtratu vodne raztopine, ki je vsebovala izločke korenin paradižnika ($p = 0,0123$). Razlik med ostalima dvema obravnavanjima ni bilo (Sl. 28). Po desetih dneh se je število izleženih ličink v obravnavanju z vodno raztopino, ki je vsebovala izločke korenin paradižnika okuženega z *A. tumefaciens*, izenačilo z številom izleženih ličink v sami vodni raztopini. Izleganje ličink v deionizirani vodi je bilo za 17 % manjše kot v ostalih dveh obravnavanjih. Poskus nismo podaljševali, ker so po desetih dneh starejše ličinke pričele umirati.

Odstotek izleganja je bil po treh dneh v povprečju okoli 14,6 % v vseh obravnavanjih, po šestih dneh pa 27,4 %. Po desetih dneh se je v povprečju izleglo 34,8 % vseh jajčec *M. ethiopica in vitro*.



Slika 28: Število izleženih ličink *in vitro* po 3, 6 in 10-ih dneh inkubacije jajčec *M. ethiopica* v vodnih raztopinah. dH2O – inkubacija jajčec v sterilni deionizirani vodi; H2O – inkubacija jajčec v sterilni deionizirani vodi z izločki s korenin paradižnika; H2O+B – inkubacija jajčec v sterilni deionizirani vodi z izločki z bakterijo okuženih korenin paradižnika. Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako (n = 32).

Figure 28: Number of hatched juveniles after 3, 6 and 10 days of *M. ethiopica* egg incubation in water suspensions *in vitro*. dH2O – egg incubation in sterile deionized water; H2O – egg incubation in sterile deionized water containing tomato root exudates; H2O+B – egg incubation in sterile deionized water containing exudates of bacteria-infected roots of tomato. Average values with standard error are shown (n = 32).

4.5 METODA IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO METODO RT-qPCR V REALNEM ČASU

Z lončnimi poskusi smo ugotovili zmanjšano razmnoževanje ogorčic na koreninah predhodno okuženih s patogenimi ali nepatogenimi bakterijami. Da bi potrdili domnevo o odgovornosti rastlinske obrambne poti v opaženem antagonizmu, smo izbrali šest genov pod nadzorom JA/ET poti (*ACO1*, *ACS6*, *COI1*, *ERF5*, *JA3* in *SIWRKY11*), dva gena iz SA poti (*PR-1* in *NIM1*) ter še dodatna dva gena vpletena v splošni odziv rastline (*SIWRKY72*) in v proces programirane celične smrti pod nadzorom arahidonske kisline (*DEA1*). Zanimalo nas je, kako se izražajo geni na ločeni strani korenin, stran od mesta okužbe. Večina teh genov je imela statistično neznačilno izražanje. Povečano verjetnost spremenjenega izražanja smo zaznali pri genih *ACO1*, *ASC6*, *JA3*, *SIWRKY72* in *PR-1*.

4.5.1 Optimizacija in validacija metode qPCR

Pred začetkom poskusa smo ovrednotili učinkovitost pomnoževanja izbranih delov tarčnih genov. Rezultati so prikazani v Preglednici 21. Vsi izbrani geni so imeli odstotek učinkovitosti pomnoževanja nad 90 %, kot to zahtevajo smernice MIQE (Bustin in sod., 2009). Predhodno smo določili štiri referenčne gene, ki so bili izbrani za normalizacijo podatkov. Po analizi Vandesompele in sod. (2002) smo potrdili njihovo nespremenjeno izražanje v vseh obravnavanjih, saj povprečna vrednost CV (%) ni presegala 25 %, povprečna vrednost M pa je bila nižja od 0,5 (Hellemans in sod., 2007) (Pregl. 22).

Preglednica 21: Učinkovitost pomnoževanja tarčnih in referenčnih genov pri optimizirani koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov.

Table 21: Efficiency of target and reference gene multiplication at optimized primer concentrations.

Gen	Koncentracija v reakciji (nM)	Učinkovitost pomnoževanja (%)
<i>ACO1</i>	300	103,04
<i>ACS6</i>	300	95,51
<i>COI1</i>	300	96,00
<i>ERF5</i>	300	98,80
<i>JA3</i>	300	95,59
<i>NIM1</i>	600	90,26
<i>PR-1</i>	300	90,00
<i>SIWRKY11</i>	300	93,39
<i>SIWRKY72</i>	300	91,91
<i>BTUB</i>	300	93,06
<i>UBI</i>	300	91,97
<i>EF1L</i>	300	94,73
<i>RPL2</i>	70	93,68

Preglednica 22: Indeksi stabilnega izražanja referenčnih genov.

Table 22: Expression stability indices of reference genes.

Gen	CV (%)	M	Povprečni CV (%)	Povprečni M
<i>BTUB</i>	29,21	0,485	11,63	0,368
<i>UBI</i>	10,39	0,286		
<i>EF1L</i>	15,44	0,362		
<i>RPL2</i>	10,15	0,341		

Za analizo podatkov (C_q vrednosti) smo izbrali polparametrični razširjeni test Wilcoxon-Mann-Whitney (uWMW) (De Neve in sod., 2013). S tem testom sočasno primerjamo dva

neodvisna obravnavanja Y in Y' , ki sta izražena z vrednostmi C_q . Rezultat testa $uWMW$ je ocena verjetnosti izražanja gena *LogOr*, ki je podana kot logaritem razmerja med verjetnostjo $P(Y_{Gen1,Obr1} \leq Y'_{Gen1,Obr2})$, da ima tarčni gen v enem obravnavanju povišano izražanje (manjšo vrednost C_q), in razmerjem Δ' , ki predstavlja verjetnost, da je izražanje referenčnih genov v obeh obravnavanjih enako normalizacijski konstanti. Algoritem *unifiedWMWqPCR* v paketu R izračuna tudi oceno standardne napake *LogOr* in pripadajoče p -vrednosti. Za statistično značilen rezultat velja $p \leq 0,01$.

V Preglednici 23 so povzeti rezultati analize vrednosti C_q po $uWMW$ testu. Večina genov je imela nespremenjeno izražanje, zato so v Preglednici 23 in 24 predstavljene vrednosti *LogOr* genov, za katere velja $p < 0,03$.

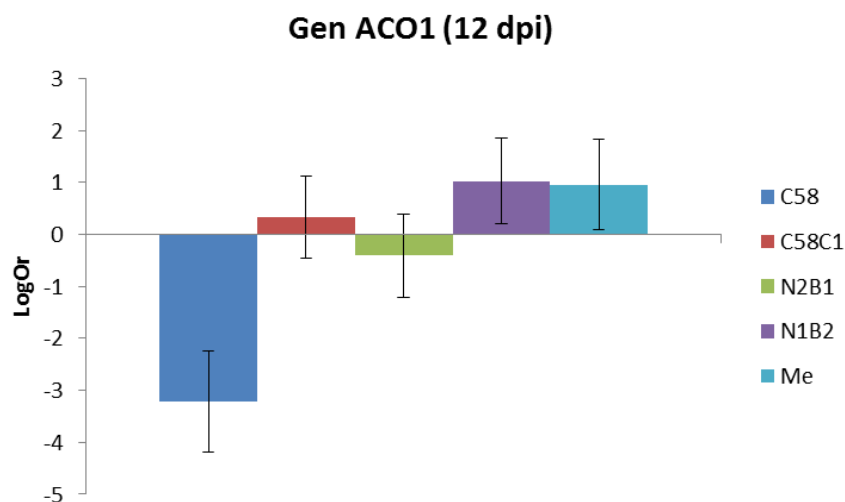
4.5.2 Izražanje biosinteznih genov etilena

Povečana biosinteza etilena (ET) je eden izmed prvih odzivov rastline na patogene organizme. Gen za ACC sintazo (*ACS6*) in gen za ACC oksidazo 1 (*ACO1*) sodelujeta v biosintezi ET. Največji vpliv na izražanje ET-sinteznih genov je imela prisotnost patogenega seva *A. tumefaciens* C58. V času 0, t.j. 15 min po dodatku bakterij na ločeno stran korenin paradižnika, smo zabeležili znižano izražanje gena *ACS6* v obravnavanju C58. V obravnavanju N1B2 je imel taisti gen zmanjšano izražanje 12 dpi, t.j. 4. dan po dodatku seva C58 na korenine okužene z *M. ethiopica* (Pregl. 23). Zmanjšano število prepisov ne dokazuje zmanjšane sinteze ET, ker je gen *ACS6* pod negativnim nadzorom ET (Lin in sod., 2007). Prav tako nismo zabeležili povečanega izražanja drugega ET-biosinteznega gena *ACO1*. Slika 29 prikazuje kako v času 12 dpi variira raven izražanja *ACO1* med obravnavanji. Opazili smo, da sev C58 bistveno bolj zmanjša izražanje *ACO1* kot nepatogeni sev C58C1, kjer je izražanje enako kot v neokuženih rastlinah (Pregl. 24). Inokulacija z ogorčicami ne vpliva na izražanje *ACO1*. Še več, naknadna okužba s C58 (v N1B2) ne zniža raven izražanja *ACO1* ($p = 0,022$). Prav tako dodatek ogorčic k C58-okuženim koreninam (N2B1) prepreči zmanjšano izražanje *ACO1* ($p = 0,014$). Ogorčice ne glede na čas inokulacije preprečijo zmanjšano izražanje *ACO1* povzročeno zaradi prisotnosti patogenega seva C58.

4.5.3 Vpletenost genov iz signalizacijske poti JA

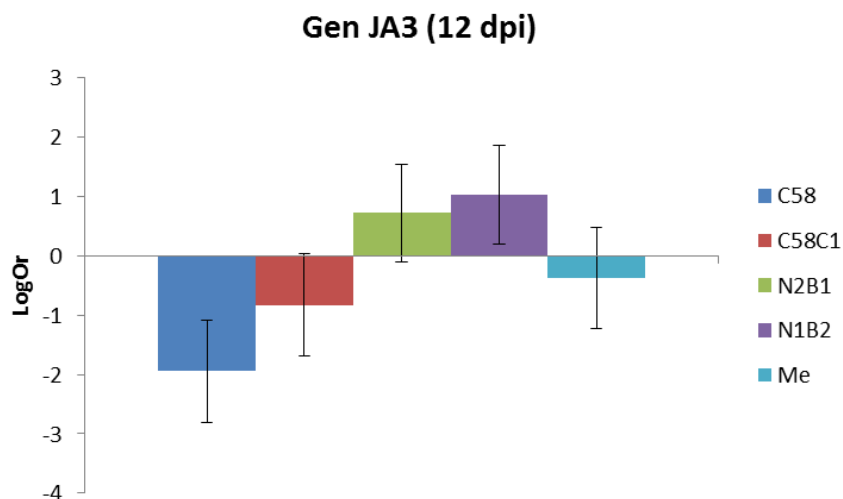
V signalizacijski poti JA sodelujejo geni *COI1*, *ERF5*, *JA3* ter *SIWRKY11*. Večina teh genov je imela nespremenjeno izražanje v času trajanja poskusa v vseh obravnavanjih. Čeprav statistično neznačilno, je bilo izražanje teh genov relativno zmanjšano (Pregl. 23). Izražanje transkripcijskega dejavnika *JA3* iz družine *MYC2* je ostalo nespremenjeno skozi vsa obravnavanja. V času 12 dpi pa smo v obravnavanju N1B2 izračunali statistično značilno povečano izražanje *JA3* v primerjavi z njegovim izražanjem v obravnavanju C58C1 (Pregl. 24, Sl. 30). Podobno kot pri genu *ACO1* (Sl. 29) opazamo, da dodatek

ogorčic poveča izražanje JA3 v obravnavanjih s patogenim sevom C58 (N2B1 in N1B2, Sl. 30).



Slika 29: Verjetnost povečanega izražanja gena *ACO1* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 12 dpi.

Figure 29: Probabilities of significant *ACO1* gene up-regulation in different treatments in Arawak F1 tomato roots compared to non-infected control treatment, both sampled at 12 dpi.

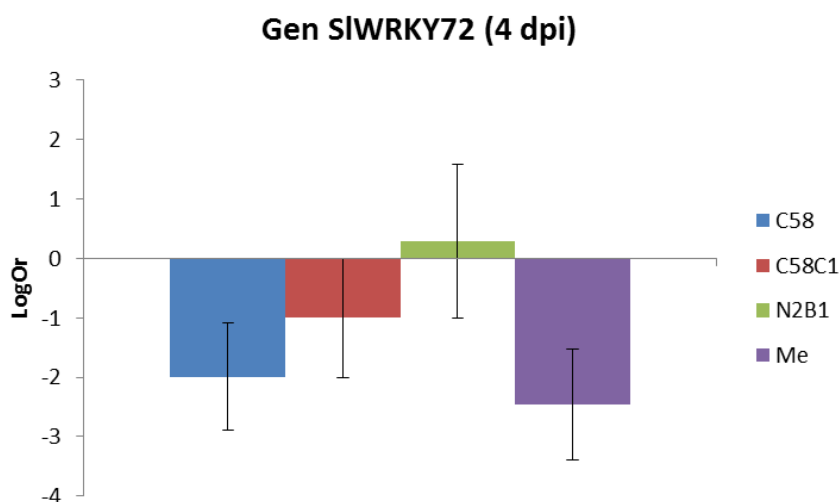


Slika 30: Verjetnost povečanega izražanja gena *JA3* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 12 dpi.

Figure 30: Probabilities of significant *JA3* gene up-regulation in different treatments in Arawak F1 tomato roots compared to non-infected control treatment, both sampled at 12 dpi.

4.5.4 Splošna imunost posredovana s transkripcijskim dejavnikom *SIWRKY72*

V času 4 dpi smo zabeležili zmanjšano izražanje transkripcijskega dejavnika *SIWRKY72* v obravnavanjih Me ($p = 0,008$) in C58 ($p = 0,027$) (Pregl. 23). V tem času se je večina ličink *M. ethiopica* v obravnavanju Me že izlegla in pričela vstopati v korenine paradižnika. V interakciji med ogorčico in bakterijo (N2B1) nismo zaznali zmanjšane izražanja tega gena, čeprav samostojno (obravnavanji C58 in Me) oba organizma povzročita zmanjšano izražanje (Sl. 31).



Slika 31: Verjetnost povečanega izražanja gena *SIWRKY72* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 4 dpi.

Figure 31: Probabilities of significant *SIWRKY72* gene up-regulation in different treatments in Arawak F1 tomato roots compared to non-infected control treatment, both sampled at 4 dpi.

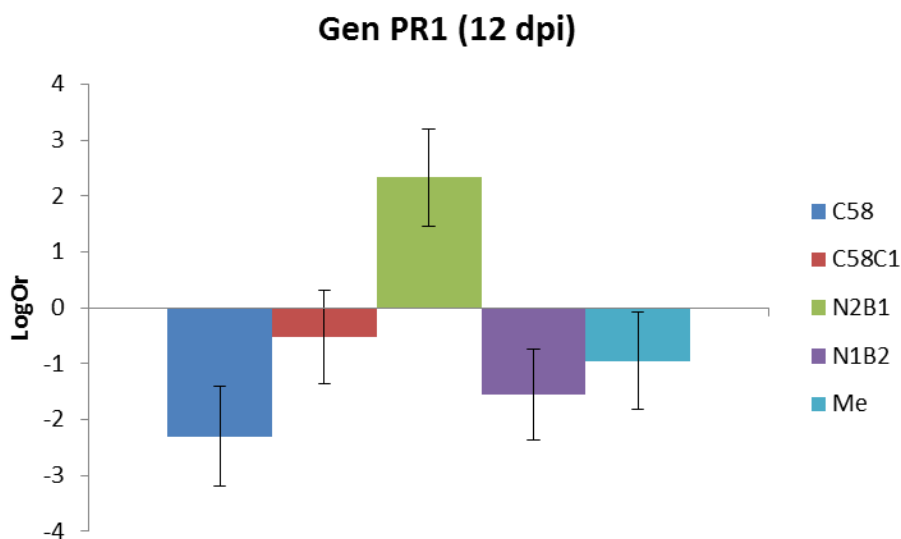
4.5.5 Primerjava spremenjenega izražanja genov med obravnavanji N2B1 in C58

Razlike v izražanju tarčnih genov med obravnavanji N2B1 in C58 smo zaznali v času 12 dpi. Deseti dan po inokulaciji jajčec *M. ethiopica* na korenine okužene z bakterijami se je povečalo izražanje genov *ACO1*, *JA3* in *SIWRKY11* v primerjavi s koreninami okuženimi samo z bakterijami. Povečanje je bilo mejno statistično značilno ($p = 0,014$) (Pregl. 24). Dodatek ogorčic v obravnavanju N2B1 je v rastlini povečal izražanje genov vpletenih v pot JA. Glede na rezultate, se pot signalizacije z JA ne vklopi ob samostojni prisotnosti patogenega seva C58.

4.5.6 Izražanje markerskega gena *PR-1* v sistemsko pridobljeni odpornosti

Sinteza s patogenezo povezanega proteina 1 (*PR-1*) se običajno poveča ob aktivaciji poti SAR, ki je pod nadzorom salicilne kisline (SA) (Van Loon in sod., 1998). V našem poskusu smo statistično značilno zmanjšanje izražanja gena *PR-1* dokazali v obravnavanju C58 v času 12 dpi (Sl. 32). Glede na rezultate, sev C58C1 brez plazmida Ti ne povzroči

tolikšnega zmanjšanja izražanja PR-1 kot patogeni sev (Pregl. 24). Po inokulaciji jajčec *M. ethiopica* na korenine okužene z bakterijami (obravnavanje N2B1) se je izražanje tega gena močno povečalo. Da je kinetika odziva rastline drugačna glede na čas dodatka bakterij oz. ogorčic, se je pokazalo v povečanem izražanju PR-1 v obravnavanju N2B1 v primerjavi z obravnavanjem N1B2, kjer smo bakterije dodali po vstopu ličink ogorčice v korenine (Sl. 32).



Slika 32: Verjetnost povečanega izražanja obrambnega gena *PR-1* v posameznih obravnavanjih na koreninah paradižnika Arawak F1 v primerjavi s kontrolnim (neokuženim) obravnavanjem, oboje vzorčeno v času 12 dpi.

Figure 32: Probabilities of significant *PR-1* gene up-regulation in different treatments in Arawak F1 tomato roots compared to non-infected control treatment, both sampled at 12 dpi.

Preglednica 23: Povzetek analize verjetnosti povečanega izražanja tarčnih genov (LogOr) v primerjavi z izražanjem v kontrolnem obravnavanju. Statistično značilno spremenjeno izražanje genov je prikazano v obarvanih vrsticah.

Table 23: Summary of target gene up-regulation probabilities (LogOr) compared to probabilities of up-regulation in control treatments. Statistically significant gene regulation is depicted in shaded lines.

Obravnavanje	Dpi	Gen	LogOr	se	Izražanje gena	p-vrednost
C58 :	0	<i>ACS6</i>	- 3,424	0,8914	ZMANJŠANO	0,00012
Kontrola	4	<i>ERF5</i>	- 1,991	0,9026	(n.s.)	0,02736
		<i>SIWRKY72</i>	- 1,991	0,9026	(n.s.)	0,02736
	12	<i>ACO1</i>	- 3,219	0,9721	ZMANJŠANO	0,00093
		<i>PR-1</i>	- 2,303	0,8874	ZMANJŠANO	0,00947
		<i>JA3</i>	- 1,946	0,8683	(n.s.)	0,02503
		<i>SIWKRY11</i>	- 1,946	0,8683	(n.s.)	0,02503
Me :	4	<i>SIWRKY72</i>	- 2,457	0,9266	ZMANJŠANO	0,00802
Kontrola	12	<i>ERF5</i>	- 1,977	0,8704	(n.s.)	0,02311
N2B1 :	12	<i>PR-1</i>	2,329	0,8753	POVEČANO	0,00781
Kontrola						
N1B2 :	12	<i>ACS6</i>	- 2,321	0,8696	ZMANJŠANO	0,00761
Kontrola		<i>DEA1</i>	- 2,061	0,8107	(n.s.)	0,01100

LogOr – logaritem razmerja verjetnosti povečanega izražanja gena; se – standardna napaka.

Statistično značilne razlike pri $p \leq 0,01$; n.s.–statistično neznačilno.

Preglednica 24: Primerjava verjetnosti povečanega izražanja tarčnih genov v posameznem obravnavanju v primerjavi z izbranim neodvisnim obravnavanjem. Statistično značilno spremenjeno izražanje genov je prikazano v obarvanih vrsticah.

Table 24: Summary of target gene up-regulation probabilities compared to probabilities of up-regulation in selected independent treatments. Statistically significant gene regulation is depicted in shaded lines.

Obravnavanje	Dpi	Gen	LogOr	se	Izražanje gena	p-vrednost
C58 : C58C1	4	<i>PR-1</i>	2,231	0,8881	(n.s.)	0,01201
	12	<i>PR-1</i>	- 2,708	0,9578	ZMANJŠANO	0,00470
		<i>ACO1</i>	- 2,197	0,8315	ZMANJŠANO	0,00823
N2B1 : C58	4	<i>SIWRKY72</i>	2,968	1,1302	POVEČANO	0,00862
		<i>ERF5</i>	- 2,458	1,0911	(n.s.)	0,02430
	12	<i>ACO1</i>	2,303	0,9371	(n.s.)	0,01401
		<i>JA3</i>	2,303	0,9371	(n.s.)	0,01401
		<i>SIWRKY11</i>	2,303	0,9371	(n.s.)	0,01401
		<i>NIM1</i>	1,792	0,8075	(n.s.)	0,02649
N2B1 : C58C1	4	<i>SIWRKY72</i>	2,197	0,8749	(n.s.)	0,01202
	12	<i>JA3</i>	2,708	0,8879	POVEČANO	0,00229
N2B1 : N1B2	12	<i>PR-1</i>	2,808	0,9605	POVEČANO	0,00346

LogOr – logaritem razmerja verjetnosti povečanega izražanja gena; se – standardna napaka;

Statistično značilne razlike pri $p \leq 0,01$. n.s. – statistično neznačilno.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Raznolikost talnih izolatov *A. tumefaciens* s kmetijskih površin

Agrobakterije so talne bakterije, ki jih najdemo v skoraj vsakem habitatu, tudi v vodi in sedimentih (D'Hondt in sod., 2004; Süß in sod., 2006). Endofitsko se nahajajo tudi v nodulih rizobijev (Saïdi in sod., 2011), poznane so tudi kot povzročitelji bolezni pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom (Dunne in sod., 1993; Aujoulat in sod., 2011). O prisotnosti in raznolikosti izolatov *Agrobacterium* spp. biovar 1 v slovenskih tleh ne vemo veliko. S pričujočo nalogo smo opravili prvo študijo o prisotnosti teh bakterij na kmetijskih površinah v Sloveniji.

Iz kmetijskih tal Slovenije smo izolirali samo nepatogene seve *A. tumefaciens* biovar 1. Izolatov biovarja 1 nismo našli v gozdnih tleh bodisi zaradi njihove odsotnosti bodisi zaradi prenizkega števila bakterij, ki je pod mejo detekcije uporabljene metode. Populacije *A. tumefaciens* biovar 1 v talnih vzorcih so po sestavi podobne populacijam iz drugih študij tal, na katerih se je pojavljal rak koreninskega vratu (Alconero, 1980) ali v tleh, kjer ni bilo obolelih rastlin (Schroth in sod., 1971; Bouzar in sod., 1993; Mougél in sod., 2002). Najpogosteje smo iz tal izolirali seve iz genomske vrste G1 (62 %) in G4 (38 %). Genomska vrsta G4 je po novem preimenovana v *A. radiobacter* (Lindström and Young, 2011). Do podobnih rezultatov so prišli tudi Vogel in sod. (2003), ki so iz koruzišča, kjer se predhodno ni pojavljal rak koreninskega vratu, najpogosteje izolirali predstavnike iz genomske vrste G1. Iz naših rezultatov je razvidno, da se lahko obe genomski vrsti G1 in G4 pojavljata v tleh sočasno ter na istih lokacijah. Nekateri predvidevajo, da vrsti ne poseljujeta enakih habitatov in da sta vrsti morda le dva različna ekotipa (Lassalle in sod., 2011). Porazdeljenost genomskih vrst je glede na rezultate enakomerna, saj nismo našli očitne povezave med geografskim položajem odvzetih vzorcev, vrsto kmetijske površine in genomske vrste. Za tovrstno analizo bi morali vključiti večje število mest vzorčenja, a najverjetneje ne bi našli povezave. Številni avtorji so z razširjenimi študijami o raznolikosti agrobakterij na ravni plazmidov in kromosomov iskali povezave med genetsko raznolikostjo, geografskim izvorom in gostiteljskimi rastlinami, a je niso našli (Nesme in sod., 1987; Michel in sod., 1990; Pulawska in sod., 1998; Raio in sod., 2004; Rhouma in sod., 2006; Pulawska in Kalužna, 2012).

Kljub odsotnosti patogenih izolatov v vzorcih zemlje, pa njihove prisotnosti ne moremo izključiti zaradi naslednjih razlogov: (1) vpliv letnega časa vzorčenja na ugotovljeno gostoto *A. tumefaciens* v tleh ter (2) nezadostno število pregledanih kolonij *A. tumefaciens*. Nepatogeni in patogeni sevi *A. tumefaciens* se razlikujejo v sposobnosti preživetja v tleh. Nepatogene seve lahko izoliramo iz tal v vseh letnih časih, medtem ko nekateri avtorji

poročajo o izolaciji patogenih sevov le v spomladanskem in poletnem času, ko ob ugodni temperaturi naraste njihova gostota v tleh ($> 10^5$ CFU/g) (Bouzar in sod., 1993; Krimi in sod., 2002). Mi smo tla vzorčili jeseni, zato smo pričakovali večjo populacijo nepatogenih agrobakterij, tudi zaradi odsotnosti obolelih rastlin na mestih vzorčenja. Patogene talne populacije *A. tumefaciens* so znane po vzdržljivosti. Njihova gostota lahko v poletnih mesecih doseže visoko raven, ki v jesenskem in zimskem času pade pod mejo detekcije (Bouzar in sod., 1993). Poleg tega, na preživetje patogene populacije vpliva tudi tip tal in okoljski pogoji, ki v končni fazi določijo izid boja med nepatogenimi in patogenimi populacijami v tleh (Krimi in sod., 2002).

Zaporedja *recA* so se znotraj ene genomske vrste razlikovala, vendar so vsa kodirala identičen protein RecA. En sev je odstopal, saj je imel eno aminokislino v proteinskem zaporedju spremenjeno v primerjavi z zaporedji proteinov iz iste genomske vrste. Identificirali smo 11 alelov *recA*, ki smo jih našli izključno v slovenskih sevih (Pregl. 8). Ostalih deset alelov *recA* so predhodno že identificirali v sevih iz ZDA, Nemčije, Francije, Tunizije in Belgije (Costechareyre in sod., 2010; De Meyer in sod., 2011; Shams in sod., 2013). Največ različnih alelov smo našli znotraj genomske vrste G1. Sevov iz drugih genomskih vrst nismo našli. Vse nove alele *recA*, ki so se od znanih razlikovali na več kot enem mestu, smo na novo oštevilčili. Kljub visoki raznolikosti alelov iz naših sevov pa ta del zaporedja gena ni pod pozitivnim selekcijskim pritiskom, saj je bilo razmerje d_N/d_S mnogo manjše od 1,0 (Pregl. 9). S tem smo potrdili ustreznost zaporedja *recA* kot markerja v taksonomskih študijah.

Simptome raka koreninskega vratu redno opažajo v nasadih koščičarjev in lupinarjev v Grčiji, Tuniziji, Madžarskem, Belgiji, Nizozemskem, Poljskem, Italiji, Španiji in Franciji (Pulawska, 2010). Manj pogosto se bolezen pojavlja na Češkem, v Litvi in Srbiji (Pulawska, 2010). Stanje v Sloveniji je podobno kot v slednjih državah. Manjša pojavnost bolezni bi lahko bila povezana z uspešnim obvladovanjem bolezni v nasadih sadnih dreves. Pridelovalci sledijo priporočilom Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin objavljene na spletni strani FITO-INFO, katera priporočajo uporabo fitosanitarnih in agrotehničnih ukrepov za preprečevanje širjenja bolezni (FITO-INFO, 2015). Na podlagi naših rezultatov predvidevamo, da bi manjša pojavnost bolezni lahko bila povezana s prisotnostjo nepatogenih agrobakterij. Že desetletja nazaj sta New in Kerr (1972) predvidevala, da sta pojav bolezni in raven okužbe odvisna od razmerja med nepatogenimi in patogenimi agrobakterijami v tleh. Nepatogeni sevi bi lahko na gostiteljski rastlini zasedli vstopna mesta in tako fizično preprečili pritrjevanje in okužbo s patogenimi bakterijami (Lippincott in sod., 1977). Povečana gostota nepatogenih agrobakterij bi zatorej lahko delovala kot naravna zaščita pred pojavom raka koreninskega vratu.

5.1.2 Test vstopa ličink *M. ethiopica* v korenine *A. thaliana* *in vitro*

Poskus *in vitro* smo zasnovali z namenom ovrednotenja medsebojnega odnosa med ogorčico *M. ethiopica* in bakterijo *A. tumefaciens* na koreninah navadnega repnjakovca *Arabidopsis thaliana*. Rastlina *A. thaliana* je v zadnjih desetletjih postala modelni organizem v eksperimentalni rastlinski biologiji in večina pionirskih tehnik je bila razvita prav na njej. Ena teh je tehnika ločenih korenin, kjer na fizično ločenih koreninah *A. thaliana* opazujemo sistemski odziv rastline na preiskovane mikroorganizme.

Razvojni krog *Meloidogyne* spp. je približno enako dolg kot življenski krog *A. thaliana* (šest do osem tednov) (Hensel in sod., 1993). Čeprav *A. thaliana* ni dober gostitelj za ogorčice koreninskih šišek, so infektivne ličinke J2 sposobne vstopiti v korenine in zaključiti en razvojni krog, a z manjšim številom jajčec na samico kot na dobrih gostiteljih, ob pogoju, da so v korenine vstopile pravočasno. Za uspešen vstop ličink J2 je pomembna začetna velikost populacije, ki ne sme preseči kritične gostote v *in vitro* sistemu. Izkazalo se je, da je 100 ličink nanesenih na polovico korenin preveč. Število J2 v korenini se ni razlikovalo glede na število dodanih ličink na korenine. V korenino so v povprečju vstopile dve do tri ličinke, ki so bile sposobne ustvariti prehranjevalno mesto. Ob večjem inokulumu ličink smo opazili tudi več raztrganih koreninskih vršičkov, najverjetneje kot posledico tekmovanja med ličinkami za vstopna mesta. Opazili smo, podobno kot Hutangura in sod. (1998), da je ena gala predstavljala eno samico, ne glede na velikost gale.

Prisotnost bakterij na eni strani korenin ni vplivala na vstop ličink *M. ethiopica* na drugi, fizično ločeni strani korenin. Opazili pa smo neposreden vpliv bakterij na vstop ličink. Vstop ličink *M. ethiopica* v korenine je bil slabši, kadar so bile na površini sočasno tudi bakterije. Predvidevamo, da biofilm, ki ga bakterija tvori na površini korenine, otežuje premikanje ličink, kar se kaže v izrazito zmanjšanem vstopu. Za spremljanje vpliva bakterij na razmnoževanje ogorčic uporabljen sistem ni primeren *in vitro*. Ogorčice v teh pogojih svoj razvojni krog zaključijo predčasno. Najverjetneje so v to prisiljene zaradi krajšega življenjskega kroga gostiteljske rastline, ki preide v senescenco, medtem ko ogorčica svojega kroga še ni zaključila. Nekatere samice celo ne izležejo jajčec, kljub temu, da ustvarijo vidno galo na korenini. Slaba plat sistema je tudi neprimernost gojišča. Bakterije, ki smo jih dodali na eno stran korenin, so po dveh tednih prerasle gojišče in v nekaterih primerih prešle na drugo stran, kamor smo inokulirali ličinke.

Biofilm, ki so ga agrobakterije ustvarile na površini korenin, je onemogočal ličinkam gibanje in posledično vstop v korenino. Agrobakterije so sposobne tvoriti biofilme tako na koreninah rastlin (Abarca-Grau in sod., 2011) kot na neživih, inertnih površinah (steklo, plastika) (Danhorn in sod., 2004). V gojišču so sladkorji prosto dostopni v večjih količinah, medtem ko je vir sladkorjev v rizosferi omejen. V uporabljenem sistemu *in vitro* je gojišče

0,2 KNOP podpiralo rast agrobakterij, zato predvidevamo, da je debelejši sloj bakterijske sluzi okoli korenin posledica dobre rasti in prehranjenosti agrobakterij. Kljub temu smo s poskusom ovrgli domnevo o vplivu sistemskega odziva gostiteljske rastline *A. thaliana* na patogeni sev *A. tumefaciens*, ki bi preprečil vstop ličink ogorčic koreninskih šišk *M. ethiopica* v korenine na fizično ločeni strani korenin.

5.1.3 Izleganje ličink *M. ethiopica* *in vitro*

Prisotnost koreninskih izločkov spodbuja izleganje ličink pri številnih vrstah fitoparazitskih ogorčic (Perry in Wasemael, 2008). Za spodbuditev izleganja ličink cistotvornih ogorčic *Heterodera schachtii* moramo k cistam dodati cinkov klorid (Tefft in Bone, 1984). Večina avtorjev domneva, da za izleganje ličink ogorčic *Meloidogyne* spp. prisotnost gostitelja ni nujna in dodatki za spodbujanje izleganja ličink niso potrebni *in vitro*. Ličinke vrste *M. chitwoodi* za izleganje ne potrebujejo prisotnosti koreninskih difuzatov. Difuzati so za izleganje potrebni ob koncu rastne sezone, ko so hranila omejena (Wasemael in sod., 2006). Po drugi strani pa to ne velja za *M. fallax* (Wasemael in sod., 2006).

V pogojih *in vitro* smo ugotovili, da se statistično značilno manj ličink *M. ethiopica* izleže v sterilni deionizirani vodi, t.j. 17 % manj, kot v sterilni deionizirani vodi s koreninskimi izločki paradižnika. Ugotovili smo tudi, da prisotnost bakterij *A. tumefaciens* ne vpliva na sestavo koreninskih izločkov, ki bi zavirali izleganje jajčec *M. ethiopica*. Tudi Oka in Mizukubo (2009) sta ugotovila, da v laboratorijskih pogojih koreninski izločki paradižnika povečajo izleganje ličink *M. incognita*. Opažamo pa, da bolj kot vpliv koreninskih izločkov, na izleganje ličink vpliva postopek površinske sterilizacije jajčec. Sterilizacija z 0,01 % HgCl₂ zmanjša viabilnost jajčec na 20 do 25 % (Sl. 28). Hutangura in sod. (1998) so po desetih dneh zabeležili 16 % izleganje ličink *M. javanica* v sterilni destilirani vodi. Pri izvajanju poskusov izleganja ličink v laboratorijskih pogojih moramo upoštevati tudi umiranje ličink, do katerega pride okoli desetega dne.

5.1.4 Lončni poskusi na testnih rastlinah paradižnika

Patosistem *Agrobacterium-Meloidogyne* je bil v preteklosti deležen manj pozornosti. Na testnih rastlinah paradižnika sta bili narejeni dve študiji. Prva, od Fakhouri in sod. (1996), ki je zasnovana v obliki lončnih poskusov, in druga od Elwakil in sod. (2003), v kateri je bila uporabljena tehnika ločenih korenin za preučevanje sistemskega odziva rastline na agrobakterije in ogorčice. Uporaba paradižnika kot gostiteljske rastline za ogorčice koreninskih šišk je primernejša od uporabe *A. thaliana*, ki ima prekratek razvojni krog in je na splošno slab gostitelj za ogorčice koreninskih šišk. Občutljive sorte paradižnika (*Solanum lycopersicum* L.) so odlični gostitelji za večino vrst ogorčic koreninskih šišk. Strajnar in sod. (2011) so na kultivarju paradižnika San Marzano F1 dokazali odlično razmnoževanje *M. ethiopica* (Rf > 10). V preliminarnih poskusih smo kultivar Volovsko

srce, ki je ena bolj popularnih sort paradižnika v Sloveniji, zamenjali s hibridno sorto Arawak (Syngenta) s podobnimi lastnostmi. Hibridno sorto smo izbrali zaradi bolj enakomernega začetka kalitve semena, enakomerne rasti sadik in enakomernega razmnoževanja ogorčic *M. ethiopica* na koreninskem sistemu. Za preučevanje odnosov mikroorganizmov na rastlinskem koreninskem sistemu moramo iz okolice odstraniti vse organizme, ki bi lahko vplivali na potek študije. Kakovost semen je ključnega pomena. Semena slabše kakovosti so običajno okužena z različnimi mikroorganizmi, ne le na površini, ampak tudi v notranjosti. Po kalitvi so endofitski mikroorganizmi iz semen prvi kolonizatorji koreninskega sistema mlade sadike. Da bi se izognili vplivu endofitov smo uporabili seme odlične kakovosti, ga sterilizirali in preverili odsotnost mikroorganizmov v semenu s kaljenjem semen na splošnem bakterijskem gojišču. Tudi rastni substrat mora biti kakovosten. Mnogi avtorji se za gojenje testnih rastlin odločajo za mešanico šote, perlita in zemlje, ki pa jo je težje sterilizirati. Ob sterilizaciji humusnega materiala se sproščajo topne organske spojine, zato ima avtoklavirana zemlja znižano vrednost pH (Razavi Darbar in Lakzian, 2007). Pazljivost je nujna tudi pri uporabi komercialno pripravljenih rastnih substratov na osnovi šote, saj imajo pogosto dodane mikroorganizme s pozitivnim delovanjem na rastline (npr. glive iz rodu *Trichoderma*), a brez označbe na embalaži. Da bi se izognili dejavnikom z nepredvidenim vplivom na poskus, smo rastline paradižnika gojili v rastnem substratu iz kremenčevega peska in ekspandirane gline za zadrževanje vlage. Tovrstni substrat je enostaven za sterilizacijo, se lažje spira s korenin in olajša njihovo pregledovanje pod binokularjem.

Patogene agrobakterije so sposobne izzvati tvorbo tumorja ob poškodbi rastline ali ob izpostavljenosti rastline stresnim pogojem (Escobar in Dandekar, 2003; Agrios, 2005; Cubero in sod., 2006). Čeprav so sposobne vstopiti in okužiti tudi nepoškodovano rastlinsko tkivo (Brencic in sod. 2005), je nastanek tumorjev pospešen ob prisotnosti poškodovanega tkiva (Kerr, 1992). Pri izvajanju poskusov preučevanja odnosov škodljivcev na testnih rastlinah se nekateri avtorji odločajo za inokulacijo koreninskega sistema z *A. tumefaciens* (Dhanvantari in sod., 1975; Fakhouri in sod., 1996) ali za mehansko okužbo patogenega seva *A. tumefaciens* v steblo testne rastline (Lee in sod., 2009). Za študij odnosa *Agrobacterium-Meloidogyne* smo lončne teste zasnovali tako, da se oba preučevana organizma srečata v rizosferi, podobno kot se to dogaja v naravnem okolju. S predhodnimi poskusi smo določili mejno velikost bakterijskega inokuluma, kjer je bakterija *A. tumefaciens* še sposobna spodbuditi nastanek tumorja. Znano je, da je za transformacijo gostiteljske rastline in posledični nastanek tumorjev, pomembna gostota agrobakterij v rizosferi. V nedavni študiji so Li in sod. (2015) ugotovili, da pojavnost raka koreninskega vratu na cepljenkah breskev presega 80 %, kadar je gostota *A. tumefaciens* v tleh večja od 10^5 CFU/g. Podobno je veljalo tudi v naših pogojih, kjer je sev *A. tumefaciens* 06-424-7 tvoril tumorje na koreninah paradižnika (cv. Saint Pierre) ob gostoti večji od 10^5 CFU/g. Gostota bakterij, ki smo jo uporabili v vseh lončnih poskusih je bila 10^6 CFU/g rastnega substrata.

Za okuževanje gostiteljskih rastlin z ogorčicami koreninskih šišk lahko uporabimo dva tipa inokuluma, jajčeca ali infektivne ličinke J2. V večini študij inokulum predstavljajo ličinke J2 (Griffin, 1968; Ogallo in McClure, 1996; Süle in sod., 1995; Rubio-Cabetas in sod., 2001; Siddiqui in sod., 2007; Aryal in sod., 2011; Naserinasab in sod., 2011; Martinuz in sod., 2013; Mantelin in sod., 2013), v nekaterih tudi jajčeca (Fakhouri in sod., 1996; Gal in sod., 2006; Strajnar in sod., 2011; Radwan in sod., 2012; Ibrahim in sod., 2014). V nematološkem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije imamo vpeljšano metodo za pridobivanje jajčec ogorčic vrst *Meloidogyne* s korenin gostiteljskih rastlin (Strajnar, 2012). Ker smo kot inokulum uporabili jajčeca *M. ethiopica*, smo za vrednotenje uspešnosti razmnoževanja uporabili razmerje med končnim in začetnim številom jajčec oz. z reprodukcijskim faktorjem (Rf). Nizek inokulum (1000 – 2000 jajčec/rastlino) smo izbrali, ker smo pričakovali sinergistični odnos, kar pomeni boljše razmnoževanje ogorčic, posledično pa bolj ogaljene korenine ob koncu poskusa. Ob višjih inokulumi bi težko ocenili stanje korenine zaradi močne ogaljenosti tako na kontrolnih kot na testnih koreninah paradižnika. Ob nizkem inokulumu jajčec ogorčic se tumorji od gal ločijo po svoji okrogli obliki in razbrazdani površini, medtem ko je koreninska povrhnjica pri galah gladka. Ob večjem inokulumu ogorčic, so gale večje zaradi nagnetenosti samic, pogosto pa samice najdemo tudi v tumorskih tvorbah (Esser in sod., 1968), zato je razlikovanje med galo in tumorjem pod binokularjem skoraj nemogoče.

5.1.4.1 Vpliv ogorčice in agrobakterije na rast paradižnika

Procesi v rastlini morajo biti uravnoteženi. Vsak od vitalnih procesov zahteva del energije, ki je na voljo rastlini, a količine so omejene. Seznam prednostnih procesov se zato spreminja glede na okoljske pogoje. Obramba rastline porabi veliko energije, saj vključuje masovno proizvodnjo protimikrobnih snovi in popravila nastale škode (Bolton, 2009; Pajerowska-Mukhtar in sod., 2012). Koreninska gala in bakterijski tumor sta porabnika gostiteljevih virov energije. Prvi znaki izčrpanja rastline zaradi prisotnosti fitoparazitskih ogorčic ali rastoče tumorske mase so opazni na indeksih rasti gostiteljske rastline. Ob daljši izpostavljenosti škodljivemu organizmu, se povečuje tudi negativen učinek delovanja škodljivca na zdravje in vitalnost rastline.

Indeksi rasti zabeleženi v času 45 dpi so se razlikovali od indeksov v času 90 dpi. Okužba korenin paradižnika, bodisi z *A. tumefaciens* in/ali *M. ethiopica* po zaključenem prvem razvojnem krogu ogorčice (45 dpi), ni vplivala na težo korenin ter svežo in suho težo zelenega nadzemnega dela. Opazili pa smo višje rastline pri neokuženih, kontrolnih rastlinah. Strajnar in sod. (2012) so dosegli vizualen in kvantitativen vpliv na fiziologijo paradižnika pri zelo visokem inokulumu *M. ethiopica* na koreninski sistem (> 50.000). Velikost našega inokuluma ogorčic je bila nizka (2000 jajčec na rastlino) in zato tudi vpliv na rast rastline manjši. Vpliv *A. tumefaciens* na rast paradižnika je bil pričakovano zanemarljiv. Teža tumorjev, kjer so se pojavili, ni vplivala na težo korenin in tudi ne na

suho in svežo težo nadzemnega zelenega dela. Tudi Fakhouri in sod. (1996) niso zabeležili vplivov bakterije *A. tumefaciens* in *M. javanica* na indekse rasti paradižnika (kultivar NS 268) po treh mesecih inkubacije.

Po 90-ih dneh smo zabeležili več vplivov na indekse rasti. Okužene testne rastline so imele manjšo suho in mokro težo, in težji koreninski sistem. Najverjetneje so ogorčice in agrobakterije izčrpavale rastline, predvsem na račun močnejše ogaljenosti. Podobno so opazili tudi Fakhouri in sod. (1996) na paradižniku in Mukhtar in sod. (2013) na kultivarjih kumar (*Cucumis sativus* L.). Kljub večji koreninski masi, je sposobnost črpanja vode v ogaljenih koreninah zmanjšana. Le tanjši koreninski laski prispevajo k hidraciji rastline, a teh je na ogaljenih koreninah manj (Strajnar in sod., 2012).

5.1.4.2 Vpliv *A. tumefaciens* na razmnoževanje *M. ethiopica*

Nekatere vrste rizobakterij in rast-spodbujajoče bakterije (PGPB) pozitivno delujejo na rastline. Z vezavo na korenine preprečijo poselitev škodljivih mikrobov, s proizvodnjo protimikrobnih snovi zavirajo rast škodljivih mikroorganizmov in poleg vsega še spodbujajo rast rastlin (Persello-Cartieaux in sod., 2003). Antagonistični učinek rizobakterij na razmnoževanje ogorčic koreninskih šišek je bil ugotovljen na številnih gostiteljskih rastlinah (Lamovšek in sod., 2013). Znano je, da nepatogeni mikroorganizmi sprožijo imunski odziv v rastlini, ki se razlikuje od odziva na patogene mikrobo.

V ugodnih pogojih se pričnejo ličinke ogorčic izlegati in vstopati v korenino okoli 3. dne po inokulaciji. Vstop ličink J2 v korenino v rastlini ne sproži burnega odziva, saj ličinke potujejo po apoplastni poti in se skrivajo pred obrambo gostitelja vse dokler rastlina ne prepozna efektorjev in aktivira obrambo ETI v odpornih kultivarjih, ki s hitrim posredovanjem prepreči razvoj ogorčic. V kompatibilni interakciji je rastlinska obramba nemočna proti napadu ogorčic. Za razliko od ogorčic koreninskih šišek, prisotnost patogene *A. tumefaciens* na koreninah ne ostane dolgo skrita pred gostiteljem. Poskusi na *A. thaliana* so pokazali na hiter obrambni odziv rastline, ki pa se razlikuje od splošnega odziva rastline na bakterije (Lee in sod., 2009).

Iz faktorjev Rf je razvidno, da so z agrobakterijami (patogenimi ali nepatogenimi) poseljene korenine paradižnika, manj gostoljubne za razmnoževanje ogorčic *M. ethiopica*. V obravnavanju N2B1, kjer smo zabeležili manjše razmnoževanje *M. ethiopica*, so bile agrobakterije prisotne na koreninah vsaj 5 dni preden se je večina ličink J2 izlegla. Poleg tega traja vsaj še 1 do 2 dni preden ličinka najde ustrezno mesto v korenini in postane sedentarna. Splošni zgodnji odziv PTI v obliki povečane količine ROS na agrobakterije in ličinke J2 nima vpliva, saj so se oboji sposobni zaščititi pred oksidativnim izbruhom gostitelja (Jia in sod. 1996; Xu in Pan, 2000; Dubreuil in sod., 2011). Prav tako so ostali obrambni mehanizmi splošnega odziva na patogene, kot je nalaganje kaloze, ojačanje

celičnih sten in drugi, ki delujejo z namenom omejitve širjenja patogena po rastlini, pri ogorčicah neuspešni, saj ličinke izločajo v okolico mešanico encimov za razgradnjo celičnih sten (Davis in sod., 2004). Znano je, da je vstop ličink ogorčic koreninskih šišek v korenine kompatibilnih in nekompatibilnih rastlin enak (Melillo in sod., 2006). Dokazali smo, da za zmanjšano razmnoževanje *M. ethiopica* ni bila odgovorna neposredna prisotnost agrobakterij, saj so agrobakterije zmanjšale razmnoževanje ogorčic tudi, kadar so bile fizično ločene od ogorčic. Agrobakterije so najverjetneje v roku enega tedna, t.j. pred izleganjem ličink in še nadaljni dan ali dva, sprožile obrambne procese v rastlini, ki sicer niso preprečili vstopa ličink (Pregl. 19), ampak so preprečili nastanek gal in posledično zmanjšali končno populacijo jajčec (Pregl. 16, Pregl. 17). Do trenutka, ko ličinke prispejo do primerne mesta za ustalitev in nastanek gale, porabijo vse zaloge energije. Ličinke J2 se med procesom infekcije ne prehranjujejo. Če ličinka ni sposobna spodbuditi nastanka gale, umre.

Zanimivo je, da so tudi nepatogene agrobakterije, toplotno obdelane agrobakterije in nepatogeni sev *E. coli* v enaki meri zmanjšali razmnoževanje *M. ethiopica*. Vse kaže v prid domnevi o splošnem odzivu rastline PTI na bakterije zaradi prisotnosti molekul MAMP. Znano je, da so nepatogene bakterije *E. coli* sposobne aktivirati obrambo rastline (Melotto in sod., 2006). Podoben odziv izzovejo tudi sevi agrobakterij, ki se ne morejo pritrditi na gostiteljsko celico (Ditt in sod., 2006). Agrobakterije nosijo na svoji površini molekule flagelina elf26, ki so zelo variabilne (Felix in sod., 1999), in sprožijo spremenjeno izražanje kar 948 genov v *A. thaliana* (Zipfel in sod., 2006). V literaturi zasledimo, da nekatere endomikorizne glive ali rizobakterije s sposobnostjo povečanja rasti rastline (PGPR) delujejo antagonistično na ogorčice koreninskih šišek (Lamovšek in sod., 2013). Rastlina naj bi se na nepatogene bakterije in endomikorizne glive odzvala s sistemskim obrambnim odzivom, ki je pod nadzorom JA in ET, ter se imenuje inducirana sistemska odpornost (ISR). Sistemski odziv pa lahko sprožijo tudi delci LPS z ovoja bakterij, četudi mrtvih (Mishina in Zeier, 2007). Bakterijo *Escherichia coli* smo uporabili za primerjavo odziva rastline na patogeni in nepatogeni sev agrobakterije. Glede na število jajčnih vrečk, so največje zmanjšanje razmnoževanja ogorčic povzročile prav toplotno obdelane agrobakterije in nepatogeni sev *E. coli*. Predvidevamo, da je rastlina v primeru mrtvih celic agrobakterij in *E. coli* prepoznala molekule MAMP in sprožila odziv PTI. Znano je, da patogena bakterija *E. coli* O157:H7 v rastlini *Arabidopsis* sproži od SA odvisno zapiranje listnih por (Melotto in sod., 2006) ter, da bakterijski flagelin in očiščen LPS povečata izražanje genov *PR* in aktivacijo odziva SAR prek delovanja hormona SA (Mishina in Zeier, 2007; Seo in Matthews, 2012). Domnevamo, da žive celice *A. tumefaciens* in *E. coli* ne sprožijo enakih obrambnih reakcij v rastlini, ker imajo patogene agrobakterije mehanizme za utišanje obrambe rastline, a rezultat je enak pri obeh, t.j. zmanjšano razmnoževanje *M. ethiopica*.

Sočasni ali kasnejši dodatek agrobakterij k ogorčicam (obravnavanji NB in N1B2) ni vplival na razmnoževanje ogorčic (Pregl. 16, Pregl. 17). Ob sočasnem dodatku jajčec ogorčic in bakterij, je *A. tumefaciens* prvi vzpostavil stik z gostiteljem, a kljub temu ni vplival na razmnoževanje *M. ethiopica*. Najbolj verjetna razlaga je, da so agrobakterije aktivirale obrambo PTI, a ta potrebuje več časa, da se razvije (Katagiri in Tsuda, 2010), medtem pa so se ličinke *M. ethiopica* že ustalile in se zaščitile pred obrambo gostitelja. Kljub podobni zasnovi poskusa so Fakhouri in sod. (1996) so zabeležili antagonističen vpliv *A. tumefaciens* na razmnoževanje *M. javanica* v obravnavanju enakovredno našemu NB s sočasnim dodatkom obeh patogenov h koreninam paradižnika. Ugotovili so tudi, da z mešanim inokulumom skoraj popolnoma preprečijo razvoj ličink in posledično nastanek gal. Manjše število gal so zabeležili tudi Süle in sod. (1995) na vinski trti okuženi z *A. vitis* in *M. hapla*.

Z agrobakterijami smo v obravnavanju N2B1 dosegli zmanjšano razmnoževanje *M. ethiopica*, a to zmanjšanje se ne more primerjati z zmanjšanjem, kot ga dosežemo z uporabo biotičnih agensov. Biokontrolni sevi rizobakterij zmanjšajo faktor Rf pod 1. Pravzaprav smo z agrobakterijami dosegli kratkoročno zmanjšanje. Po treh mesecih (90 dpi) je bilo število gal na gram korenin približno enako v vseh obravnavanjih. Po drugem razvojnem krogu so bile gale veliko večje in ocenjevanje števila gal je bilo težje. Ena zadebelitev na korenini je *in vitro* predstavljala eno galo, a v *in vivo* pogojih smo našli več samic znotraj ene gale. Variabilnost v rezultatih je bila zato večja. Po vizualnem pregledu korenin ni bilo mogoče ločiti med koreninami okuženimi samo z *M. ethiopica* in koreninami okuženimi z mešanim inokulumom, čeprav smo razlike zabeležili v številu jajčnih vrečk. Najmanj vrečk smo prešteli v obravnavanju N2B1, enako kot po 45 dpi. Faktor Rf je bil 45 dpi 2,4-krat manjši od kontrolnega (Pregl. 14), premalo za biokontrolni učinek. Po treh mesecih smo opazili relativno povečanje faktorja Rf v obravnavanju N1B2 v primerjavi s kontrolo. Ob daljši interakciji med obema partnerjema ne izključujemo možnosti sinergizma. Ker pa je bil najdaljši čas poteka poskusa 90 dni, ne moremo napovedati učinka daljše interakcije *Agrobacterium-Meloidogyne* na razmnoževanje *M. ethiopica*. Trenutek, ko se oba organizma srečata ob gostiteljski rastlini, je odločilen za nadaljni potek razmnoževanja ogorčic in patogeneze bakterij. Medsebojni odnos bi tako lahko bil antagonističen in sinergističen, odvisno od tega kdo je prvi prisoten na koreninah.

Eden od mehanizmov zgodnje obrambe rastline je ojačanje celičnih sten ter nalaganje kaloze (Jones in Dangl, 2006; Schwessinger in Ronald, 2012). Preverili smo domnevo o vplivu rastlinske obrambe na vstop infektivnih ličink *M. ethiopica* v korenine paradižnika ob posredni in neposredni prisotnosti *A. tumefaciens* na koreninah. Domnevo smo predhodno že preverili na *A. thaliana in vitro*, a tam se je izkazalo, da sistem ni primeren za tovrstna vprašanja (Pregl. 10). Postavili smo poskus na ločenih koreninah in opazovali vstop ličink 8 in 12 dpi. Ugotovili smo, da je bilo število ličink v koreninah po 12-ih dneh v vseh obravnavanjih enako in zaključili, da sistemski odziv, ki naj bi se vklopil ob

prisotnosti agrobakterij, ne zmanjša vstopa ličink v korenine. Podobna vprašanja so si zastavljali že v preteklosti. Mehanske prepreke, kot je kopičenje kaloze v rastlinskem tkivu, niso učinkovite proti rastlinsko-parazitskim ogorčicam, saj ličinke z izločanjem encimov tovrstne prepreke preдреjo (Kaplan in Keen, 1980). Nasprotno, pa so v številnih študijah dokazali, da lahko gliva *Fusarium oxysporum* Fo162 ali rizobakterijski sev *Rhizobium etli* G12 zmanjšajo vstop ličink *M. incognita* v korenine prek neposrednega delovanja na ličinke ali prek spremenjene sestave koreninskih izločkov (Hallmann in sod., 2001; Dababat in Sikora, 2007; El-Fattah in sod., 2007; Martinuz in sod., 2013). Seva Fo162 in G12 tudi zavirata razvoj ličink *M. incognita* iz faze J2 v J4 (Martinuz in sod., 2013). Dva tedna po inokulaciji ličink na korenine niso opazili razlik v številu J2 med koreninam tretiranimi z bakterijami in netretirano kontrolo, pač pa v številu J3 ličink, ki so bile številčnejše v netretirani kontroli (Martinuz in sod., 2013). Upočasnjjen razvoj infektivnih ličink v odrasle osebkke v našem primeru ne moremo izključiti zaradi prekratkega časa trajanja poskusa.

5.1.4.3 Vpliv *M. ethiopica* na nastanek tumorjev

Z lončnimi poskusi smo dokazali antagonistični učinek bakterije *A. tumefaciens* na razmnoževanje ogorčic *M. ethiopica*. Antagonistično delovanje enega partnerja na drugega ni nujno dvosmerno. Med izvajanjem poskusov smo opazovali pojav tumorjev na koreninskem sistemu paradižnika okuženem z ogorčicami in ugotovili, da prisotnost ogorčice poveča maso tumorjev, čeprav je bilo povečanje statistično neznačilno ($p > 0,05$).

V študiji na mladih sadikah breskev so Dhanvantari in sod. (1975) opazovali vpliv poškodovanega koreninskega sistema, zaradi delovanja ogorčic koreninskih šišek, na pojav raka koreninskega vratu. Ugotovili so, da je pojav tumorjev neodvisen od prisotnosti ogorčic *M. hapla*, *M. incognita* in *Pratylenchus penetrans*, kadar je sadika izpostavljena patogenim agrobakterijam več kot 150 dni. Ugotavljajo pa, da se tumorji hitreje pojavijo na sadikah breskev, kadar so v zemlji prisotne ogorčice, vendar se po 150-ih dneh tumorji pojavijo na vseh kontrolnih sadikah. Tudi Fakhouri in sod. (1996) so po treh mesecih zabeležili pojav tumorjev na koreninah paradižnika povsod, kjer je bil patogen *A. tumefaciens* prisoten, a je bila teža tumorjev ob prisotnosti *M. javanica* manjša. Podobno ugotavljamo tudi mi. Tumorji so se pojavili v vseh obravnavanjih 45 dpi, kjer smo dodali *A. tumefaciens*, razen v obravnavanju, kjer smo ogorčice inokulirali en teden pred agrobakterijami (N1B2). Podobno opažajo tudi Fakhouri in sod. (1996), kjer so odsotnost tumorjev zabeležili na paradižniku inokuliranem z visokim inokulumom jajčec (5000 in 15000 jajčec/rastlino), ob nižjem (1000 jajčec/rastlino) pa so bili tumorji lažji. Odsotnost tumorjev v lončnem poskusu N1B2 je bila najverjetneje posledica načina okuževanja z bakterijami. Suspenzijo agrobakterij smo osmi dan po inokulaciji z jajčeci ogorčic zalili okoli vratu sadike paradižnika. S tem nismo povzročili mehanskih poškodb na koreninah, kot se je to zgodilo v primeru inokulacije ob presajanju. Edine poškodbe na koreninah so

bile vstopne rane ob vstopu ličink *M. ethiopica*, a te očitno niso povečale pojavnosti tumorjev. Povečan vstop ličink J2 smo pričakovali okoli 3. dne po inokulaciji korenin z jajčeci, zato je povsem verjetno, da so se vstopne rane do 8. dne, ko smo dodali bakterije, zacelile. Uporabili smo inokulum 2000 jajčec/rastlino, ki je sodeč po rezultatih Fakhouri in sod. (1996), dovolj velik, da bi aktivnost ogorčic lahko preprečila nastanek tumorjev na koreninah. Nasprotno pa mi ugotavljamo, da je bila povprečna, a statistično neznačilna, teža tumorjev v obravnavanjih, kjer so se pojavili, večja ob prisotnosti *M. ethiopica*. Večja teža tumorja bi lahko bila posledica (a) stimulativnega učinka *M. ethiopica* na rast tumorjev, kot sta predvidevala Zutra in Orion (1982) ali (b) hitrejšega pojava tumorjev ob prisotnosti ogorčice, kot so to opazili tudi Dhanvantari in sod. (1975). Karimi in sod. (2000) so dokazali, da se frekvenca transformacije z *A. tumefaciens* poveča ob prisotnosti ogorčic koreninskih šišk. Naše predvidevanje je, da se tumorji pojavijo hitreje ob prisotnosti ogorčic, zato so tudi po masi relativno težji od tumorjev na kontrolnih rastlinah, kjer se le-ti pojavijo kasneje in so zato lažji.

5.1.5 Sistemski odziv paradižnika na hkratno okužbo z agrobakterijami in ogorčicami koreninskih šišk

Z lončnimi poskusi smo dokazali, da agrobakterije lahko zmanjšajo razmnoževanje *M. ethiopica* na koreninah paradižnika, če okužijo rastlino pred napadom ogorčic. Ugotovili smo tudi, da je delovanje agrobakterij na ogorčice posredno prek aktivacije obrambnih poti v rastlini. Precej vemo o izražanju genov *A. thaliana* v tumorjih (Ditt in sod., 2001; Veena in sod., 2003; Ditt in sod., 2005; Deeken in sod., 2006; Ditt in sod., 2006; Yuan in sod., 2008a, 2008b; Lee in sod., 2009), ne pa o izražanju v sistemsko oddaljenih tkivih, kjer tumor ni prisoten. Več je znanega o sistemskem in lokalnem dogajanju okužbe rastlin z ogorčicami, tako s cistotvornimi (Puthoff in sod., 2003; Alkharouf in sod., 2006; Ithal in sod., 2007a; Ithal in sod., 2007b; Fuller in sod., 2007) kot z ogorčicami koreninskih šišk (Wang in sod., 2003; Bar-Or in sod., 2005; Jammes in sod., 2005; Dubreuil in sod., 2007; Fuller in sod., 2007; Bhattarai in sod., 2010; Fujimoto in sod., 2011; Nahar in sod., 2011; Hamamouch in sod., 2011; Kyndt in sod., 2012).

Po nam znanih podatkih še nihče ni raziskoval vpliva interakcije *Agrobacterium-Meloidogyne* na spremenjeno izražanje genov gostiteljske rastline. Pravzaprav je naša študija prva, ki je spremljala izražanje genov iz signalizacijske poti JA in SA na koreninah, prostorsko ločenih od okuženega dela korenin. V večini primerov sistemski odziv gostiteljske rastline ob napadu ogorčic koreninskih šišk predstavljajo rezultati analize spremenjenega izražanja genov v vzorcih celokupnih korenin, t.j. napadeni in nenapadeni deli korenin. Rezultati takšnih analiz so dvomljivi, saj ne vemo v kolikšni meri prepisi iz gal prispevajo k celokupnem izražanju genov v koreninskem sistemu (Li in sod., 2008). Rezultati genetskih študij sistema odziva na ogorčice koreninskih šišk so velikokrat nerazložljivi. Ene študije govorijo o zmanjšanem izražanju obrambnih genov v nadzemnih

tkivih paradižnika in riža, vendar imajo taisti geni povečano raven izražanja v koreninah (Hamamouch in sod., 2011; Kyndt in sod., 2012). V okuženih koreninah, bodisi z bakterijami bodisi z ogorčicami, se običajno poveča izločanje hormona etilena (ET). ET je plin, ki se sprošča v okolico ter vpliva na izražanje genov. Poleg tega, nekateri rizosferni mikroorganizmi sproščajo v okolico hlapne organske spojine, ki sprožijo obrambne odzive v rastlini (Farag in sod., 2013). S spremljanjem izražanja genov na ločenih koreninah nismo izolirali korenine le od bakterij in ogorčic, ampak tudi preprečili vsem hlapnim signalom vpliv na izražanje gostiteljevih obrambnih genov.

Na splošno smo opazili slabše (statistično neznačilno) ali zmanjšano izražanje preiskovanih tarčnih genov. Vzrok za odsotnost močnega systemskega odziva je v našem primeru verjetno posledica majhnega inokuluma posameznega patogena. Študije izražanja genov uporabljajo visoke inokuleme, ki v gostiteljski rastlini izzovejo hiter odziv, poleg tega pa stremijo k sinhronizaciji okužbe. Medtem ko z bakterijskim inokulumom z lahkoto dosežemo sočasno okužbo, moramo pri ogorčicah kot inokulum uporabiti ličinke enake starosti. Jajčeca ogorčic, ki smo jih uporabili kot inokulum, se ne valijo enakomerno. Korenine so tako izpostavljene kontinuiranemu napadu ves čas izleganja ličink in ves ta čas rastlina tudi prilagaja svoj odziv. V *in vitro* pogojih so se ličinke izlegale še po desetem dnevu. Zmanjšano izražanje gostiteljskih genov je pravzaprav običajen pojav v kompatibilnih interakcijah. Schaff in sod. (2007) so v kompatibilni interakciji paradižnika s fitoparazitskimi ogorčicami ugotovili zmanjšano izražanje kar dveh tretjin vseh genov s spremenjenim izražanjem. V nekompatibilni interakciji pa ravno obratno; več je bilo genov s povečanim izražanjem.

Vzorčili smo na treh časovnih točkah, 0, 4 in 12 dpi. Čas 0 dpi, t.j. največ eno uro po dodatku inokuluma smo izbrali zaradi znanega hitrega odziva rastlin na bakterije. Številne študije so prišle do različnih ugotovitev glede časa aktivacije imunskega odziva gostitelja na okužbo z *A. tumefaciens*. V celični kulturi *Ageratum conyzoides* so imeli obrambni geni rastline spremenjeno izražanje že v prvih 24 urah po okužbi s hipervirulentnim netumorogenim agrobakterijskim sevom (Ditt in sod., 2001). V suspenzijski kulturi tobaka okuženega z različnimi sevi *Agrobacterium* se je izražanje obrambnih genov povečalo v času od 3 do 6 ur po inokulaciji in znižalo po prenosu T-DNA v gostiteljske celice (Veena in sod., 2003). V drugi študiji na celicah *Arabidopsis* v celični kulturi, pa so se obrambni geni vključili šele 48 h po inokulaciji (Ditt in sod., 2006). Po inokulaciji patogenega seva *A. tumefaciens* C58 v steblo *A. thaliana* se je povečalo izražanje obrambnih genov že po 3 h (Lee in sod., 2009). V našem poskusu je edini gen, ki je imel spremenjeno izražanje v času 0 dpi, gen ACS6 iz obravnavanja C58. Ob inokulaciji bakterijske suspenzije *A. tumefaciens* C58 se je v roku 15 min, od dodatka h koreninam do spravila zmletega vzorca, zmanjšalo izražanje gena ACS6 na ločeni strani korenin. Hiter odziv rastline ni presenetljiv. Znano je, da se začne ET sproščati okoli 10 – 30 min po zaznavi stresa (Yang in Hoffman, 1984). Gen ACS6 kodira zapis za encim ACC sintazo, ki sodeluje pri sintezi

ET v rastlini. ET uravnava odziv rastline tako ob biotičnem kot abiotičnem stresu, sodeluje pa tudi v procesih rasti in razvoja rastline (Bleecker in Kende, 2000; Wang in sod., 2002). Bazalna raven celične aktivnosti encimov ACS je nizka, a se pod stresom poveča, temu pa sledi porast v količini sproščenega ET. Hitrost nastajanja ET je odvisna od encimske aktivnosti encimov ACS in ne encimov ACO, zlasti v stresnih pogojih (Bleecker in Kende, 2000; Wang in sod., 2002; Liu in Zhang, 2004). Ugotovili so, da je vsaka izomera encima ACS prostorsko in časovno uravnana s številnimi notranjimi in zunanjimi signali (Wang in sod., 2002). Na primer, med zorenjem paradižnika sta gena ACS2 in ACS4 v plodu pozitivno regulirana z ET, medtem ko je gen ACS6 uravnan z negativno povratno zanko (Nakatsuka in sod., 1998; Lin in sod., 2007). Lee in sod. (2009) so ugotovili, da se v zgodnjih stopnjah okužbe z *A. tumefaciens* C58 (3 hpi) v *A. thaliana* poveča izražanje genov ACS (izomeri ACS6 in ACS8) ter gena ACO1, tako ob okužbi s patogenim kot nepatogenim sevom (Lee in sod., 2009). Povečana koncentracija ACC na tej stopnji naj ne bi vplivala na izražanje markerskih genov iz signalnih poti ET, JA ter SA (Lee in sod., 2009).

V melonah (*Cucumis melo*) je okužba z agrobakterijami povečala sintezo rastlinskega ET (Ezura in sod., 2000), zato smo pričakovali povečano izražanje genov vpletenih v biosintezo ET (ACS6 in ACO1), vsaj v obravnavanjih z bakterijo. Opaženo zmanjšano izražanje ACS6 bi po naših predvidevanjih lahko bila posledica visoke koncentracije ET v tkivu, kateri z negativno povratno zanko vpliva na izražanje biosinteznega gena ACS6. V plodu paradižnika je gen ACS6 del sistema, ki vzdržuje osnovno raven ET v plodovih (Lin in sod., 2007). Že Liu in Zhang (2004) sta dokazala, da aktivacija gena ACS6 ne poveča encimske aktivnosti proteina ACS6, ker je njegova aktivnost uravnavana na post-translacijski ravni. V *A. thaliana* je gen ACS6 v koreninah pod nadzorom ET in IAA, ter sodeluje v odzivu na hipoksijo (Peng in sod., 2005; Lin in sod., 2009). Zaradi zapletenega nadzora ACS encimov in pomanjkanja informacij o regulaciji ACS6 v koreninah paradižnika ob biotičnem stresu, ne moremo zadovoljivo razložiti opaženega zmanjšane izražanja gena ACS6 v koreninah paradižnika ob 0 dpi. Po 12. dneh se je koncentracija ET najbrž znižala, ker smo zabeležili zmanjšano izražanje gena ACO1. Vendar, obstajajo še druge izomere encima ACO, zato zmanjšano izražanje ene izomere ne nakazuje nujno na zmanjšano sintezo druge (Lin in sod., 2009).

Mantelin in sod. (2013) so ugotovili izražanje gena ACS6 in genov ACO v koreninskih vršičkih napadenih z ličinkami ogorčic koreninskih šišek (12 hpi). Mi smo v obravnavanju N1B2 ob 12 dpi zabeležili zmanjšano izražanje ACS6. Predvidevamo, da je za zmanjšano izražanje biosinteznega gena ET, izomere ACS6, bolj odgovorna prisotnost agrobakterij kot ogorčic. Patogeni sev *A. tumefaciens* je zmanjšal izražanje genov ACS6 in ACO1 ob 0 in 12 dpi bolj kot sama ogorčica *M. ethiopica* v enakem času. Glede na rezultate analize izražanja genov je interakcija med agrobakterijami in *M. ethiopica* v obravnavanju N1B2 vplivala na koncentracijo ET v ločenih koreninah. Z lončnimi poskusi nismo zaznali vpliva

agrobakterij na razmnoževanje ogorčic v obravnavanju N1B2, smo pa opazili odsotnost tumorjev na koreninah. Iz literature je znano, da na nastanek raka koreninskega vratu močno vpliva etilen. Genotip paradižnika *Nr* (*Never ripe*) z okvarjenim zaznavanjem ET, ne razvije tumorjev, kljub integraciji in izražanju genov s T-DNA (Aloni in sod., 1998). Ker nismo spremljali izražanja genov na okuženi strani korenin, ne vemo ali je zmanjšano izražanje gena za sintezo etilena ACS6 zares povezano z visoko koncentracijo ET, ki je glede na poročanja številnih študij prisotna na okuženi strani (Ezura in sod., 2000; Lee in sod., 2009). Visoka koncentracija ET bi razložila odsotnost tumorjev na koreninah v obravnavanju N1B2 (lončni poskus), saj je transformacija bakterijske T-DNA je ob visokih koncentracijah hormona ET ovirana (Yuan in sod., 2008a).

V kompatibilni in nekompatibilni interakciji *M. javanica* s paradižnikom ima skupina transkripcijskih dejavnikov iz družin MYB, AP2/ERF in WRKY, ki sodelujejo pri prenosu signala v stresnih pogojih, spremenjeno izražanje (Bhattacharai in sod., 2010). V času 4 dpi smo v obravnavanjih Me in C58 zabeležili zmanjšano izražanje transkripcijskih dejavnikov WRKY in ERF iz signalizacijske poti JA. Na ločenih koreninah se je ob okužbi z *M. ethiopica* manj izražal gen *SlWRKY72*, kar ni presenteljivo, saj se *SlWRKY72* močneje izraža v nekompatibilni interakciji paradižnika z ogorčicami koreninskih šišek (Bhattacharai in sod., 2010). Izražanje *SlWRKY72* ob prisotnosti agrobakterijskih sevov C58 in C58C1, je bilo šibkejšje od izražanja *SlWRKY72* v obravnavanju z mešanim inokulumom (N2B1), kar nakazuje na vpletenost signalizacijske poti JA v odzivu paradižnika na prisotnost obeh partnerjev v interakciji. Znano je, da transkripcijski dejavnik *SlWRKY72* vpliva na izražanje genov vpletenih v bazalno imunost paradižnika proti ogorčicam koreninskih šišek (Bhattacharai in sod., 2010). Njegovo vlogo v obrambnih procesih so potrdili tudi na koreninah *A. thaliana* z utišanim genom *AtWRKY72*, zaradi česar so se ogorčice koreninskih šišek boljje razmnoževale (Ali in sod., 2013).

V obravnavanju C58 se je v času 4 dpi manj izražal transkripcijski dejavnik ERF5 ($p = 0,03$), ki spada v drugo vejo obrambne poti JA in se aktivira ob napadu z nekrotrofi (Verhage in sod., 2011). Zmanjšanje ni bilo statistično značilno ($p > 0,01$), a skupaj z zmanjšanim izražanjem *SlWRKY72* ($p = 0,03$) kaže na trend zmanjšane izražanja genov vpletenih v pot JA v sistemskem odzivu na sev C58. Tudi ogorčice *M. ethiopica* so ob 12 dpi zmanjšale izražanje transkripcijskega dejavnika ERF5 ($p = 0,023$). Močno zmanjšano izražanje ERF5 in ERF6 so zabeležili v večjedrnih celicah *A. thaliana* ob parazitiranju *Heterodera schachtii* in pojav povezali z zavrtjem obrambe gostitelja v korist ogorčice (Ali in sod., 2013). Na ločeni strani korenin, stran od mesta napada ogorčic, ne moremo opredeliti posledic zmanjšane izražanja ERF5. Namreč, transkripcijski dejavnik ERF5 lahko deluje kot pozitivni (Moffat in sod., 2012) ali negativni regulator (Son in sod., 2012) odziva poti JA/ET ob okužbi z glivnimi patogeni. Da je uravnavanje izražanja ERF5 kompleksno pove tudi dejstvo, da geni pod nadzorom dejavnika EFR5 niso vpleteni samo v odziv na biotični stres, ampak tudi na abiotični stres, kot sta suša in solni stres v listih

paradižnika (Pan in sod., 2012). V našem primeru je bilo izražanje *ERF5* premalo spremenjeno, da bi lahko opredelili njegovo vlogo v obrambi rastline.

Agrobakterije v rastlini ne izzovejo enakih reakcij kot rizobakterijski biotični agensi. Vemo, da tretiranje rastlin s snovmi, ki aktivirajo pot salicilne kisline (SA) in sistemsko pridobljeno odpornost (SAR) zmanjša pojavnost tumorjev na paradižniku (Yuan in sod., 2007). SA prav tako vpliva na izražanje genov virulence ter pri večjih koncentracijah zavre razmnoževanje *A. tumefaciens* (Yuan in sod., 2007). Različni genotipi oz. kultivarji gostiteljskih rastlin vzdržujejo različno bazalno raven SA, zato se okužba s patogenim sevom agrobakterij ne izrazi vedno s tumorjem. To smo opazili tudi v lončnih poskusih, kjer je 8 od 11 kontrolnih rastlin razvilo tumorje. Gen za protein *PR-1*, ki velja za markerski gen poti SA, je imel ob inokulaciji s C58 višjo raven izražanja na ločenih koreninah v času 4 dpi kot ob inokulaciji s C58C1. Sev C58C1 nima plazmida pTi, a je v vseh drugih pogledih enak sevu C58. Po 12. dneh je patogeni sev C58 uspel zmanjšati izražanje *PR-1* in s tem preprečiti aktivacijo sistemskega odziva. Opaženi učinek se sklada z modelom Veena in sod. (2003), ki pravi, da prisotnost patogenega seva agrobakterij v začetnih stopnjah infekcije sproži obrambni odziv rastline, ki pa se utiša kmalu po aktivaciji bakterijskih genov vpletenih v transformacijo.

Številne študije kažejo na pomembno vlogo neokvarjene poti JA v obrambi proti ogorčicam koreninskih šišk (Bhattacharai in sod., 2008; Fujimoto in sod., 2011; Nahar in sod., 2011), a vloga samega hormona JA še vedno ni jasna. Na paradižniku so dokazali pomembnost dela signalizacijske poti JA, ki deluje prek proteina COI-1, v obrambi pred ogorčicami (Bhattacharai in sod., 2007). COI-1 je receptor za hormon JA in je ključen v signalizacijski poti JA. Nekateri patogeni izkoriščajo pot COI-1, kot npr. v patosistemu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* – paradižnik, kjer bakterija za virulenco nujno potrebuje neokvarjeno pot COI-1 (Zhao in sod., 2003; Katsir in sod., 2008). Nekateri avtorji zato predvidevajo obstoj funkcionalnega analoga JA v izločkih ogorčic koreninskih šišk, ki podobno kot fitotoksin koronatin iz *P. syringae* pv. *tomato* vpliva na signalizacijsko pot COI-1 (Bender in sod., 1999; Weiler in sod., 1994). V študiji izražanja genov smo spremljali tudi gen *COI-1* in zabeležili nespremenjeno izražanje v vseh treh časovnih točkah. Geni vpleteni v pot JA/ET so bili bolj izraženi ob interakciji ogorčice in agrobakterije (N2B1, 12 dpi) kot ob prisotnosti agrobakterijskega seva C58 (C58, 12 dpi). Predvidevamo, da je rastlina ob napadu ogorčic aktivirala del poti JA, ki bi ji ali (1) pomagala v obrambi, ali pa (2) je posledica delovanja ogorčic, ki potrebujejo neokvarjeno signalizacijsko pot JA za uspešno parazitiranje (Bhattacharai in sod., 2008).

Poleg JA poti se je med interakcijo vključila tudi pot SA. Po dvanajstih dneh smo v obravnavanju N2B1 na ločenih koreninah zabeležili povečano izražanje gena *PR-1*. Izražanje s patogenezo povezanih proteinov iz družine *PR-1* je povezano z zaznavo splošnega stresa, z aktivacijo signalne poti SA in razvojem SAR (Sobczak in sod., 2005;

Uehara in sod., 2010). Čeprav je protein NIM1 ključen pri razvoju SAR (homolog NPR1 v *A. thaliana*), pa ni imel povečanega izražanja v N2B1. Nadzor nad delovanjem proteina NPR1 v *A. thaliana* se izvaja tudi na post-translacijski ravni (Derksen, 2013), kar najverjetneje velja tudi za homologe NPR1 v drugih rastlinskih vrstah.

Ugotavljamo, da je pri zaporednih okužbah pomemben vrstni red ter čas, ki preteče od ene okužbe do druge. Zanimivo je, da v obravnavanju N2B1 nismo zaznali spremenjenega izražanja preiskovanih genov vse do 12 dpi. Prve 4. dni so se geni izražali podobno kot v kontrolnih rastlinah, statistično neznačilno. Šele po 12. dneh smo zaznali povečano izražanje *PR-1* v obravnavanju N2B1 in zmanjšano izražanje *ACS6* v N1B2. Kaj se je dogajalo v vmesnem času ne vemo, vidimo pa dva različna sistemska odgovora rastline na enaka patogene, a inokulirana na korenine v različnem zaporedju. En tip interakcije je aktiviral pot SA (N2B1), drugi tip pa vplival na pot ET (N1B2). V obravnavanju N1B2 je bila interakcija med *A. tumefaciens* in *M. ethiopica* krajša, saj smo bakterije inokulirali na korenine šele 8 dni za ogorčico. Ali se tudi v N1B2 aktivira izražanje *PR* genov, ne vemo. Predvidevamo pa, da vloga SA najverjetneje ni bila velika, saj v lončnih poskusih prisotnost agrobakterije ni zmanjšala populacije *M. ethiopica* niti po 90-ih dneh.

Predvidevamo, da se ob interakciji *Agrobacterium-Meloidogyne* aktivirata obe signalizacijski poti, SA in JA, vendar je le pot SA odgovorna za zmanjšano razmnoževanje *M. ethiopica* na koreninah paradižnika. Opaženo rahlo povečano izražanje genov iz poti JA in hkrati povečano izražanje *PR-1* nakazuje na vpletenost obeh poti v odzivu rastline na interakcijo *Agrobacterium-Meloidogyne* v obravnavanju N2B1. Ker v večini primerov poti SA in JA delujeta antagonistično drug na drugo, predvidevamo, da je raven antagonizma med obema organizmoma manjša, kot bi bila ob samostojni aktivaciji ene ali druge poti. Foliarno tretiranje rastlin s SA ali njenimi analogi rahlo zmanjša razmnoževanje ogorčic koreninskih šišk na občutljivih gostiteljih (Branch in sod., 2004; Nahar in sod., 2011; Naserinasab in sod., 2011). V začetnih stopnjah napada ogorčic lahko lokalni hipersenzitivni odziv, ki ga posreduje SA, prepreči nastanek večjedrnih celic (Paulson in Webster, 1972). Večjo vlogo ima pot SA v odpornih gostiteljih, ki nosijo odpornostni gen *Mi-1*, in predstavlja ključen del obrambe (Branch in sod., 2004).

Po drugi strani pa je znana velika učinkovitost poti JA v omejevanju razmnoževanja ogorčic koreninskih šišk. Foliarni dodatek aktivnih derivatov jasmonske kisline znatno poveča odpornost paradižnika proti *M. incognita* (Cooper in sod., 2005). Vendar, ogorčice koreninskih šišk prav tako izrabljajo gostiteljevo signalizacijsko pot JA, da se lahko uspešno razmnožujejo (Bhattarai in sod., 2008). Na podlagi rezultatov z lončnih poskusov ne moremo reči, da smo z *A. tumefaciens* zmanjšali populacijo ogorčic enako učinkovito, kot to dosežemo z mikroorganizmi, ki aktivirajo od JA odvisen ISR odziv gostitelja (npr. z endofiti iz rodu *Rhizobium* (Martinuz in sod., 2013). Večjo vlogo v opaženem antagonizmu zato predpisujemo poti SA.

5.2 SKLEPI

Medsebojni odnos med agrobakterijami in vrstami *Meloidogyne* je bil predmet raziskav le maloštevilnih avtorjev. Pomanjkanje zanimanja predpisujemo zapisom o sinergističnem delovanju v naravnih pogojih, predvsem pa ni interakcija nikoli postala gospodarsko zanimiva. Zanimivi pa so opisi njunih odnosov, saj se vsi avtorji ne strinjajo z domnevo o sinergističnem delovanju, katero smo v tej nalogi postavili pod vprašaj.

Po pregledu zemlje s kmetijskih površin smo potrdili prisotnost vrst *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1. Noben od izolatov ni bil patogen, kar pojasnjuje nizko pojavnost raka koreninskega vratu na sadnem drevju. Raznolikost izolatov smo preučili na podlagi zaporedja gena *recA*, ki je med bakterijami ohranjeno in se uporablja kot taksonomski marker. Našli smo izjemno raznolikost sevov *A. tumefaciens* biovar 1 in jih uvrstili v genomske vrste G1 in G4, ki sta med najširše zastopanimi vrstami v tleh. Povezave med genomske vrste, vrsto kmetijske površine in geografskim položajem vzorčene parcele nismo našli. Identificirali pa smo 11 novih alelov *recA* trenutno lastnih samo sevom iz Slovenije. Raziskava je potrdila visoko genetsko raznolikost bakterij znotraj biovarja 1, ki ga prav zato delimo na genomske vrste.

Namen doktorske naloge je bilo testiranje domneve o sinergističnem odnosu med ogorčico koreninskih šišek *Meloidogyne ethiopica* in patogeno agrobakterijo *Agrobacterium tumefaciens* na gostiteljskih koreninah, o čemer poroča nekaj raziskovalnih del o interakciji *Meloidogyne* – *Agrobacterium*. V ta namen smo zasnovali lončne poskuse na občutljivi hibridni sorti paradižnika (Arawak F1, Syngenta) in ocenjevali vpliv obeh organizmov na rast rastline, medsebojni vpliv na razmnoževanje ogorčic ob prisotnosti patogenih agrobakterij, vpliv časovne razporeditve obeh partnerjev na koreninskem sistemu (agrobakterije pred ogorčico, sočasno z ogorčico in en teden po dodatku ogorčic) ter vpliv ogorčic na pojavnost bakterijskih tumorjev. Po zaključenem prvem razvojnem krogu *M. ethiopica* na koreninah paradižnika nismo opazili statistično značilnega vpliva na indekse rasti paradižnika. Statistično značilen vpliv smo ugotovili na višino nadzemnega dela rastline, ki pa se je po zaključenem drugem krogu izravnala z višino neokuženih rastlin. Nadzemni deli testnih rastlin so po treh mesecih imeli manjšo mokro in suho težo, kar kaže na izčrpavanje rastlin s strani bakterije in ogorčice. Ker rastline, glede na vizualni pregled, niso bile podvržene hujšemu fiziološkemu stresu niti po 45-ih niti po 90-ih dneh, predvidevamo, da so rastlino izčrpavali energijsko potratni obrambni mehanizmi (Denance in sod., 2013).

Sinergizem ali antagonizem? Verjetno oboje. Zaznali smo antagonistično delovanje *A. tumefaciens* na razmnoževanje *M. ethiopica* in manjši stimulativen učinek ogorčic na povečano maso tumorjev. Ogorčice koreninskih šišek *M. ethiopica* so se slabše razmnoževale na koreninah, ki smo jih dva dni prej inokulirali z agrobakterijami.

Zmanjšano razmnoževanje se je kazalo v zmanjšanem reprodukcijskem faktorju (Rf) ter zmanjšanem številu gal in jajčnih vrečk. S testi vstopa ličink v korenine smo zavrgli domnevo, da agrobakterije zmanjšajo vstop ličink *M. ethiopica* v korenine. Postavili smo novo domnevo o aktivaciji obrambnih poti v rastlini, ki zavirajo nastanek prehranjevalnih mest in posledično zmanjšajo število gal in jajčec. Domnevo smo potrdili na ločenih koreninah paradižnika, kjer je posredna prisotnost patogenih agrobakterij zmanjšala število gal na drugi strani korenin.

Odnos med *M. ethiopica* in *A. tumefaciens* je najbrž odvisen od pogojev, v katerih se partnerja znajdeti. Številčno je bilo bakterijskih tumorjev ob prisotnosti ogorčic na koreninah paradižnika manjše, a je bila njihova teža večja. Predvidevamo, da ogorčice pospešijo nastanek tumorjev, kot so to predvidevali tudi Dhanvantari in sod. (1975). Po 90-ih dneh so se ogorčice relativno bolje razmnoževale v obravnavanju, kjer smo k ogorčicam na korenine paradižnika naknadno dodali agrobakterije. Vendar, v tem obravnavanju se tumorji niso razvili. Glede na zasnovo poskusa bi v tem obravnavanju morale bakterije vstopiti v korenine prek poškodb, ki nastanejo ob vstopu ličink ogorčic. Poskus je pokazal, da rane nastale ob vstopu ličink niso dovoljšen signal za aktivacijo virulenčnih genov agrobakterije, če agrobakterije niso bile prisotne v času povečanega vstopa ličink v korenine. Eden od razlogov odsotnosti tumorjev bi lahko bila spremenjena koncentracija ET, saj se je na ločenih koreninah v tem obravnavanju (N1B2) manj izražal gen ACS6, ki je negativno uravnavan z ET.

Vpletenost poti salicilne kisline (SA) ali poti jasmonske kisline (JA) in etilena (ET) smo preverili prek izražanja nekaterih genov vpletenih v signalizacijske poti SA, JA in ET. Zasnovali smo poskus na ločenih koreninah paradižnika, da bi dobili podatke o sistemskem odzivu in ne o lokalnem dogajanju. V večini obravnavanj so imeli geni zmanjšano izražanje v primerjavi z neokuženimi koreninami v kontrolnih obravnavanjih. Najbolj je izstopalo povečano izražanje s patogenezo povezanega proteina 1 (gen *PR-1*) v obravnavanju N2B1, kjer smo z lončnimi poskusi dokazali antagonistični učinek agrobakterije na razmnoževanje *M. ethiopica*. Povečano izražanje *PR-1* je povezano z aktivacijo poti SA in razvojem sistemsko pridobljene imunosti (Van Loon in sod., 1998). Predvidevamo, da je aktivacija poti SA odgovorna za zmanjšano razmnoževanje ogorčic na koreninah okuženih z agrobakterijami. Ker izražanje *PR-1* ni bilo visoko, tudi pot SA ni bila polno aktivirana, kot npr. v odpornih sortah z genom *Mi-1*, zato tudi antagonizem ni imel biotičnega učinka. Mrtve celice patogenega seva agrobakterij in žive celice *E. coli* so prav tako zmanjšale populacijo *M. ethiopica* po 45-ih dneh, verjetno zaradi aktivacije s PAMP-sprožene imunosti (PTI), ki deluje prek poti SA (Melotto in sod., 2006; Seo in Matthews, 2012). Predvidevamo, da je v interakcijo vpletena tudi signalizacijska pot JA. Ob primerjavi obravnavanj N2B1 in C58 smo ugotovili povečano izražanje genov vpletenih v signalizacijsko pot JA. Znano je, da lahko s foliarnim dodatkom jasmonatov

znatno povečamo odpornost rastline proti ogorčicam koreninskih šišek, kot tudi, da ogorčice same aktivirajo del poti JA, da se lahko razmnožujejo (Bhattarai in sod., 2008).

Obramba rastline je dinamični sistem, ki se neprestano prilagaja. Ugotovili smo, da ne moremo na podlagi odziva na posamezne patogene predvideti odziv rastline na kombinacije patogenov. Še več, predvidevamo, da je odločilnega pomena zaporedje okužb. Že z lončnimi poskusi smo dokazali antagonistični vpliv predhodne okužbe korenin z agrobakterijami na razmnoževanje *M. ethiopica* oz. zanemarljiv vpliv agrobakterij na razmnoževanje ogorčic *M. ethiopica*, ki so že ustalile. Rezultati izražanja nekaterih genov, ki sodelujejo v signalizacijskih poteh obrambe v paradižniku, kažejo na relativno zmanjšano izražanje genov iz poti SA, JA in ET v obravnavanjih s posameznimi patogeni. Le ob interakciji obeh, *Agrobacterium* in *Meloidogyne*, smo zaznali povečano izražanje s patogenezo-povezanega proteina (PR-1). V taistem obravnavanju smo ob primerjavi z obravnavanjem C58 ugotovili relativno večje izražanje genov pod nadzorom JA. Čeprav delujeta poti SA in JA antagonistično ena z drugo, pa opazamo, da lahko v primeru interakcije z agrobakterijami in ogorčicami sodelujeta. Medtem ko pot SA, ki jo aktivirajo agrobakterije, zmanjša razmnoževanje ogorčic, pa pot JA, ki jo vključijo ogorčice, omogoča parazitiranje. Na podlagi rezultatov, odziv rastline na interakcijo *Agrobacterium* - *Meloidogyne* najbolj opiše model Katagiri in Tsuda (2010), ki pravi, da so sprva ob okužbi vse tri signalne poti SA, JA in ET šibko aktivirane. Sčasoma pa se prioriteta podeli eni obrambni poti, ki je v danih razmerah najbolj učinkovita.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Meloidogyne ethiopica je tropska vrsta, ki smo jo na slovenskih tleh odkrili leta 2003 na močno ogaljenih koreninah paradižnika (*Solanum lycopersicum* L.). To je bila hkrati prva najdba te vrste v Evropi (Širca in sod., 2004). Izjemna prilagodljivost vrste *M. ethiopica* se kaže v njeni sposobnosti preživetja na prostem v območjih s sredozemskim in celinskim podnebjem (Strajnar in sod., 2011). Njena prisotnost v slovenskih tleh nakazuje na možnost njene ustalitve in razširitve tudi v območjih Evrope s podobnimi podnebnimi razmerami kot v Sloveniji. Podobno kot ogorčice *Meloidogyne* spp. tudi patogena bakterija *Agrobacterium tumefaciens* povzroča galam podobne tvorbe na koreninskem vratu. Rak koreninskega vratu, katerega povzročitelj je vrsta *A. tumefaciens*, predstavlja problem širom po svetu (Kennedy in Alcorn, 1980; Pulawska, 2010). V Sloveniji bolezen trenutno ne povzroča večje škode. Povod za raziskavo so bila opažanja številnih avtorjev o povezavi med pojavnostjo raka koreninskega vratu ter ogaljenostjo korenin na sadnem drevju. Večina poroča o sinergističnem odnosu med *A. tumefaciens* in ogorčicami koreninskih šišč (Griffin, 1968; Orion in Zutra, 1971, 1982; Dhanvantari, 1975; Süle in sod., 1995; Rubio-Cabetas in sod., 2001), redki o antagonističnem (Fakhouri in sod., 1996). Eden od ciljev naloge je bilo ovrednotenje medsebojnega vpliva ob pogojih, kjer samostojno ne povzročata vidnih sprememb v vitalnosti gostiteljske rastline.

Z izolacijo bakterij *A. tumefaciens* biovar 1 iz vzorcev zemlje pobranih s kmetijskih površin po Sloveniji smo potrdili vsesplošno prisotnost nepatogenih agrobakterij v tleh. To bi lahko razložilo sporadično pojavljanje bolezni raka koreninskega vratu v Sloveniji. Z nadaljnjo okarakterizacijo na podlagi nukleinskega zaporedja gena za rekombinazo *recA* po protokolu Costechareyre in sod. (2010) smo seve uvrstili v genomske vrste G1 (62 %) in G4 (38 %). Odkrili smo tudi 11 novih *recA* alelov: 7 iz G1 in 4 iz G4. Vsa zaporedja gena *recA*, ki smo jih določili, smo oddali v zbirko GenBank (Aks. št. KC291939 - KC292007).

Medsebojni odnos med *A. tumefaciens* in *M. ethiopica* smo ovrednotili na koreninah paradižnika (*Solanum lycopersicum* L.) občutljivega za parazitiranje z ogorčicami koreninskih šišč. Korenine mladih sadik smo okužili z vodno suspenzijo slovenskega patogenega seva *A. tumefaciens* 06-424-7 (10^6 CFU/g) ter z jajčeci *M. ethiopica* (2000/rastlino). Časovno smo inokulacije razporedili v tri obravnavanja: (1) sočasno, (2) najprej bakterija potem ogorčica in (3) najprej ogorčica potem bakterija. V poskusih smo uporabili majhne velikosti inokulumov obeh partnerjev in zato pričakovali manjši vpliv na indekse rasti paradižnika. Izkazalo se je, da prisotnost *A. tumefaciens* in *M. ethiopica* ne vpliva bistveno na rast paradižnika 45 dpi, pač pa se znaki pričenjajo kazati po 90 dpi, kjer smo zabeležili povečano težo korenin in zmanjšano težo sveže in suhe teže zelenega dela rastline. Ugotovili smo, da prisotnost agrobakterije deluje antagonistično na razmnoževanje

ogorčice. V obravnavanju, kjer smo bakterije dodali dva dni pred ogorčicami, smo zabeležili 2,4-krat manjšo populacijo ogorčic ($p < 0,001$) 45 dpi. Vpliv na razmnoževanje je bila posledica manjšega števila gal in jajčnih vrečk, tudi ob 90 dpi. V vseh ostalih obravnavanjih bakterija ni vplivala na razmnoževanje ogorčice. Na ločenih koreninah paradižnika smo dokazali, da prisotnost *A. tumefaciens* ne vpliva na vstop infektivnih ličink *M. ethiopica* 8 in 12 dpi v korenine. S tehniko ločenih korenin smo pripravili tudi rastline paradižnika za ovrednotenje sistemskega odziva rastline na ogorčice in bakterije. Dokazali smo, da *A. tumefaciens* sproži v rastlini obrambni odgovor, ki ob naknadnem napadu *M. ethiopica* na drugi, fizično ločeni strani korenin, zmanjša število gal (45 dpi). Mrtve celice patogenega seva agrobakterij in žive celice *E. coli* JM109 so prav tako zmanjšale populacijo jajčec *M. ethiopica* po 45-ih dneh, verjetno zaradi aktivacije s PAMP-sprožene imunosti (PTI), ki deluje prek poti salicilne kisline (Melotto in sod., 2006; Seo in Matthews, 2012). Čeprav nekateri avtorji opažajo stimulativen vpliv ogorčic na nastanek tumorjev, mi nismo ugotovili statistično značilnih razlik v teži tumorjev med obravnavanji. Opazili smo ravno nasprotno, ogorčica *M. ethiopica* je preprečila nastanek tumorjev, če smo agrobakterije inokulirali na korenine, kjer so se ogorčice že ustalile. Prisotnost ran, povzročenih ob vstopu ličink v korenine, je najverjetneje pomemben signal za agrobakterije le v času povečanega vstopanja ličink v korenine.

Vpletenost obrambne poti rastline smo preverili prek izražanja nekaterih genov vpletenih v signalizacijske poti salicilne kisline (SA), jasmonske kisline (JA) in etilena. Zasnovali smo poskus na ločenih koreninah paradižnika, kjer odvzeti vzorec korenin ni bil v stiku niti z agrobakterijo (sev C58) niti z ogorčico (*M. ethiopica*). Vzorčili smo v treh časovnih točkah: 0, 4 in 12 dpi. Informacijo o izražanju tarčnih genov v koreninah smo pridobili z uporabo metode RT-qPCR (kemija SYBR Green I). Rezultate smo statistično obdelali s poenotenim Wilcoxon-Mann-Whitney testom (De Neve in sod., 2013). V obravnavanju, kjer smo z lončnimi poskusi dokazali antagonistični učinek agrobakterije na razmnoževanje *M. ethiopica* (agrobakterija inokulirana 2 dni pred ogorčico) smo v času 12 dpi ugotovili povečano izražanje s patogenezo povezanega proteina 1 (PR-1). Vemo, da je izražanje PR-1 povezano z aktivacijo poti SA in razvojem sistemsko pridobljene imunosti (Van Loon in sod., 1998). Predvidevamo, da je aktivacija poti SA odgovorna za zmanjšano razmnoževanje ogorčic na koreninah okuženih z agrobakterijami. Ob primerjavi obravnavanj smo ugotovili, da so se v obravnavanju, kjer smo bakterije dodali prve (N2B1), močnejše izražali geni vpleteni v signalizacijsko pot JA kot v kontrolnem obravnavanju s sevom C58. Čeprav delujeta poti SA in JA antagonistično druga na drugo, pa opazamo, da lahko v primeru interakcije z ogorčicami in agrobakterijami sodelujeta. Medtem ko pot SA, ki so jo aktivirale agrobakterije, zmanjša razmnoževanje ogorčic, pa pot JA, ki so jo vključile ogorčice, omogoča parazitiranje ogorčic na koreninah (Bhattarai in sod., 2008). Ugotavljamo, da na podlagi odziva na posamezne patogene ne moremo predvideti odziv rastline na kombinacije patogenov. Predvidevamo, da na izbiro obrambne poti odločilno vpliva zaporedje okužb.

6.2 SUMMARY

Meloidogyne ethiopica belongs to a tropical group of root-knot nematodes. Its presence in Europe was first detected in Slovenia in 2003 on heavily galled roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) grown in a greenhouse (Širca et al., 2004). *M. ethiopica* is highly resilient and can survive in soil under Mediterranean and Continental climate conditions (Strajnar et al., 2011). Its adaptability poses serious threat to areas in Europe with climate conditions similar to Slovenia's. Eventually, *M. ethiopica* could spread and establish in European soils. Similarly to root galls of *Meloidogyne* spp., the pathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens* causes neoplastic growth on the plant crown and roots. The crown gall disease caused by species of *Agrobacterium* spp. has a worldwide distribution and it causes major problems in fruit and nut production (Kennedy and Alcorn, 1980; Pulawska, 2010). In Slovenia we currently record no significant economic losses due to crown gall disease. The research motives for the study were numerous reports describing a positive relationship between crown gall and root gall incidence in fruit orchards. Many researchers observed a synergistic interaction between *A. tumefaciens* and root-knot nematodes (Griffin, 1968; Orion and Zutra, 1971, 1982; Dhanvantari, 1975; Süle et al., 1995; Rubio-Cabetas et al., 2001), but very few observed antagonism (Fakhouri et al., 1996). One of the main aims of the following study was re-evaluating interaction between *A. tumefaciens* and *Meloidogyne* sp. at inoculum pressures where they do not cause visible damage to plant host vitality when individually inoculated.

All of the isolated *A. tumefaciens* biovar 1 strains collected and isolated from agricultural soils of Slovenia were determined to be non-pathogenic. This finding could explain the low incidence of crown gall disease in Slovenia. Based on further strain characterization we classified the strains according to the recombinase *recA* gene sequence (Costechareyre et al., 2010). The strains were allocated to G1 (62 %) and G4 (38 %) genomic species groups. We also detected 11 new *recA* allele sequences; seven from G1 and four from G4. All determined *recA* gene sequences were deposited in GenBank database (Acc. No. KC291939 - KC292007).

Interaction between *M. ethiopica* and *A. tumefaciens* was evaluated on roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) hybrid (Arawak F1, Syngenta) susceptible to root-knot nematode injury. Inoculations were performed on the roots of 4-week old tomato seedlings growing in a mixture of sand and clay in climate-controlled conditions. We added inoculums of Slovenian pathogenic strain *A. tumefaciens* 06-424-7 with a concentration of 10^6 CFU/g substrate prepared in sterile water, and inoculums of surface sterilized *M. ethiopica* eggs (2000 eggs per plant). Inoculation of each pathogen was time-dependent according to three designed treatments: (1) simultaneously, (2) bacteria prior to nematode and (3) nematode prior to bacteria. We determined an antagonistic effect of agrobacteria on *M. ethiopica* reproduction. In treatments where *A. tumefaciens* was inoculated two days

prior to the *M. ethiopica* eggs we determined 2.4 reduction in final nematode egg population at 45 dpi ($p < 0,001$). Lower numbers of galls and egg masses on the roots reduced the reproduction factor Rf at 45 and 90 dpi. Bacteria *A. tumefaciens* had no significant effect on reproduction of *M. ethiopica* in all of the remaining treatments. Using a split-root technique we demonstrated a non-significant effect of a direct or indirect presence of *A. tumefaciens* on *M. ethiopica* infective juvenile penetration into the roots of tomato at 8 and 12 dpi.

Systemic plant response to agrobacteria and root-knot nematodes was evaluated in split-root pot trial on tomato host plants. The pathogenic *A. tumefaciens* inoculum activated a systemic plant immune response that resulted in reduced numbers of *M. ethiopica* galls on the other, from bacteria isolated, part of the roots at 45 dpi. The *M. ethiopica* egg population was also reduced at 45 dpi when heat-killed cells of pathogenic strain *A. tumefaciens* or live cells of *E. coli* JM109 were added. A PAMP-triggered immunity (PTI) that is dependent on salicylic acid pathway activation could be involved in the observed reduced *M. ethiopica* population (Melotto et al., 2006; Seo and Matthews, 2012). Even though some papers describe a stimulating influence of root-knot nematodes on crown gall formation, we did not determine statistically significant differences in tumour weight from different treatments, regardless of a relatively higher tumour weight when nematodes were present (NB: $129,5 \pm 40,4$ mg; N2B1: $102,7 \pm 49,2$ mg) comparing to control tumour weight (B: $59,5 \pm 19,7$ mg). On the other hand, the *M. ethiopica* nematodes prevented tumour induction when they had already established inside the roots and the agrobacteria inoculums were added later. The wounds created on juvenile penetration into the roots are likely an important signal for agrobacteria, but only in the time frame of juvenile penetration and not later. We used low concentrations for both studied organisms and therefore expected minimal effect on plant growth indices. The presence of both, *M. ethiopica* and *A. tumefaciens*, did not affect tomato growth at 45 dpi. The effects on tomato were determined after 90 dpi: the root weight of treated tomato plants was higher than the control root weight, and both dry and fresh weight of leafs and stems were reduced in treated plants.

Activation of systemic plant defence signalling pathway was evaluated by measuring gene expression of a few selected genes that are involved in either jasmonate (JA), ethylene (ET) or salicylate (SA) signalling pathway in tomato. We designed a split-root experiment on tomato roots and collected root samples that were not in a direct contact with *A. tumefaciens* (C58 strain) and root-knot nematode *M. ethiopica*. That way we ensured that only a systemic plant response of target genes in roots was measured. We sampled roots at three timepoints: 0, 4, and 12 dpi. For gene expression estimation we designed a reverse transcription (RT) quantitative real-time PCR (qPCR) using the chemistry of SYBR Green I. The reference genes of beta-tubulin (BTUB), elongation factor 1-alpha (EF1L), ubiquitin (UBI) and ribosomal protein 2 (RPL2) were used for data normalization. The target gene

expression was evaluated with unified Wilcoxon-Mann-Whitney test (De Neve et al., 2013) that calculates the probability of target gene up-regulation when comparing two independent treatment groups. In treatment where we determined antagonistic effect of agrobacteria on *M. ethiopica* reproduction in pot trials (bacteria inoculated two days prior to nematode), we determined a significant up-regulation of pathogenesis-related protein 1 gene (*PR-1*) at 12 dpi. In general, the up-regulation of *PR-1* is connected to activation of SA pathway and onset of systemic acquired immunity (Van Loon et al., 1998). We speculate that activation of SA pathway could be responsible for the determined lower reproduction of *M. ethiopica* on *A. tumefaciens*-infected roots. Comparing the probabilities of up-regulation between treatment N2B1 (strain C58 prior to nematode) and treatment C58 (only bacterial strain C58) we determined a higher gene expression of target genes involved in JA signalling pathway. Although SA and JA pathways antagonize each other, we observed a possible cooperation during *A. tumefaciens* and *M. ethiopica* interaction. The SA pathway was activated by agrobacteria and affected root-knot nematode reproduction, but the JA pathway which is essential for successful nematode parasitizing on host roots (Bhattarai et al., 2008) could simultaneously be activated during the interaction.

Our results demonstrate that plant immune response to pathogen combinations is different from plant response to individual plant pathogens. Due to complexity and cross-connections between hormonal signalling pathways we cannot predict which defence pathways the plant will activate in given conditions. We also speculate that sequential pathogen inoculations play an important part in decision making process of the plant defence.

7 VIRI

- Aballay E., Ordenes P., Mårtensson A., Persson P. 2013. Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 1: 137-145
- Abarca-Grau A.M., Penyalver R., Lopez M.M., Marco-Noales E. 2011. Pathogenic and non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* strains form biofilms on abiotic as well as on root surfaces. *Plant Pathology*, 60, 3: 416-425
- Adam M.A.M., Phillips M.S., Blok V.C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 56, 1: 190-197
- Agrios G.N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. London, Elsevier Academic Press: 922 str.
- Alconero R. 1980. Crown gall of peaches from Maryland, South Carolina, and Tennessee and problems with biological control. *Plant Disease*, 64: 835-838
- Ali M.A., Abbas A., Kreil D., Bohlmann H. 2013. Overexpression of the transcription factor RAP2.6 leads to enhanced callose deposition in syncytia and enhanced resistance against the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *BMC Plant Biology*, 13, 1: 47, doi: 10.1186/1471-2229-13-47: 17 str.
- Alkharouf N.W., Klink V.P., Chouikha I.B., Beard H.S., Macdonald M.H., Meyer S. 2006. Time-course microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Planta*, 224: 838-852
- Aloni R., Wolf A., Feigenbaum P., Avni A., Klee H.J. 1998. The never ripe mutant provides evidence that tumor-induced ethylene controls the morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls on tomato stems. *Plant Physiology*, 117: 841-849
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Anand A., Uppalapati S.R., Ryu C.M., Allen S.N., Kang L., Tang Y. 2008. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 146: 703-715
- Argueso C., Hansen M., Kieber J. 2007. Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth and Regulation*, 26: 92-105
- Arteca R.N., Arteca J.M. 2008. Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3019-3026
- Aryal S.K., Davis R.F., Stevenson K.L., Timper P., Ji P. 2011. Induction of systemic acquired resistance by *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* in cotton following separate and concomitant inoculations. *Journal of Nematology*, 43, 3-4: 160-165

- Audenaert K., Pattery T., Cornelis P., Hofte M. 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 15: 1147-1156
- Aujoulat F., Jumas-Bilak E., Masnou A., Sallé F., Faure D., Segonds C., Marchandin H., Teyssier C. 2011. Multilocus sequence-based analysis delineates a clonal population of *Agrobacterium* (*Rhizobium*) *radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) of human origin. *Journal of Bacteriology*, 193: 2608-2618
- Aydinli G., Mennan S., Devran Z., Širca S., Urek G. 2013. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato and cucumber in Turkey. *Plant Disease*, 97, 9: 1262
- Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97: 239-243
- Barcala M., Garcia A., Cabrera J., Casson S., Lindsey K., Favery B., Garcia-Casado G., Solano R., Fenoll C., Escobar C. 2010. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant Journal*, 61: 698-712
- Bar-Or C., Kapulnik Y., Koltai H. 2005. A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 181-192
- Bender C.L., Alarcon-Chaidez F., Gross D.C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 266-292
- Bhattacharai K.K., Atamian H.S., Kaloshian I., Eulgem T. 2010. WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. *The Plant Journal*, 63, 2: 229-240
- Bhattacharai K.K., Xie Q.G., Mantelin S., Bishnoi U., Girke T., Navarre D.A., Kaloshian I. 2008. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signalling pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 9: 1205-1214
- Bhattacharai K.K., Xie Q.-G., Pourshalimi D., Younglove T., Kaloshian I. 2007. *Coil*-dependent signaling pathway is not required for Mi-1-mediated potato aphid resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 276-282
- Bioconductor: Open source software for bioinformatics. Seattle, Fred Hutchinson Cancer Research Center.
<http://www.bioconductor.org/> (20.07.2015)
- Bleecker A.B., Kende, H. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review in Cell Developmental Biology* 16: 1-18
- Boller T., He S.Y. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324: 742-744
- Bolton M.D. 2009. Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 487-497

- Bonardi V., Dangl J.L. 2012. How complex are intracellular immune receptor signalling complexes? *Frontiers in Plant Science*, 3: 237
- Bouzar H., Ouadah D., Krimi Z., Jones J.B., Trovato M., Petit A., Dessaux Y. 1993. Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 1310–1317
- Branch C., Hwang C.-F., Navarre D.A., Williamson V.M. 2004. Salicylic acid is part of the *Mi-1*-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. *Molecular and Plant-Microbe Interactions*, 17: 351–356
- Brencic A., Angert E.R., Winans S.C. 2005. Unwounded plants elicit *Agrobacterium vir* gene induction and T-DNA transfer: transformed plant cells produce opines yet are tumour free. *Molecular Microbiology*, 57, 6: 1522-1531
- Brencic A., Winans S.C. 2005. Detection and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69: 155-194
- Brisbane P.G., Kerr A. 1983. Selective media for the three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 3: 425-431
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Wittwer C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55, 4: 611-622
- Byrd D.W. Jr, Kirkpatrick T., Barker K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143
- Carneiro R.M., Almeida M.R.A., Cofcewicz E.T., Magunacelaya J.C., Aballay E. 2007. *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitising *Vitis vinifera* and other crops in Chile. *Nematology*, 9, 5: 633-639
- Carneiro R.M., Almeida M.R.A., Quénéhervé P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2, 6: 645-654
- Carneiro R.M., Tigano M.S., Randig O., Almeida M.R.A., Sarah J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp.(Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, 6, 2: 287-298
- Cascales E., Christie P.J. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *National Reviews in Microbiology*, 1: 137-149
- Castagnone-Sereno P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity*, 96: 282-289
- Castagnone-Sereno P., Wajnberg E., Bongiovanni M., Leroy F., Dalmasso A. 1994. Genetic variation in *Meloidogyne incognita* virulence against the tomato *Mi* resistance gene: evidence from isofemale line selection studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 749–753
- Casteel C.L., Walling L.L., Paine T.D. 2006. Behaviour and biology of the tomato psyllid *Bactericerca cockerelli* in response to the *Mi-1.2* gene. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121: 67-72

- Chan Z. 2013. Proteomic responses of fruits to environmental stress. *Frontiers in Plant Science* 3: 311, doi: 10.3389/fpls.2012.00311: 10 str.
- Chateau S., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. 2000. Competence of *Arabidopsis thaliana* genotypes and mutants for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer: role of phytohormones. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1961-1968
- Chilton M.-D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263-271
- Ciardi J.A., Tieman D.M., Jones J.B., Klee H.B. 2001. Reduced expression of the tomato ethylene receptor gene Le ETR4 enhances the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14:487-495
- Cohen Y., Niderman T., Mosinger E., Fluhr R. 1994. β -aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 104, 1: 59-66
- Conceição I.L., Tzortzakakis E.A., Gomes P., Abrantes I., da Cunha M.J. 2012. Detection of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 3: 451-457
- Conrath U. 2011. Molecular aspects of defense priming. *Trends in Plant Science*, 16, 10: 254-531
- Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M.-A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne W., Zimmerli L., Mauch-Mani B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19: 1062-1071
- Cooper W.R., Jia L., Goggin L. 2005. Effects of jasmonate induced defences on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 1953-1967
- Costechareyre D., Rhouma A., Lavire C., Portier P., Chapulliot D., Bertolla F., Boubaker A., Dessaux Y., Nesme X. 2010. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. *Microbial Ecology*, 60, 4: 862-872
- Cubero J., Lastra B., Salcedo C.I., Piquer J., Lopez M.M. 2006. Systemic movement of *Agrobacterium tumefaciens* in several plant species. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 412-421
- D'Hondt S., Jorgensen B.B., Miller D.J., Batzke A., Blake R., Cragg B.A. 2004. Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science*, 306: 2216-2221
- Dababat A.E.F.A., Sikora R.A. 2007. Influence of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* 162 on *Meloidogyne incognita* attraction and invasion. *Nematology*, 9, 6: 771-776
- Danhorn T., Hentzer M., Givskov M., Parsek M.R., Fuqua, C. 2004. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 186, 14: 4492-4501

- Davis E.L., Hussey R.S., Baum T.J. 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology*, 20, 3: 134-141
- Davis E.L., Hussey R.S., Baum T.J., Bakker J., Schots A., Rosso M.-N., Abad P. 2000. Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 365-396
- Davis E.L., Hussey R.S., Mitchum M.G., Baum T.J. 2008. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 4: 360-366
- De Cleene M., De Ley J. 1976. The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42: 389-466
- De Meutter J., Tytgat T., Witters E., Gheysen G., van Onckelen H., Gheysen, G. 2003. Identification of cytokinin produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology*, 4: 271-277
- De Meyer G., Höfte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, 87, 6: 588-593
- De Meyer S.E., Van Hoorde de K., Vekeman B., Braeckman T., Willems A. 2011. Genetic diversity of rhizobia-associated with indigenous legumes in 496 different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 2384-2396
- De Neve J., Meys J. 2014. uWMWqPCR: unified Wilcoxon-Mann-Whitney test for qPCR data. R package version (navodila za uporabo R paketa).
- De Neve J., Thas O., Ottoy J.-P., Clement L. 2013. An extension of the Wilcoxon-Mann-Whitney test for analysing RT-qPCR data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 12, 3: 333-346
- Deeken R., Engelmann J.C., Efetova M., Czirjak T., Müller T., Kaiser W.M., Tietz O., Krischke M., Mueller M.J., Palme K., Dandekar T., Hedrich R. 2006. An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: A genome-wide approach. *The Plant Cell*, 18: 3617-3634
- Denance N., Sanchez-Vallet a., Goffner D., Molina A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant science*, 4: 155 doi: 10.3389/fpls.2013.00155: 12 str.
- Derksen H., Rampitsch C., Daayf F. 2013. Signalling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science*, 207: 79-87
- Dhanvantari B.N., Johnson P.W., Dirks V.A. 1975. The role of nematodes in crown gall infection of peach in southwestern Ontario. *Plant Disease Reporter*, 59, 2: 109-112
- Dharajiya D.T. 2015. Molecular biology of *Agrobacterium* infection. SlideShare, LinkedInCorporation: 59 str.
<http://www.slideshare.net/DARSHANDHARAJIYA1/molecular-biology-of-agrobacterium-infection> (maj 2015)
- Diedhiou P.M., Hallmann J., Oerke E.-C., Dehne H.-W. 2003. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. *Mycorrhiza*, 13, 4: 199-204

- Ditt R.F., Kerr K.F., de Figueiredo P., Delrow J., Comai L., Nester E.W. 2006. The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 6: 665-681
- Ditt R.F., Nester E.W., Comai L. 2001. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 19: 10954-10959
- Ditt R.F., Nester E.W., Comai L. 2005. The plant cell defense and *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 247: 207-213
- Dombrecht B., Xue G.P., Sprague S.J., Kirkegaard J.A., Ross J.J., Reid J.B., Kazan K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 19, 7: 2225-2245
- Douglas C.J., Halperin W., Nester E.W. 1982. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. *Journal of Bacteriology*, 152: 1265-1275
- Dubreuil G., Deleury E., Magliano M., Jaouannet M., Abad P., Rosso M.N. 2011. Peroxiredoxins from the plant parasitic root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, are required for successful development within the host. *International Journal for Parasitology*, 41, 3: 385-396
- Dubreuil G., Magliano M., Deleury E., Abad P., Rosso M.N. 2007. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytologist*, 176: 426-436
- Dunne W.M., Tillman J., Murray J.C. 1993. Recovery of a strain of *Agrobacterium radiobacter* with a mucoid phenotype from an immunocompromised child with bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 9: 2541-2543
- Durner J., Klessig D.F. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 24: 11312-11316
- Edreva A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Genetical and Applied Plant Physiology*, 31: 105-124
- Efetova M., Zeier J., Riederer M., Lee C.W., Stingl N., Mueller M., Hartung W., Hedrich R., Deeken R. 2007. A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145: 853-862
- El-Beltagi H.S., Kesba H.H., Abdel-Alim A.I., Al-Sayed A.A. 2011. Effect of root-knot nematode and two species of crown gall on antioxidant activity of grape leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10, 57: 12202-1210
- El-Fattah A., Dababat A., Sikora R.A. 2007. Induced resistance by the mutualistic endophyte, *Fusarium oxysporum* strain 162, toward *Meloidogyne incognita* on tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 9: 969-975
- Elling A.A. 2013. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*, 103, 11: 1092-1102

- El-Sherif A.G., Elwakil M.A. 1991. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Agrobacterium tumefaciens* or *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on tomato. *Journal of Nematology*, 23, 2: 239–242
- Elwakil M.A., Mohamed Z.A., El-Sherif A.G. 2003. Histopathological studies of eggplant roots as affected by IAA, *Agrobacterium tumefaciens* and *Meloidogyne incognita* alone and in combinations. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 2, 1: 1-9
- EPA: Biopesticides Fact Sheet. Washington, D.C. United States Environmental Agency. http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-114201_01-Apr-00.pdf (20.05.2015)
- Epstein L., Kaur S., McKenna J.R., Grant J.A., Olson W., Reil W.O. 2008. Crown gall can spread between walnut trees in nurseries and reduce future fields. *California Agriculture*, 62: 111-115
- Escobar C., Brown S., Mitchum G. 2011. Transcriptomic and proteomic analysis of the plant response to nematode infection. V: *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (eds). Dordrecht, Springer: 157-173
- Escobar M.A., Dandekar A.M. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8, 8: 380 – 386
- Esser R.P., Martinez A.P., Langdon K. R. 1968. Simultaneous occurrence of root-knot nematode and crown gall bacteria. *Disease Reporter*, 52, 7: 550-553
- Ezura H., Yuhashi K.-I., Yasuta T., Minamisawa K. 2000. Effect of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. *Plant Breeding*, 119: 75-79
- Fakhouri W.D., Khlaif H., Abu-Gharbeih W.I. 1996. Interaction between *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium tumefaciens* on tomato plants. *Pakistan Journal of Nematology*, 14, 1: 49-54
- Farag M.A., Zhang H., Ryn C.-M. 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 1007-1018
- Farrand S.K., Van Berkum P.B., Oger P. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 5: 1681-1687
- Felix G., Duran J.D., Volk, S., Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18: 265–276
- Fernández I., Merlos M., López-Ráez J.A., Martínez-Medina A., Ferrol N., Azcón C., Bonfante P., Flors V., Pozo M.J. 2014. Defense related phytohormones regulation in arbuscular mycorrhizal symbioses depends on the partner genotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 7: 791-803
- FITO-INFO: Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin. Ljubljana. Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Sektor za zdravje rastlin in rastlinski semenski material. http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=OrgCirs%5COpisiSkod/vsi/agr_viti.htm (20.05. 2015)

- Fowler J.H., Narváez-Vásquez J., Aromdee D.N., Pautot V., Holzer F.M., Walling L.L. 2009. Leucine aminopeptidase regulates defense and wound signaling in tomato downstream of jasmonic acid. *Plant Cell*, 21, 4: 1239-1251
- France R.A., Abawi G.S. 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* on selected bean genotypes. *Journal of Nematology*, 26, 4: 467-474
- Fujimoto T., Tomitaka Y., Abe H., Tsuda S., Futai K., Mizukubo T. 2011. Expression profile of jasmonic acid induced genes and the induced resistance against the root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1084-1097
- Fuller V.L., Lilley C.J., Atkinson H.J., Urwin P.E. 2007. Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology*, 8: 595-609
- Gafni Y., Icht M., Rubinfeld B.-Z. 1995. Stimulation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence with indole-3-acetic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 98-101
- Gal T.Z., Aussenberg E.R., Burdman S., Kapulnik Y., Koltai H. 2006. Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root-knot nematode parasitism in tomato. *Planta*, 224: 155-162
- Gaspar Y.M., Nam J., Schultz C.J., Lee L.Y., Gilson P.R., Gelvin S.B., Bacic A. 2004. Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (*rat1*) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. *Plant Physiology*, 135, 4: 2162-2171
- Gassmann W., Bhattacharjee S. 2012. Effector-triggered immunity signalling from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 7: 862-868
- Gelvin S.B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 223-256
- Gelvin S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the »gene-jockeying« tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 16-37
- Gheysen G., Fenoll C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 191-219
- Gheysen L., Jones J.T. 2006. Molecular aspects of plant-nematode interactions. V: *Plant nematology*. Perry R.N., Moens M. (eds.). Wallingford, CAB International: 234-254
- Ghiran I., Klickstein L.B., Nicholson-Weller A. 2003. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 21024-21031
- Giazer I., Orion D., Apelbaum A. 1983. Interrelationships between ethylene production, gall formation, and root-knot nematode development in tomato plants infected with *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 15, 4: 539-544

- Glazebrook J., Chen W.J., Estes B., Chang H.S., Nawrath C., Metraux J.-P., Zhu T., Katagiri F. 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal*, 34: 217-228
- Gleason C.A., Liu Q.L., Williamson V.M. 2008. Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene *Mi-1* leads to acquisition of virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 576-585
- Gohlke J., Deeken R. 2014. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*, 5: 155, doi: 10.3389/fpls.2014.00155: 11 str.
- Goverse A., de Almeida E.J., Verhees J., van der Krol S., Helder J., Gheysen, G. 2000. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Molecular Biology*, 43: 747-761
- Gray J., Gelvin S.B., Meilan R., Morris R.O. 1996. Transfer RNA is the source of extracellular isopentenyladenine in a Ti-plasmidless strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 110: 431-438
- Griffin G.D., Anderson J. L., Jorgenson E. C. 1968. Interaction of *Meloidogyne hapla* and *Agrobacterium tumefaciens* in relation to raspberry cultivars. *Disease Reporter*, 52, 6: 492-493
- Grunewald W., van Noorden G., van Isterdael G., Beeckman T., Gheysen G., Mathesius U. 2009. Manipulation of auxin transport in plant roots during rhizobium symbiosis and nematode parasitism. *The Plant Cell*, 21: 2553-2562
- Hall A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98
- Hallmann J., Davies K.G., Sikora R. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. V: Root-knot nematodes. Perry R.N., Moens M., Starr J.L (eds.). Wallingford, CAB International: 380-411
- Hallmann J., Quadts-Hallmann A., Miller W.G., Sikora R.A., Lindow S.E. 2001. Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Biological Control*, 91, 4: 415-422
- Hamamouch N., Li C.Y., Seo P.J., Park C.M., Davis E.I. 2011. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Molecular Plant Pathology*, 12: 355-364
- Hellemans J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8, 2: R19
- Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A., Bleeker, A.B. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 5: 553-564
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins Comp.
- Holterman M., van der Wurff A., van der Elsen S., van Megen H., Bongers T., Holovachov O., Bakker J., Helder J. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep

- phylogenetic relationship among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 1792-1800
- Hood E.E., Fraley R.T., Chilton M.-D. 1987. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiology*, 83: 529-534
- Huang G., Gao B., Maier T., Allen R., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S. 2003. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 5: 376-381
- Huang G.Z., Dong R.H., Allen R., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S. 2006. A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 463-470
- Hussey R.S., Barker K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique, *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028
- Hutangura P., Jones M.G.K., Heinrich T. 1998. Optimisation of culture conditions for *in vitro* infection of tomato with the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Australasian Plant Pathology*, 27: 84-89
- Hutangura P., Mathesius U., Jones M.G.K., Rolfe B.G. 1999. Auxin accumulation is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of flavonoid pathway. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 221-231
- Hwang H.-H., Wang M.-H., Lee Y.-L., Tsai Y.-L., Li Y.-H., Yang F.-J. in sod. 2010. *Agrobacterium*-produced and exogenous cytokinin-modulated *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular Plant Pathology*, 11: 677-690
- Ibrahim I.K.A., Mokbel A.A., Hammad S.E. 2014. Host suitability of some solanaceous plant cultivars to the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 3, 5: 136-140
- Ithal N., Recknor J., Nettleton D., Hearne L., Maier T., Baum T.J. 2007a. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 293-305
- Ithal N., Recknor J., Nettleton D., Maier T., Baum T.J., Mitchum M.G. 2007b. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 510-525
- Jammes F., Lecomte P., de Almeida-Engler J., Bitton F., Martin-Magniette M.L., Renou J.P., Abad P., Favery B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 44: 447-458
- Jaubert S., Ledger T.N., Laffaire J.B., Piotte C., Abad P., Rosso M.-N. 2005a. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121, 2: 205-211
- Jaubert S., Milac A.L., Petrescu J., de Almeida-Engler J., Abad P., Rosso M.N. 2005b. In planta secretion of calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 18: 1277-1284

- Jia S.R., Kumar P.P., Kush A. 1996. Oxidative stress in *Agrobacterium*-induced tumors on *Kalanchoe* plants. *The Plant Journal*, 10, 3: 545-551
- Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329
- Jones J.T., Furlanetto C., Kikuchi T. 2005. Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as a driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes. *Nematology*, 7: 641-646
- Jones M.G.K., Goto D.B. 2011. Root-knot nematodes and giant cells. V: *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (eds.). Dordrecht, Springer: 83-100
- Kanehisa M., Goto S. 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28: 27-30
- Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42: 199-205
- Kaplan D.T., Keen N.T. 1980. Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. *Revue de Nématologie*, 3: 123-134
- Karimi M., Van Montagu M., Gheysen G. 2000. Nematodes as vectors to introduce *Agrobacterium* into plant roots. *Molecular Plant Pathology*, 1, 6: 383-387
- Karssen G. 2002. The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Koninklijke Brill NV, Leiden, Nizozemska: 157 str.
- Karssen G., Blok R.J., van Aelst A.C., van der Beld I., Kox L.F.F., Kerthals G., Molendijk L., Zijlstra C., van Hoof R., Cook R. 2004. Description of *Meloidogyne minor* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode associated with yellow patch disease in golf courses. *Nematology*, 6: 59-72
- Katagiri F., Tsuda K. 2010. Understanding the plant immune system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 12: 1531-1536
- Katsir L., Schillmiller A.L., Staswick P.E., He S.Y., Howe G.A. 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 19: 7100-7105
- Keiwnick S., Sikora R.A. 2006. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control*, 38: 179-187
- Kennedy B.W., Alcorn S.M. 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 64: 674-676
- Kerr A. 1992. The genus *Agrobacterium*. V: *The prokaryotes*. Volume III. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 2214-2235
- Kerstens K., De Ley J. 1984. *Agrobacterium* Conn. 1942. V: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Krieg, Williams & Wilkins: 244-245
- Kinkema M., Fan W., Dong X. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell*, 12: 2339-2350

- Knoester M., Pieterse C.M.J., Bol J.F., Van Loon L.C. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 720-727
- Kohl M. 2007. SLqPCR: Functions for analysing of real-time quantitative PCR data at SIRS-Lab GmbH. Jena, SIRS-Lab GmbH (navodila za uporabo R paketa).
- Krimi Z., Petit A., Mougél C., Dessaux Y., Nesme X. 2002. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3358-3365
- Kyndt T., Nahar K., Haegeman A., De Vleeschauwer D., Hofte M., Gheysen G. 2012. Comparing systemic defence-related gene expression changes upon migratory and sedentary nematode attack in rice. *Plant Biology*, 14: 73-82
- Lalam N. 2007. Statistical inference for quantitative polymerase chain reaction using a hidden markov model: a Bayesian approach. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 6, 10: 1544 – 6115
- Lam S., Lam B., Harrison L., Strobel G. 1984. Genetic information of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* determines host specificity. *Plant Science Letters*, 34: 345-352
- Lamovšek J., Urek G., Trdan S. 2013. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the pests. *Acta agriculturae Slovenica*, 101, 2: 263-275
- Lassalle F., Campillo T., Vial L., Baude J., Costechareyre D., Chapulliot D., Shams M., Abrouk D., Lavire C., Oger-Desfeux C., Hommais F., Gueguen L., Daubin V., Muller D., Nesme X. 2011 Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biology Evolution*, 3:762-781
- Lawton K.A., Weymann K., Friedrich L., Vernooij E., Uknes S., Ryals J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 863-870
- Ledger T.N., Jaubert S., Bosselut N., Abad P., Rosso M.N. 2006. Characterization of a new β -1, 4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. *Gene*, 382: 121-128
- Lee C.W., Efetova M., Engelmann J.C., Kramell R., Wasternack C., Ludwig-Müller J., Hedrich R., Deeken R. 2009. *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21: 2948-2962
- Leon-Reyes A., Du Y.J., Koornneef A., Proietti S., Korbes A.P., Memelink J. in sod. 2010. Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 187-197
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 4: 583-593
- Li J., Brader G., Palva E.T. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, 16: 319-331

- Li Q., Guo R.-J., Li S.-D., Li S.-F., Wang H.-Q. 2015. Determination of tumorigenic *Agrobacterium* density in soil by real-time PCR assay and its effect on crown gall disease severity. *European Journal of Plant Pathology*, 142: 25-36
- Li Y., Fester T., Taylor C.G. 2008. Transcriptomic analysis of nematode infestation. *Plant Cell Monographs*, 36: 189-220
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452
- Lin J.Y., Fan R., Wan X.R., Chang Y.-Y., Wang N.N. 2007. Structural analysis of the promoter of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 gene (*Le-ACS6*). *Chinese Science Bulletin*, 52, 9: 1217-1222
- Lin Z., Zhong S., Grierson D. 2009. Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, 60, 12: 3311-3336
- Lindström K., Young J.P.W. 2011. International Committee on Systematics of Prokaryotes-Minutes: Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 3089-3093
- Lippincott B.B., Whatley M. H., Lippincott J.A. 1977. Tumor induction by *Agrobacterium* involves attachment of the bacterium to a site on the host plant cell wall. *Plant Physiology*, 59, 3: 388-390
- Lippincott J.A., Lippincott B.B., Starr M.P. 1983. The genus *Agrobacterium*. V: The procaryotes: a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Starr M.P. (ed.). New York, Springer-Verlag: 842-845
- Liu P., Nester E.W. 2006. Indolacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 4658-4662
- Liu Y., Zhang S. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 12: 3386-3399
- Lorenzo O., Piqueras R., Sanches-Serrano J.J., Solano R. 2003. Ethylene response factor 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15: 165-178
- Løvdaal T., Lillo C. 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry*, 387: 238-242
- Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 6: 3140-3145
- Mantelin S., Bhattarai K.K., Jhaveri T.Z., Kaloshian I. 2013. *Mi-1*-mediated resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato may not rely on ethylene but hormone perception through ETR3 participates in limiting nematode infection in a susceptible host. *PLoS One*, 8, 5: e63281, doi:10.1371/journal.pone.0063281: 8 str.

- Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P., Willems A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 200-214
- Martinuz A., Schouten A., Sikora R.A. 2013. Post-infection development of *Meloidogyne incognita* on tomato treated with the endophytes *Fusarium oxysporum* strain Fo162 and *Rhizobium etli* strain G12. *BioControl*, 58: 95-104
- McClure M.A., Kruk T.H., Misaghi I. 1973. A method for obtaining quantities of clean *Meloidogyne* eggs, *Journal of Nematology*, 5: 230
- Melillo M.T., Leonetti P., Bongiovanni M., Castagnone-Sereno P., Bleve-Zacheo T. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. *New Phytologist*, 170, 3: 501-512
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126: 969–980
- Michel M.F., Brasileiro A.C., Depierreux C., Otten L., Delmotte F., Jouanin L. 1990. Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 3537- 3545
- Mishina T.E., Zeier J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 50: 500–513
- Moens M., Perry R.N., Starr J.L. 2009. *Meloidogyne species*- a diverse group of novel and important plant parasites. V: Root-knot nematodes. Perry R.N., Moens M., Starr J.L. (eds). Wallingford, CABI International: 1-17
- Moffat C.S., Ingle R.A., Wathugala D.L., Saunders N.J., Knight H., Knight M.R. 2012. ERF5 and ERF6 play a redundant roles as positive regulators of JA/ET-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 7, 4: e35995, doi:10.1371/journal.pone.0035995: 11 str.
- Mougel C., Thioulouse J., Perrière G., Nesme X. 2002. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2: 573-586
- Mukhtar T., Kayani M.Z., Hussain M.A. 2013. Response of selected cucumber cultivars to *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 44. 13-17
- Mur L.A.J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140: 249-262
- Nahar K., Kyndt T., De Vleeschauwer D., Hofte M., Gheysen G. 2011. The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiology*, 157: 305-316

- Nakatsuka A., Murachi S., Okunishi H., Shiomi S., Nakano R., Kubo Y., Inaba A. 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology*, 118: 1295–1305
- Nandi B., Sukul N.C., Banerjee N., Sengupta S., Das P., Babu S.P.S. 2002. Salicylic acid enhances resistance in cowpea against *Meloidogyne incognita*. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 39–44
- Naserinasab F., Sahebani N., Etebarian H.R. 2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on tomato. *African Journal of Food Science*, 5, 3: 276–280
- Naz I., Palomares-Rius J. E., Saifullah, Blok V., Khan M. R., Ali S., Ali S. 2012. *In vitro* and *in planta* nematicidal activity of *Fumaria parviflora* (*Fumariaceae*) against the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Pathology*, 62, 4: 943–952
- Nesme X., Michel M.F., Digat B. 1987. Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus* L. from a single nursery. *Applied Environmental Microbiology*, 53: 655–659
- New P.B., Kerr A. 1972. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *Journal of Applied Bacteriology*, 35: 279–287
- Nicol J.M., Turner S.J., Coyne D.L., Den Nijs L. 2011. Current nematode threats to world agriculture. V: Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (eds.) London, Springer: 21–43
- Nigh E.L. 1966. Incidence of crown gall infection in peach as affected by the Javanese root knot nematode. *Phytopathology*, 56: 150
- Nolan T. 2006. Getting started – the basics of setting up a qPCR assay. V: A –Z of quantitative PCR. Bustin S.A. (ed.). La Jolla, IUL Biotechnology Series, International University LINE: 527–544
- Nombela G., Williamson V.M., Muñiz M. 2003. The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 16: 645–649
- Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunology Reviews*, 198: 249–266
- Ogalllo J.L., McClure M.A. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematodes in tomato. *Phytopathology*, 86, 5: 498–501
- Oka Y., Mizukubo T. 2009. Tomato culture filtrate stimulates hatching and activity of *Meloidogyne incognita* juveniles. *Nematology*, 11, 1: 51–61
- Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Yaniv Z., Spiegel Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*, 90: 710–715

- Oluwafemi S., Dewhurst S.Y., Veyrat N., Powers S., Bruce T.J., Caulfield J.C., Birkett M.A. 2013. Priming of production in maize of volatile organic defence compounds by the natural plant activator cis-jasmone. *PLoS one*, 8, 6: e62299, doi:10.1371/journal.pone.0062299: 7 str.
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.L., Thonart P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* 9: 1084–1090
- Orion D., Zutra D. 1971. The effect of the root-knot nematode on the penetration of crown gall bacteria into almond roots. *Israel Journal of Agricultural Research*, 21: 27-29
- Orozco-Cárdenas M.L., Narváez-Vásquez J., Ryan C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell Online*, 13, 1: 179-191
- Pajerowska-Mukhtar K.M., Emerine D.K., Mukhtar M.S. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in Plant Science*, 18, 7: 1360-1385
- Pajerowska-Mukhtar K.M., Wang W., Tada Y., Oka N., Tucker C.L., Fonseca J.P., Dong Y. 2012. The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Current Biology*, 22: 103-112
- Palmer A.G., Gao R., Maresh J., Erbil W.K., Lynn D.G. 2004. Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation. *Annual Review in Phytopathology*, 42: 439-464
- Pan Y., Seymour G.B., Lu C., Hu Z., Chen X. Chen G. 2012. An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Reports*, 31, 2: 349-360
- Panday D., Schumann P., Das S.K. 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 2632-2639
- Pastor V., Luna E., Mauch-Mani B., Ton J., Flors V. 2012. Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 46-56
- Paulson R.E., Webster J.M. 1972. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiology and Plant Pathology*, 2: 227–234
- Peng H.P., Lin T.Y., Wang N.N., Shih M.C. 2005. Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis* during hypoxia. *Plant Molecular Biology*, 58: 15-25
- Penninckx I.A.M.A., Thoma B.P.H.J., Buchala A., Metraux J.-P., Broekaert W.F., 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 2103-2113
- Perry R.N., Moens M. 2011. Introduction to plant-parasitic nematodes: modes of parasitism. V: Genomics and molecular genetics of plant–nematode interactions. Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (eds.). Heidelberg, Springer Science + Bussines Media: 3-20 str..

- Perry R.N., Wasemael W.M.L. 2008. Host plant effects on hatching of root-knot nematodes. *Russian Journal of Nematology*, 16: 1-5
- Persello-Cartieaux F., Nussaume L., Robaglia C. 2003. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, 26, 2: 189–199
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: e45, doi:10.1093/nar/29.9.e45: 6 str.
- Pieterse C.M., Van Der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Van Wees S.C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cellular and Developmental Biology*, 28: 489-521
- Pieterse C.M.J., Ton J., Van Loon L.C. 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet*, 3: 1-8
- Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 456-464
- Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Ton J., Parchmann S., Mueller M.J., Buchala A.J., Metraux J.-P., Van Loon L.C. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 57: 123-134
- Pieterse C.M.J., van Wees S., van Pelt J.A., Knoester M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek P.J., Van Loon L.C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1571-1580
- Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Hoffland E., Van Pelt J.A., Van Loon L.C: 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8: 1225-1237
- Pitzschke A., Hirt H. 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29: 1021–1032
- Plantard O., Valette S., Gross M.F. 2007. The Root-knot nematode producing galls on *Spartina alterniflora* belongs to the genus *Meloidogyne*: Rejection of *Hypsoperine* and *Spartonema* spp. *Journal of Nematology*, 39, 2: 127-132
- Poncet C., Antonini C., Bettachini A., Hericher D., Pionnat S., Simonini L., Dessaux Y., Nesme X. 1996. Impact of the crown gall disease on vigour and yield of rose trees. *Acta Horticulturae*, 424: 221-225
- Portier P., Fisher-Le Saux M., Mougél C., Lerondelle C., Chapulliot D., Thioulouse J., Nesme X. 2006. Identification of genomic species of *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 7123-7131
- Portillo M., Linsey K., Casson S., Garcia-casado G., solano R., Fenoll C., Escobar C. 2009. Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. *Molecular Plant Pathology*, 10: 523-535

- Pozo M.J., Van der Ent S., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2008. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Pathology*, 180: 511-523
- Pozo M.J., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2005. Jasmonates – signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23: 211-222
- Prithiviraj B., Bais H.P., Weir T., Suresh B., Najjarro E.H., Dayakar B.V., Vivanco J.M. 2005. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 73, 9: 5319-5328
- Pulawska J., Willems A., De Meyer S.E., Süle S. 2012. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 4: 215-220
- Pulawska J. 2010. Crown gall of stone fruits and nuts – economic significance and diversity of its causal agent tumorigenic *Agrobacterium* spp.. *Journal of Plant Pathology*, 92: 87-98
- Pulawska J., Kalužna M. 2012. Phylogenetic relationship and genetic diversity of *Agrobacterium* spp. isolated in Poland based on *gyrB* gene sequence analysis and RAPD. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 379-390
- Pulawska J., Malinowski T., Sobiczewski P. 1998. Diversity of plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* isolated from fruit trees in Poland. *Journal of Phytopathology*, 146: 465-468
- Pulawska J., Willems A., Sobiczewski P. 2006. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:470-479
- Puthoff D.P., Nettleton D., Rodermeel S.R., Baum T.J. 2003. *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant Journal*, 33: 911-921
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0
<http://www.R-project.org> (20. 05.2015)
- Radwan M.A., Farrag S.A.A., Abu-Elamayem M.M., Ahmed N.S. 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56: 58-62
- Raio A., Peluso R., Nesme X., Zoina A. 2004. Chromosomal and plasmid diversity of *Agrobacterium* strains isolated from *Ficus benjamina* tumors. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 163-174
- Ramsay K., Jones M.G.K., Wang Z. 2006. Laser capture microdissection: a novel approach to microanalysis of plant-microbe interactions. *Molecular Plant Pathology*, 7: 429-435
- Ramsay K., Wang Z., Jones M.G.K. 2004. Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cell induced by root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 5: 587-592
- Razavi Darbar S., Lakzian A. 2007. Evaluation of chemical and biological consequences of soil sterilization methods. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 5, 2: 87-91

- Rhouma A., Boubaker A., Nesme X., Dessaux Y. 2006. Plasmid and chromosomal diversity of a Tunisian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 1: 73-84
- Robert-Seilanianantz A., Grant M., Jones J.D.G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Reviews in Phytopathology*, 49: 317-343
- Robinette D., Matthysse A.G. 1990. Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*, 172: 5742-5749
- Robinson A.F., Perry R.N. 2006. Behaviour and sensory perception. V: Plant nematology. Perry R.N., Moens M. (eds.) Wallingford, CABI International: 210-233
- Rubio-Cabetas M.J., Minot J.C., Voisin R., Esmenjaud D. 2001. Interaction of root-knot nematodes (RKN) and the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* in roots of *Prunus cerasifera*: evidence of the protective effect of the *Ma* RKN resistance genes against expression of crown gall symptoms. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 433-441
- Rutledge R.G., Cote C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31, 16: e93, doi: 10.1093/nar/ngn093: 6 str.
- Sahebani N., Hadavi N.S., Zade F.O. 2011. The effects of β -amino-butyric acid on resistance of cucumber against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2: 443-450
- Saïdi S., Mnasri B., Mhmd R. 2011. Diversity of nodule-endophytic agrobacteria-like strains associated with different grain legumes in Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 7: 524-530
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (eds.). 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sardesai N., Lee L.-Y., Chen H., Yi H., Olbricht G.R., Stirnberg A. 2013. Cytokinins secreted by *Agrobacterium* promote transformation by repressing a plant Myb transcription factor. *Science Signaling*, 6: ra100, doi: 10.1126/scisignal.2004518: 12 str.
- Schaff J.E., Nielsen D.M., Smith C.P., Scholl E.H., Bird D.McK. 2007. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in *Mi*-mediated nematode resistance. *Plant Physiology*, 144: 1079-1092
- Schroth M.N., Weinhold A.R., McCain A.H., Hildebrand D.C., Ross N. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia* 40: 537-552
- Schweizer P., Buchala A., Metraux J.-P. 1997. Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiology*, 115: 61-70
- Schwessinger B., Ronald P.C. 2012. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual Review in Plant Biology*, 63: 451-482
- Semblat J.-P., Rosso M.-N., Hussey R.S., Abad P., Castagnone-Sereno P. 2001. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the

- root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 1: 72-79
- Seo S., Matthews K.R. 2012. Influence of the plant defense response to *Escherichia coli* O157: H7 cell surface structures on survival of that enteric pathogen on plant surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 16: 5882-5889
- Seyfferth C., Tsuda K. 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, 5: e697, doi:10.3389/fpls.2014.00697: 10 str.
- Shah J., Zeier J. 2013. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4: 30, doi:10.3389/fpls.2013.00030: 16 str.
- Shams M., Vial L., Chapulliot D., Nesme X., Lavire C. 2013. Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using *recA*-based PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 5: 351-358
- Shankar T., Paravaj M., Umamaheswari K., Prabhu D., Baskaran S. 2011. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Academic Journal of Entomology*, 4, 3: 114-117
- Shimoda N., Toyoda-Yamamoto A., Nagamine J., Usami S., Katayama M., Sakagami Y., Machida Y. 1990. Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87: 6684-6688
- Shokoohi E., Kheiri A., Etebarian H.R., Roostaei A. 2004. Interactions between root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and Fusarium wilt disease, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in different varieties of melon. *Communications in Agriculture and Applied Biological Sciences*, 69, 3: 387-391
- Siddiqui I.A., Shaukat S.S. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Journal of Phytopathology*, 152: 48-54
- Siddiqui M.A., Shaukat S.S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1615-1623
- Siddiqui Z.A., Baghel G., Akhtar M.S. 2007. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 3: 435-441
- Sijmons P.C., Grundler F.M.W., von Mende S., Burrows P.R., Wyss U. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant parasitic nematodes. *Plant Journal*, 1: 245-254
- Sobczak M., Avrova A., Jupowicz J., Phillips M.S., Ernst K., Kumer A. 2005. Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance *Hero* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 158-168

- Son G.H., Wan J., Kim H.J., Nguyen X.C., Chung W.S., Hong J.C., Stacey G. 2012. Ethylene-responsive element-binding factor 5, ERF5, is involved in chitin-induced innate immunity response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1: 48-60
- Song W., Ma X., Tan H., Zhou J. 2011. Absciscic acid enhances resistance to *Alternaria solani* in tomato seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 7: 693-700
- Speijer P.R., De Waele D., Fogain R. 1997. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. Vol. 1. Inibap Technical Guidelines. IITA: 48 str.
- Spiegel Y., McClure M.A. 1995. The surface coat of plant-parasitic nematodes: chemical composition, origin, and biological role—a review. *Journal of Nematology*, 27, 2: 127-134
- Spoel S.H., Dong X. 2008. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host & Microbe*, 3, 6: 348-351
- Spoel S.H., Mou Z., Tada Y., Spivey N.W., Genschik P., Dong X. 2009. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137: 860-872
- Stachel S.E., Zambryski P.C. 1985. VirA and VirG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell*, 46: 325-333
- Stražnar P. 2012. Bionomija, virulenca in genetska karakterizacija ogorčice *Meloidogyne ethiopica* Whitehead (Tylenchida: Meloidogynidae) ter njen vpliv na fiziološke procese v rastlini. Doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana: 61 str.
- Stražnar P., Širca S., Knapič M., Urek G. 2011. Effect of Slovenian climatic conditions on the development and survival of root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 81-88
- Stražnar P., Širca S., Urek G., Šircelj H., Železnik P., Vodnik D. 2012. Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 49-57.
- Süle S., Lehoczy J., Jenser G., Nagy P., Burr T.J. 1995. Infection of grapevine roots by *Agrobacterium vitis* and *Meloidogyne hapla*. *Journal of Phytopathology*, 143: 169-171
- Süss J., Schubert K., Sass H., Cypionka H., Overmann J., Engelen B. 2006. Widespread distribution and high abundance of *Rhizobium radiobacter* within Mediterranean subsurface sediments. *Environmental Microbiology*, 8: 1753-1763
- Šabec-Paradiž M., Koruza B., Pečar-Fonović U., Škerlevaj V., Topolovec A., Urek G. 2002. *Agrobacterium* in grapevine nursery production. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Otočec, 31.1. do 2.2. 2002. Ljubljana: 203-205
- Širca S., Stražnar P., Knapič M., Žibrat U., Urek G. 2014. Modelling of temperature dependent development of tropical root-knot nematode species. V: Proceedings [of the] 6th International Congress of Nematology : ensuring the future of nematology by student participation from developing nations relying on experience and increasing living standards by going back to basics : 4-9 May 2014. Daneel M. (ed.). Cape Town, Cape Sun: 142

- Širca S., Urek G. 2005. Ogorčice koreninskih šišk *Meloidogyne* spp. v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 7. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče, 8.-10. 03 2005: 353-355
- Širca S., Urek G., Karssen, G. 2004. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato in Slovenia. Plant disease, 88: 680
- Tandingan De Ley I., De Ley P., Vierstraete A. Karssen G., Moens M., Vanfleteren J. 2002. Phylogenetic analysis of *Meloidogyne* small subunit rDNA. Journal of Nematology, 34: 319-327
- Tefft P.M., Bone L.W. 1984. Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. Journal of Chemical Ecology, 10, 2: 361-372
- Teyssier-Cuvelle S., Oger P., Mougel C., Groud K., Farrand S.K., Nesme X. 2004. A highly selectable and highly transferable Ti plasmid to study conjugal host range and Ti plasmid dissemination in complex ecosystems. Microbial Ecology, 48: 10-18
- Thomas C. 2009. Golf lawns and football pitches turning yellow. Cambridgeshire, Milton Contact Ltd.: 1 str.
<http://www.miltoncontact-blog.com/2009/03/golf-lawns-and-football-pitches-turnign.html>
(julij 2015)
- Tieman D.M., Taylor M.G., Ciardi J.A., Klee H.J. 2000. The tomato ethylene receptors *Nr* and *LeETR4* are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97: 5663-5668
- Tigano M.S., Carneiro R.M., Jeyaprakash A., Dickson D.W., Adams B.J. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. Nematology, 7, 6: 851-862
- Ton J., Van Pelt J.A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 15: 27-34
- Triantaphyllou A.C. 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. V: An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and control. Sasser J.N., Carter C.C. (eds.). Raleigh, North Carolina State University Graphics: 113-126
- Tsuda K., Katagiri F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. Current Opinion in Plant Biology, 13: 459-465
- Tuominen H., Overmyer K., Keinänen M., Kollist H., Kangasjärvi J. 2004. Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 39: 59-69
- Uehara T., Sugiyama S., Matsuura H., Arie T., Masuta C. 2010. Resistant and susceptible responses in tomato to cyst nematode are differentially regulated by salicylic acid. Plant & Cell Physiology, 51, 9: 1524-1536
- Ullrich C.I., Aloni R. 2000. Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. Journal of Experimental Botany, 51: 1951-1960

- Urek G., Hržič A. 1998. Ogorčice - nevidni zajedalci rastlin: fitonematologija. Ljubljana, Samozaložba: 240 str.
- Urek G., Širca S., Karssen G. 2003. A review of plant-parasitic and soil nematodes in Slovenia. *Nematology*, 5: 391–403
- Van der Ent S., Van Wees S.C.M., Pieterse C.M.J. 2009. Jasmonate signalling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70: 1581-1588
- Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort R.A., Schell J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing activity. *Nature*, 252: 169–170
- Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review in Phytopathology*, 36: 453-483
- Van Loon L.C., Van Strien E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 2: 85-97
- Van Wees S.C.M., De Swart E.A.M., Ven Pelt J.A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 15: 8711-8716
- Van Wees S.C.M., Luijendijk M., Smoorenburg I., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *At-vsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41: 537-549
- Van Wees S.C.M., Van der Ent S., Pieterse C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 443-448
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: research0034-research0034.11: 12 str.
- Veena J. H., Doerge R.W., Gelvin S.B. 2003. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *The Plant Journal*, 35: 219–236
- Verhage A., Vlaadingerbroek I., Raaijmakers C., Van Dam N., Dicke M., Van Wees S.C.M. in sod. 2011. Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Frontiers in Plant Science*, 2: 47, doi: 10.3389/fpls.2011.00047: 12 str.
- Veselov D., Langhans M., Hartung W., Aloni R., Feussner I., Götz C., Veselova S., Schlomski S., Dickler C., Bächmann K., Ullrich C.I. 2003. Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta*, 216: 512-522

- Vogel J., Normand P., Thioulouse J., Nesme X., Grundmann G.L. 2003. Relationship between spatial and genetic distance in *Agrobacterium* spp. in one cubic centimeter of soil. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 1482-1487
- Vos C., Schouteden N., van Tuinen D., Chatagnier O., Elsen A., De Waele D., Panis B., Gianinazzi-Pearson V. 2013. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. *Soil Biology & Biochemistry*, 60: 45-54
- Vos P., Simons G., Jesse T., Wijbrandi J., Heinen L., Hogers R., Frijters A., Groenendijk P., Reijans M., Fierens-Onstenk J., de Both M., Peleman J., Liharska T., Hontelez J., Zabeau M. 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology*, 16: 1365-1369
- Waetzig G.H., Sobczak M., Grundler F.M.W. 1999. Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology*, 1: 681-686
- Wang D., Amornsiripanitch N., Dong X. 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathology*, 2, 11: e123, doi:10.1371/journal.ppat.0020123: 1042-1050
- Wang K.L.-C., Li H., Ecker J.R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14: 131-151
- Wang Z., Potter R.H., Jones M.G.K. 2003. Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant Pathology*, 4: 361-371
- Wasemael W.M.L., Perry R.N., Moens M. 2006. The influence of root diffusate and host age on hatching of the root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Nematology*, 8, 6: 895-902
- Wasemael W.M.L., Viaene N., Moens M. 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, 13, 1: 3-16
- Watson B., Currier T.C., Gordon M.P., Chilton M.-D., Nester E.W. 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 123: 255-264
- Weerasinghe R., Bird D., Allen N. 2005. Root-knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 3147-3152
- Weiler E.W., Kutchan T.M., Gorba T., Brodschelm W., Niesel U., Bublitz F. 1994. The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Letters*, 345: 9-13
- Wendehenne D., Durner J., Chen Z., Klessig D.F. 1998. Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry*, 47, 4: 651-657
- Wiggers R.J., Starr J.L., Price H.J. 1990. DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 80, 12: 1391-1395

- Williamson V.M. 1999. Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 327–331
- Wilson M.A., Bird D.m., Vanderknaap E. 1994. A comprehensive subtractive cDNA cloning approach to identify nematode-induced transcripts in tomato. *Phytopathology*, 84: 299–303
- Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B. 2002. Histidine protein kinases: a key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3, 10: reviews3013, doi: 10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013: 8 str.
- Wondafraash M., Van Dam N.M., Tytgat T.O.G. 2013. Plant systemic induced responses mediate interactions between root parasitic nematodes and aboveground herbivorous insects. *Frontiers in Plant Science*, 4: 87, doi: 10.3389/fpls.2013.00087: 15 str.
- Wu Y., Zhang D., Chu J.Y., Boyle P., Wang Y., Brindle I.D., in sod. 2012. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports*, 1: 639–647
- Wyss U., Grundler F.M.W., Münch A. 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, 38: 98–111
- Xu X.Q., Pan S.Q. 2000. An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Molecular Microbiology*, 35: 407–414
- Yan Z., Reddy M.S., Ryu C.-M., McInroy J.A., Wilson M., Kloepper J.W. 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 92: 1329–1333
- Yang S.F., Hoffman N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35: 155–189
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr, A., Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1:, 89–103
- Yuan Z.-C., Edlind M.P., Liu P., Saenkham P., Banta L.M., Wise A.A., Ronzone E., Binns A.N., Kerr K., Nester E.W. 2007. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 28: 11790–11795
- Yuan Z.C., Haudecoeur E., Faure D., Kerr K.F., Nester E.W. 2008a. Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and γ -amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*–plant co-evolution. *Cellular Microbiology*, 10: 2339–2354
- Yuan Z.C., Liu P., Saenkham P., Kerr K., Nester E.W. 2008b. Transcription profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signalling involved in *Agrobacterium*–plant interactions. *Journal of Bacteriology*, 190, 2: 494–507

- Zhang L., Zhang J., Christie P., Li X. 2008. Pre-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi suppresses root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on cucumber (*Cucumis sativus*). *Biology and Fertility of Soils*, 45, 2: 205-211
- Zhang S., Klessig D.F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6, 11: 520-527
- Zhao Y., Thilmony R., Bender C.L., Schaller A., He S.Y., Howe G.A. 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant Journal*, 36: 485-499
- Zijlstra C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 3: 283-290
- Zipfel C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 414-420
- Zipfel C., Kunze G., Chincilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T. in sod. 2006. Perception of bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125: 749-760
- Zutra D., Orion D. 1982. Crown gall bacteria (*Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*) on cotton roots in Israel. *Plant Disease*, 66: 1200-1201

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem.

PRILOGA A

Podroben opis izvora, opažene morfologije kolonij ter določeni aleli gena *recA* s pripadajočo akcesijsko številko vseh sevov uporabljenih v pregledni študiji populacij *A. tumefaciens* biovar 1 na kmetijskih površinah v Sloveniji.

Ime seva	Regija	Mesto vzorčenja	Morfologija kolonij ^a	Oznaka <i>recA</i> alela	Akc. št.
11-1	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-1	KC291939
46-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-1	KC291940
1-1	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-2	KC291941
6-1	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-2	KC291942
24-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-2	KC291943
43-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-2	KC291944
75-1	Podravje	Vinograd	Hrapava	<i>recA</i> -G1-2	KC291945
3-2	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6	KC291946
5-3	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6	KC291947
22-3	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6	KC291948
33-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6	KC291950
62-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6	KC291952
25-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6	KC291949
41-2	Savinjska	Nasad sadnega drevja (drevesnica)	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6	KC291951
39-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-6*	KC291978
7-2	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-7	KC291953
63-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-7	KC291955
34-1	Savinjska	Vinograd	Hrapava	<i>recA</i> -G1-7	KC291954
23-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-7*	KC291977
10-1	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-10	KC291975
9-2	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-12	KC291971
20-3	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-12	KC291972
8-2	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-14	KC291964
43-5	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-14	KC291965
52-2	Spodnjeposavska	Travnik	Hrapava	<i>recA</i> -G1-14	KC291966
Z2	Spodnjeposavska	Njiva	Hrapava	<i>recA</i> -G1-14	KC291967
8-3	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291956
9-3	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291957
49-2	Spodnjeposavska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291960
76-1	Podravje	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291963
15-1	Savinjska	Njiva	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291958
30-1	Osrednjeslovenska	Travnik	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291959

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Ime seva	Regija	Mesto vzorčenja	Morfologija kolonij ^a	Oznaka <i>recA</i> alela	Akc. št.
45-1	Savinjska	Travnik	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291961
52-1	Spodnjeposavska	Travnik	Hrapava	<i>recA</i> -G1-15 ^b	KC291962
4-1	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-16 ^b	KC291968
16-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-16 ^b	KC291969
70-1	Podravje	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-16 ^b	KC291970
26-1	Savinjska	Travnik	Hrapava	<i>recA</i> -G1-17 ^b	KC291973
31-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-17 ^b	KC291974
13-1	Savinjska	Travnik	Hrapava	<i>recA</i> -G1-18 ^b	KC291976
51-1	Spodnjeposavska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-19 ^b	KC291979
55-2	Spodnjeposavska	Nasad sadnega drevja	Hrapava	<i>recA</i> -G1-20 ^b	KC291980
72-3	Podravje	Njiva	Hrapava	<i>recA</i> -G1-21 ^b	KC291981
56-1	Podravje	Njiva	Gladka	<i>recA</i> -G4-1	KC291982
2-1	Gorenjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291987
17-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291988
28-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291990
40-5	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291991
44-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291992
53-1	Spodnjeposavska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291994
58-1	Spodnjeposavska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291995
67-3	Podravje	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291996
21-A	Savinjska	Nasad sadnega drevja (drevesnica)	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291989
48-1	Dolenjska	Vinograd (trsnica)	Gladka	<i>recA</i> -G4-2*	KC291993
57-1	Spodnjeposavska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-5	KC291984
65-1	Podravje	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-5	KC291985
74-1	Podravje	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-5	KC291986
29-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-5	KC291983
48-2	Spodnjeposavska	Vinograd (trsnica)	Gladka	<i>recA</i> -G4-7 ^b	KC292007
27-1	Savinjska	Travnik	Gladka	<i>recA</i> -G4-8 ^b	KC292002
34-2	Savinjska	Vinograd	Gladka	<i>recA</i> -G4-8 ^b	KC292003
35-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-8 ^b	KC292004
60-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-8 ^b	KC292005
68-1	Podravje	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-8 ^b	KC292006
20-2	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-9 ^b	KC291997
54-2	Spodnjeposavska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-9 ^b	KC291998
69-1	Podravje	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-9 ^b	KC291999
25-2	Savinjska	Nasad sadnega drevja (drevesnica)	Gladka	<i>recA</i> -G4-10 ^b	KC292000
61-1	Savinjska	Nasad sadnega drevja	Gladka	<i>recA</i> -G4-10 ^b	KC292001

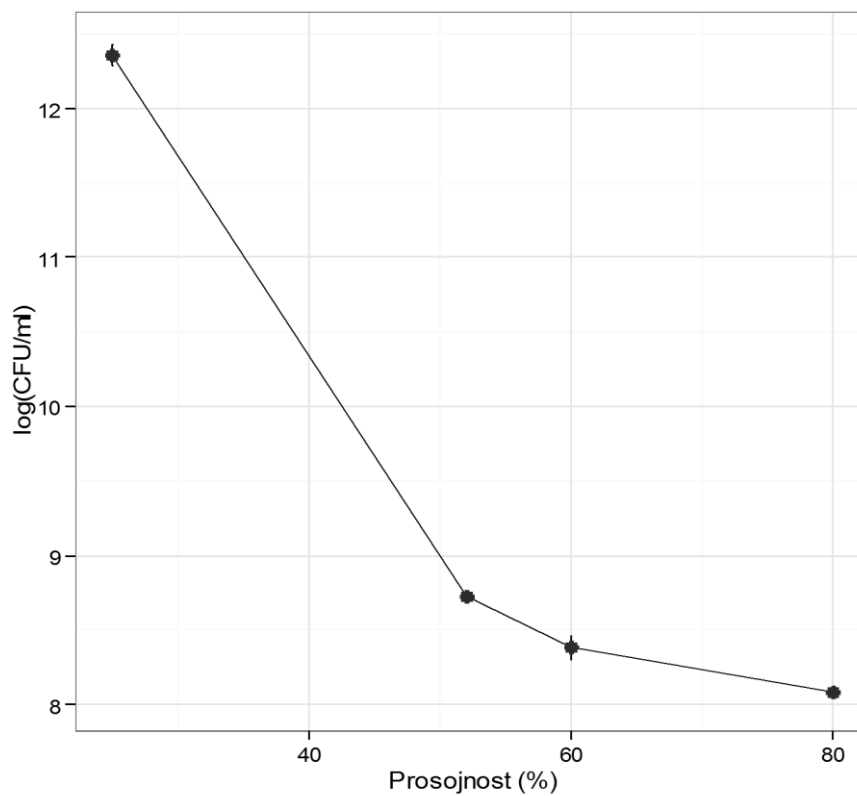
^a Rast na gojišču KB pri 27 °C

^b Na novo določeni aleli *recA*

*označuje alele z enim spremenjenim nukleotidom v zaporedju glede na zaporedje referenčnega alela

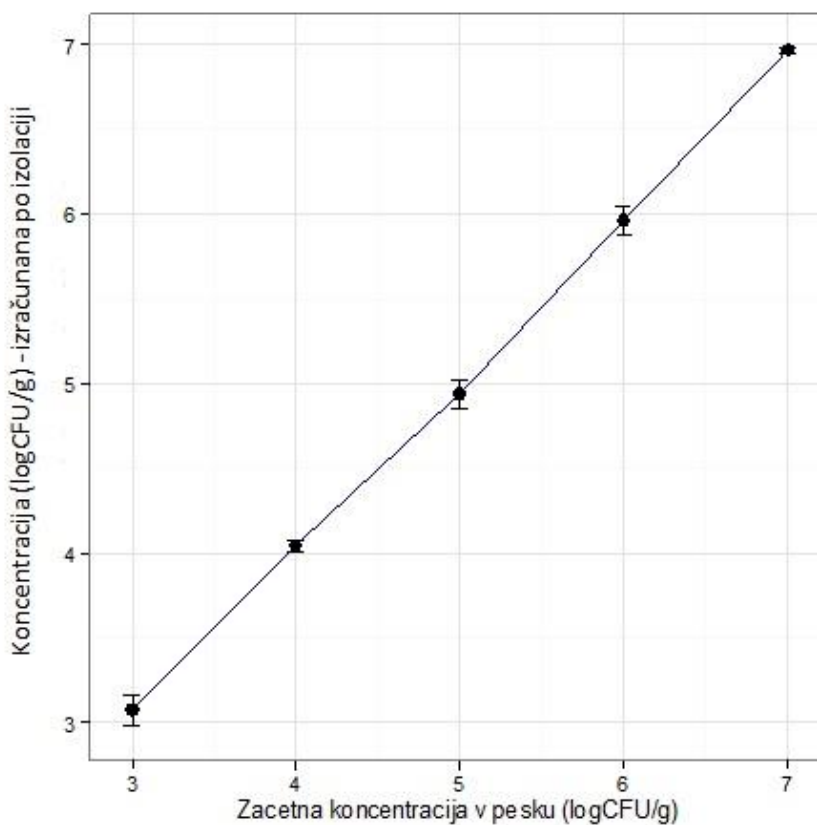
PRILOGA B

Določanje koncentracije bakterij *A. tumefaciens* v vodi glede na prosojnost (transmitanca) vodne suspenzije. Polne pike prikazujejo povprečno vrednost koncentracije bakterij ($\log(\text{CFU/ml})$) v treh ponovitvah s pripadajočim intervalom zaupanja (95 %).



PRILOGA C

Uspešnost izolacije bakterij *A. tumefaciens* 06-424-7 z drobnega kremenčevega peska (Termit) z 20 % vlago, ki smo ga uporabili kot rastni substrat paradižnika v lončnih poskusih. Polne pike prikazujejo povprečno vrednost koncentracije bakterij ($\log(\text{CFU/g})$) izračunano po izolaciji bakterij iz petih ponovitev. Prikazani so pripadajoči intervali zaupanja (95 %).



PRILOGA D

Povprečna stabilnost izražanja štirih referenčnih genov (vrednost M) v treh časovnih točkah vzorčenja (0, 4, 12 dpi) in združenega vzorca (roots). Iz slike je razvidno, da je uporaba vseh štirih referenčnih genov v normalizaciji smiselna, saj je vrednost M manjša od 0,5. Graf smo izdelali z R paketom SLqPCR (Kohl, 2007).

